

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
CONSERVAÇÃO

Mariellen Cristine Costa

**MANEJO GENÉTICO PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DO MUTUM-DO-
SUDESTE, *Crax blumenbachii* (AVES, CRACIDAE)**

Sorocaba
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS DE SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
CONSERVAÇÃO

Mariellen Cristine Costa

MANEJO GENÉTICO PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DO MUTUM-DO-SUDESTE, *Crax blumenbachii* (AVES, CRACIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de mestre em Diversidade Biológica e Conservação.

Orientação: Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco

Sorocaba
2015

Costa, Mariellen Cristine

MANEJO GENÉTICO PARA A CONSERVAÇÃO EX SITU DO
MUTUM-DO-SUDESTE, *Crax blumenbachii* (AVES, CRACIDAE) /
Mariellen Cristine Costa. -- 2015.

38 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Mercival Roberto Francisco

Banca examinadora: Alexandra Sanches, Luís Fábio Silveira

Bibliografia

1. Mutum (Ave) – Mata Atlântica. 2. Mutum (Ave) – Genética Animal. 3.
Microsatélites (Genética). I. Orientador. II. Universidade Federal de São
Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

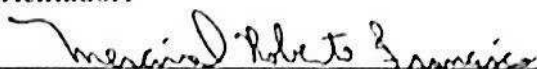
DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

MARIELLEN CRISTINE COSTA

MANEJO GENÉTICO PARA A CONSERVAÇÃO EX-SITU DO
MUTUM-DO-SUDESTE, *Crax blumenbuchii* (AVES,
CRACIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação para obtenção do título de
mestre em Diversidade Biológica e Conservação,
Universidade Federal de São Carlos,
Sorocaba, 30 de janeiro de 2015.

Orientador:



Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco

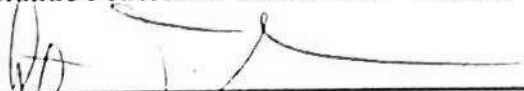
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar *Campus Sorocaba*

Examinadores:



Profa. Dra. Alexandra Sanches

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar *Campus Lagoa do Sino*



Dr. Luís Fábio Silveira

Universidade de São Paulo - USP

AGRADECIMENTOS

Agradecer é sempre um processo de retrospectiva de um trabalho. Olhar para trás e tentar ver em que momento as parcerias e contribuições foram surgindo. Nesse momento percebo como esse trabalho não poderia ser fruto de um esforço individual, e não deixa de ser apenas uma peça no grande quebra-cabeça que é a conservação de espécies ameaçadas no Brasil. Portanto, não poderia deixar de agradecer primeiramente ao idealizador do projeto, que me apresentou as relevantes questões relacionadas à conservação das aves da família Cracidae.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco, pois não posso mensurar as significativas contribuições que proporcionou em minha trajetória acadêmica e mesmo depois de quatro anos sob sua orientação é impressionante como sempre tem algo a oferecer, seja contribuições teórico-científicas, sugestões ou simplesmente uma conversa informal sobre outros trabalhos que gostaria de realizar e futuras parcerias. Obrigada pela oportunidade, amizade e sobre tudo, confiança.

Ao Prof. Dr. Luís Fábio Silveira, que como meu orientador, é um idealizador do programa de conservação de cracídeos no Brasil, por auxiliar durante os períodos de coleta de sangue, pelas contribuições e parcerias realizadas ao longo da dissertação e por ser um dos incentivadores durante minha trajetória acadêmica.

Agradeço imensamente a colaboração estabelecida com os principais mantenedores da espécie, CRAX - Sociedade de Pesquisa da Fauna Silvestre (Sr. Roberto Azeredo), ao Instituto Ave é Vida (Sr. Moacyr de Carvalho e Sr^a. Leticia Carvalho Dias), ao Criadouro Tropicus (Sr. Victor Fasano) e ao Criadouro Científico para fins de Conservação Pontões (Sr. Geraldo Oliveira) por cederem às amostras e as informações pertinentes a este trabalho e por estarem realmente comprometidos com a conservação de espécies ameaçadas.

À toda a equipe executora do Plano de Ação Nacional para a Conservação do Mutumdo-Sudeste, *Crax blumenbachii*.

À minha hoje amiga, mas durante muitos anos companheira de laboratório, Crisley de Camargo, que colaborou desde meu projeto de iniciação científica e comemorou cada *locus* polimórfico, pois somente você sabe contemplar por horas bandas em um gel. Obrigada pelas infinitas conversas, discussões e troca de conhecimento e pela paciência, você foi

imprescindível para a realização desse trabalho em uma verdadeira parceria. E também espero poder retribuir de alguma maneira, à altura, algum dia (se é que você me entende!).

Aos novos colegas de laboratório, Cesar Medolago, Carlos Biagolini e Angélica Medeiros, que nesses anos de troca de conhecimento, contribuíram de alguma forma com o andamento desse projeto.

Aos meus pais, João e Rose, pelo apoio incondicional as minhas decisões, pelo amor e carinho, compreendo todo o sacrifício realizado para que meus sonhos fossem prioridade. Aos meus avós pela preocupação e pela dedicação à união da família, são minhas memórias de infância mais felizes os almoços de domingo, desculpem por não estar mais sempre presente.

Às minhas amigas de graduação, Juliana Coelho, Láís Petri, Vanessa Mariano, Fernanda Scaravelli, Camila Galvão e Mariana de Castro, que compartilharam esse sonho de serem biólogas e hoje cada uma seguiu estradas distintas, mas mesmo com a distância não deixam de apoiar e incentivar. Um agradecimento especial a Vanessa Mariano, que dividiu comigo esses dois anos de mestrado, que contou com muitos momentos de ansiedades, nervosismos, estresse e receios acadêmicos, mas também comemorou cada conquista.

Às minhas amigas de infância, Juçara Cominal, Juliana Rosini, Joyce Gomides e Mariana Santana, que são grandes incentivadoras da minha carreira e dividiram cada momento dessa trajetória comigo, pelas longas conversas e conselhos.

Por fim, agradeço as instituições que colaboraram com esse projeto. À FAPESP (Proc. 2008/51197-0) pelo apoio financeiro que subsidiou todas as análises genéticas, ao ICMBio/CEMAVE pelo apoio financeiro para a realização das coletas de amostras de sangue e a CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.

RESUMO

COSTA, Mariellen Cristine. *Manejo genético para a conservação ex situ do Mutum-do-Sudeste*. 2015. 38 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2015.

Populações cativas de espécies ameaçadas são frequentemente pequenas, isoladas e fundadas por um número limitado de indivíduos, o que as torna mais suscetíveis à deriva genética e aos efeitos de endogamia. Assim, a preservação da máxima variabilidade genética é uma das principais preocupações dos programas de reprodução em cativeiro e compreender os níveis de estruturação populacional e variabilidade genética é importante para o desenvolvimento de estratégias de manejo de populações em cativeiro. O Mutum-do-Sudeste (*Crax blumenbachii*) é endêmico da Mata Atlântica de planície e é considerado extinto na maior parte de sua distribuição original. Um programa de reprodução em cativeiro foi iniciado na década de 70 com a independente fundação de dois plantéis, que posteriormente disponibilizou animais para outros aviários. Com o sucesso da reprodução em cativeiro, um programa de reintrodução começou em 1991 e mais de 226 animais foram soltos na natureza até o momento. No entanto, têm sido utilizados animais que são descendentes de um único criatório e a possibilidade de outras linhagens aumentarem a variabilidade genética nestas, e futuras populações reintroduzidas, nunca foi investigado. Por isso, analisamos a estrutura genética e a diversidade dos fundadores e mais dois importantes plantéis desta espécie utilizando oito locos microssatélites. A análise de agrupamento Bayesian revelou dois grupos distintos em equilíbrio de Hardy-Weinberg e que não apresentaram evidências significativas de endogamia. A existência de duas linhagens distintas em cativeiro tem implicações para programas de reprodução e reintrodução. Recomendamos que as populações devam ser manejadas como unidades independentes, mas os indivíduos com ancestralidade mista devem ser produzidos como uma forma de aumentar o sucesso das reintroduções.

Palavras-chave: Galliformes. Marcadores Microssatélites. Endocruzamento. Manejo genético

ABSTRACT

Captive populations of endangered species are often small, isolated, and founded by a limited number of individuals, which makes them more susceptible to genetic drift and inbreeding effects. Thus, the preservation of the maximum genetic variability is a major concern of captive breeding programs, and understanding the levels of population structuring and genetic variability is important for developing management strategies of captive populations. The Red-billed Curassow (*Crax blumenbachii*) is endemic to the Brazilian lowland Atlantic Forests and is considered extinct in most of its original distribution. A captive breeding program was initiated during the 70s with the independent foundation of two breeding stocks, that posteriorly supplied animals to other aviaries. With the success of the captive propagation, a reintroduction program has started in 1991, and more than 226 animals have been released into the wild so far. However, animals descending from only one aviary have been used, and the capability of other lineages to increase genetic variability in these, and future released populations, has never been investigated. Then, we analyzed the genetic structure and diversity of the founders and two further important breeding facilities reproducing this species, using 8 microsatellite loci. Bayesian clustering analysis revealed two distinct groups that were in Hardy–Weinberg equilibrium and did not present significant evidences of inbreeding. The existence of two distinct lineages in captivity has implications for breeding and reintroduction programs. We recommend populations to be managed as independent units, but admixed individuals should be produced as a manner to increase reintroduction success.

Keywords: Galliformes. Microsatellite marker. Inbreeding. Genetic management.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1. Área de ocorrência histórica do Mutum-do-Sudeste, *Crax blumenbachii* Spix, 1825.....16
- Figura 2. A) Macho e B) Fêmea de Mutum-do-Sudeste, *Crax blumenbachii* Spix 1825 (Foto: Mercival Roberto Francisco, 2013).....17

(Capítulo 1)

- Figure 1.1 Proportional membership (q) of four captive population of the Red-billed Curassow in the genetic cluster inferred by Structure ($K = 2$).....26
- Figure 1.2. Outputs graphics from Structure Harvester, indicating the higher value of $\ln P(K)$ (left), and ΔK (right).....26

LISTA DE TABELA

(Capítulo 1)

Table 1.1. Types of alleles found for animals assigned to Cluster 1 and Cluster 2 by Bayesian clustering analysis.....27

Table 1.2. Number of alleles (N_A), allelic richness (A_R), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, inbreeding coefficient (F_{IS}), and its probability is greater than zero (P), and average and standard deviation (SD) for each cluster identified for the breeding facilities of Red-billed Curassow (*Crax blumenbachii*). (Cluster1, $n = 29$ and Cluster 2, $n = 82$).....27

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 <i>Conservação ex-situ e Manejo Genético</i> | <i>11</i> |
| 1.2 <i>Marcadores Moleculares Microsatélites</i> | <i>12</i> |
| 1.3 <i>A família Cracidae.....</i> | <i>14</i> |
| 1.4 <i>Mutum-do-Sudeste, Crax blumenbachii.....</i> | <i>15</i> |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 <i>Objetivo Geral</i> | <i>20</i> |
| 2.2 <i>Objetivos específicos.....</i> | <i>20</i> |
| 3. CAPÍTULO 1 - Population structuring and genetic variability in the captive population of the endangered Red-billed Curassow, Crax blumenbachii (Aves, Cracidae), and its implications for reintroduction programs..... | 11 |
| 3.1 <i>Introduction</i> | <i>12</i> |
| 3.2 <i>Methods.....</i> | <i>14</i> |
| 3.3 <i>Results.....</i> | <i>15</i> |
| 3.4 <i>Discussion.....</i> | <i>17</i> |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 20 |
| 5. REFERENCIAS | 21 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conservação *ex-situ* e Manejo Genético

A conservação *ex-situ* é uma estratégia de preservação em curto prazo que visa manter os indivíduos das espécies em perigo, em condições artificiais, sob a supervisão humana (Primack and Rodrigues 2001). A manutenção de populações cativas e posterior reintrodução na natureza foi considerado uma solução bem sucedida para a conservação de algumas espécies ameaçadas, como o Órix-da-Arabia (*Oryx leucoryx*), Cavalos-de-Przewalskii (*Equus przewalskii*), o Condor-da-Califórnia (*Gymnogyps californianus*) e o Furão-de-pés-negros (*Mustela nigripes*) (Ralls *et al.* 2000, Wisely *et al.* 2003, King and Gurnell 2010, Ismail *et al.* 2011).

As consequências da reprodução em cativeiro dependem do número de indivíduos que iniciaram a população e o grau de parentesco entre os espécimes. As populações cativas normalmente são estabelecidas por um pequeno número de fundadores, por ser difícil coletar indivíduos selvagens ou simplesmente por não estarem mais presentes no ambiente natural (Witzenberger and Hochkirch, 2011). Assim, as populações reduzidas possuem maior suscetibilidade aos efeitos da deriva genética e endocruzamento, o que pode comprometer a sobrevivência da população devido à redução da aptidão dos indivíduos e a perda do potencial evolutivo (Frankham 2008, Fernández *et al.* 2012).

A principal estratégia utilizada para impedir a ocorrência de endocruzamentos é o monitoramento genético da população. Para isto, comumente se utilizam informações contidas nas genealogias dos *studbooks*, o que permite evitar o acasalamento entre indivíduos aparentados (Frankham 2008). Um *studbook* é um amplo registro da população de cativeiro de uma determinada espécie, contendo a árvore genealógica da população, o número de identificação e o histórico de cada indivíduo, como o local e a data de nascimento, eventos de translocações, histórico de ocorrências veterinárias e de reprodução. Este registro é útil para indicar os melhores pares para acasalamento com base não apenas nas genealogias, mas também na idade e no histórico dos indivíduos. Além disso, um *studbook* permite detectar parâmetros demográficos da população, como o seu crescimento, estabilização ou redução, além de pirâmides etárias (Glatston 1986). No entanto, em muitos casos as informações genealógicas podem ser imprecisas ou incompletas (Jones *et al.* 2002). Além disso, os indivíduos restantes de uma espécie ou população podem apresentar alto grau de parentesco. Nestes casos, a aplicação de técnicas de genética molecular torna possível substituir as

genealogias pelo cálculo da distância genética entre os espécimes a serem acasalados minimizando os cruzamentos consanguíneos (Ralls and Ballou 2004, Fernández *et al.* 2012). Para isto, muitas vezes a translocação entre animais de diferentes plantéis é necessária (Frankham *et al.* 2004).

O principal objetivo de todo programa de reprodução em cativeiro é a reintrodução na natureza, o manejo genético também deve ser aplicado para este propósito. Os programas de reintrodução devem utilizar animais saudáveis, com alta capacidade de reprodução e alta heterozigose (Frankham *et al.* 2004, Robert 2009). Além disso, quando um indivíduo é reintroduzido, sua variabilidade genética é adicionada à população natural, mas é removida da população de cativeiro, gerando interesses conflitantes (Frankham *et al.* 2004). Deste modo, Frankham *et al.* (2004) sugerem um modelo teórico com quatro possibilidades: A) indivíduos soltos beneficiam a população reintroduzida equilibrando a frequência dos alelos, mas prejudicariam a população cativa, por serem animais cujos alelos são pouco representados em ambas as populações, B) indivíduos que são benéficos tanto para a população selvagem quanto para o cativeiro, por possuírem alelos bem representados no cativeiro e por apresentam baixos níveis de parentesco com os indivíduos pertencentes a população natural, C) indivíduos prejudiciais para ambas as populações, pois são valiosos no cativeiro e possuem muitos parentes próximos na natureza e D) indivíduos que beneficiam a população de cativeiro, mas prejudicariam a população reintroduzida, pois possuem alelos que são bem representados nas duas populações. Desta maneira, o manejo genético auxilia nas reintroduções permitindo a escolha de indivíduos com altos níveis de heterozigose e que não comprometam a variabilidade genética disponível no cativeiro.

1.2 Marcadores Moleculares Microsatélites

Os marcadores moleculares Microsatélites ou Repetições de Sequências Simples (SSR) são repetições em *tandem* de um a seis pares de base que estão amplamente dispersos pelo genoma de todos os organismos analisados (Bachtrong *et al.* 2000, Zane *et al.* 2002). Esse marcador genético é preferencialmente utilizado em estudos de ecologia molecular (Selkoe and Toonen 2006) devido ao elevado conteúdo de informação, altas taxas de polimorfismo e expressão co-dominante, o que permite diferenciar em análises eletroforéticas os indivíduos homozigotos dos heterozigotos para cada *locus* (Zane *et al.* 2002).

O alto grau de variação de um *locus* de microsatélite é decorrente de uma taxa de mutação mais elevada do que observada para substituições de bases (Schlötterer 2000). A

maioria dos *loci* ocorre em regiões não codificadoras de proteínas no genoma e assim, provavelmente, não são influenciados pelo processo de seleção natural, sendo considerados marcadores neutros, o que garante alto grau de polimorfismo (Tautz and Schlötterer 1994, Ellegren 2004, Li *et al.* 2004).

Os mecanismos predominantes no processo evolutivo de um microsatélite estão relacionados com erros durante a replicação do DNA, como deslizamento (*slippage*) da DNA-polimerase ou *crossing-over* desigual (Levinson and Gutman 1987). O deslizamento da polimerase é o fenômeno mais aceito para explicar a origem de novos alelos de microsatélites. O processo ocorre durante a síntese de DNA, pois no momento em que as duas fitas (molde e complementar) são separadas pode ocorrer a formação de alças, o que gera um realinhamento incorreto com ganho ou perda de unidades repetitivas. Os erros podem ser corrigidos pelos mecanismos de reparo, mas o sistema de reparo pode não ser eficiente em alguns casos, o que permite a variação no número de repetição do microsatélite (Levinson and Gutman 1987, Schlötterer and Tautz 1992, Kruglyak *et al.* 2000, Ellegren, 2004).

Os *loci* de microsatélites podem ser estudados, segundo o grau de variação, através da amplificação por PCR utilizando-se pares de *primers* complementares às sequências flanqueadoras de cada *locus* e posteriormente, o produto da reação é submetido a análise em gel de eletroforese. Dessa forma, a quantidade de DNA necessária para se isolar os microsatélites é menor do que a utilizada em outros marcadores (Zane *et al.* 2002). Entretanto, como os *loci* são espécie-específicos, precisam ser isolados para cada espécie que esteja sendo avaliado pela primeira vez, o que pode gerar grande gasto de tempo e recursos financeiros, pois exige a utilização de técnicas dispendiosas (Goldstein and Pollock 1997, Zane *et al.* 2002).

Contudo, é possível realizar a transferibilidade de *primers* desenvolvidos para uma espécie (espécie de origem) em espécies evolutivamente relacionadas (espécie alvo), uma vez que as regiões flanqueadoras dos microsatélites são altamente conservadas (Galbusera *et al.* 2000, Primmer and Merila 2002, Zane *et al.* 2002). A amplificação de *primers* heterólogos pode ser especialmente útil para estudos com aves, uma vez que o genoma desse grupo apresenta baixa frequência de microsatélites quando comparado com outros vertebrados (Primmer *et al.* 1997, Neff and Gross 2001), o que torna o processo de isolamento de microsatélites menos eficiente em espécies de aves (Gregory *et al.* 2006). Entretanto, o sucesso de transferibilidade pode ser influenciado pela distância genética entre a espécie alvo e a espécie de origem (Primmer *et al.* 1996, Galbusera *et al.* 2000). Kupper e colaboradores (2008) sugerem que o sucesso de amplificação depende do grau de conservação da região que

antecede o microsatélite, sendo específico para cada *locus*. Assim, os *loci* com alta taxa de conservação da região flangeadora podem ser transferidos para grupos taxonômicos mais distantes. Dessa forma, a técnica de transferibilidade pode facilitar o uso dos microsatélites, uma vez que reduz esforço e custos com isolamento dos *loci*, principalmente quando os microsatélites apresentam baixa frequência, gerando aumento da relação custo-eficiência (Primmer and Merila 2002, Selkoe and Toonen 2006).

Para a família Cracidae, atualmente temos seis *loci* publicados por Hughes and Larson (2000) específicos para a espécie *Crax globulosa*, 10 *loci* polimórficos descritos por Sousa *et al.* (2013) isolados para *Pauxi tuberosa* e sete *loci* caracterizados por Costa *et al.* (2014) para *Aburria jacutinga* e incluindo um adicional de três *loci* que foram monomórficos para *Pauxi tuberosa*, mas apresentaram variação no número de alelos quando testados em outras espécies da família.

1.3 A família Cracidae

Os cracídeos são aves de grande porte, endêmicas da região Neotropical e pertencentes à ordem Galliformes (Sick 1997). A família é constituída por nove gêneros e aproximadamente 50 espécies, sendo divididos em grupos facilmente identificáveis: os Mutuns (gêneros *Crax*, *Pauxi* e *Nothocrax*), Jacutingas e Jacus (gêneros *Chamaepetes*, *Penelopina*, *Penelope* e *Aburria*), Aracuãs (gênero *Ortalis*), além do gênero *Oreophasis* que é monotípico (Frank-Hoeflich *et al.* 2007). Estudos com base em filogenia molecular (Pereira *et al.* 2002, Pereira and Baker 2004, Grau *et al.* 2005) combinados com dados morfológicos (Frank-Hoeflich *et al.* 2007) contribuíram para elucidar algumas relações filogenéticas dessa família, além de sugerir sinonímias entre os gêneros *Pipile* e *Aburria* e entre os gêneros *Mitu* e *Pauxi*.

As espécies dessa família podem ser consideradas indicadores de qualidade do habitat, pois ocorrem preferencialmente em florestas primárias, sendo sensíveis a degradação do ambiente. As Jacutingas e Jacus são considerados dispersores de sementes auxiliando na regeneração natural das florestas, pois tendem a buscar frutos e folhas no alto das árvores. Já os Mutuns são predadores de sementes, colaborando com o controle das densidades populacionais de diversas espécies de plantas (Brooks and Fuller 2006). Além do relevante papel biológico em ecossistemas florestais, os cracídeos possuem importância para a economia de subsistência como fonte de proteína para as populações indígenas e rurais da região Neotropical (Thiollay 1994). Dessa maneira, a vulnerabilidade à caça e a perda de habitat geraram declínios populacionais em algumas espécies.

Dentre as aproximadamente 50 espécies existentes, 24 encontram-se sob alguma categoria de ameaça sendo a família Cracidae considerada como o grupo de aves Neotropical com o maior número de representantes ameaçados de extinção (Keane *et al.* 2005, Brooks and Fuller 2006). O risco de extinção pode ser influenciado pela biologia das espécies. As interferências antrópicas podem ser consideradas atualmente a principal causa de extinções, porém as perturbações não afetam de forma homogênea as espécies. Portanto, o risco de extinção não é distribuído aleatoriamente e determinadas famílias podem apresentar uma maior proporção de espécies ameaçadas de extinção do que o esperado, enquanto outros contêm uma proporção menor do que o esperado (Bennet and Owens 1997). Dentre as 143 famílias estudadas por Bennet and Owens (1997), oito famílias continha um número significativamente maior de espécies ameaçadas do que seria esperado pelo acaso, sendo a família Cracidae uma delas.

O Brasil compreende uma das maiores diversidade de táxons possuindo pelo menos 24 espécies, sendo sete endêmicas: *Penelope pileata*, *Penelope ochrogaster*, *Penelope jacucaca*, *Ortalis superciliaris*, *Ortalis araucuan*, *Pauxi mitu* e *Crax blumenbachii* (Silveira *et al.* 2008, CBRO, 2014). De acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (2014), uma das espécies brasileiras se encontra “Extinta na Natureza” (*P. mitu*) e três estão na categoria “Ameaçadas de Extinção” (*A. jacutinga*, *C. blumenbachii* e *C. globulosa*).

1.4 Mutum-do-Sudeste, *Crax blumenbachii*

O Mutum-do-Sudeste, *Crax blumenbachii* Spix, 1825, é endêmico da Mata Atlântica com registros históricos de distribuição em florestas de baixa altitude (500m) e de tabuleiros. A espécie era encontrada desde a região da cidade do Rio de Janeiro até o sul da Bahia, chegando ao leste de Minas Gerais (Figura 1) (IBAMA 2004). Atualmente, pode ser considerado extinto na maior parte de sua distribuição original, sendo praticamente inexistente fora de áreas de proteção de domínio público ou privado na Bahia (Reserva Biológica de Una, Parque Nacional do Descobrimento, Parque Estadual de Ituberá) e no Espírito Santo (Reserva Biológica de Sooretama, Reserva Natural Vale e Fazenda Cupido) (ICMBio, 2013).

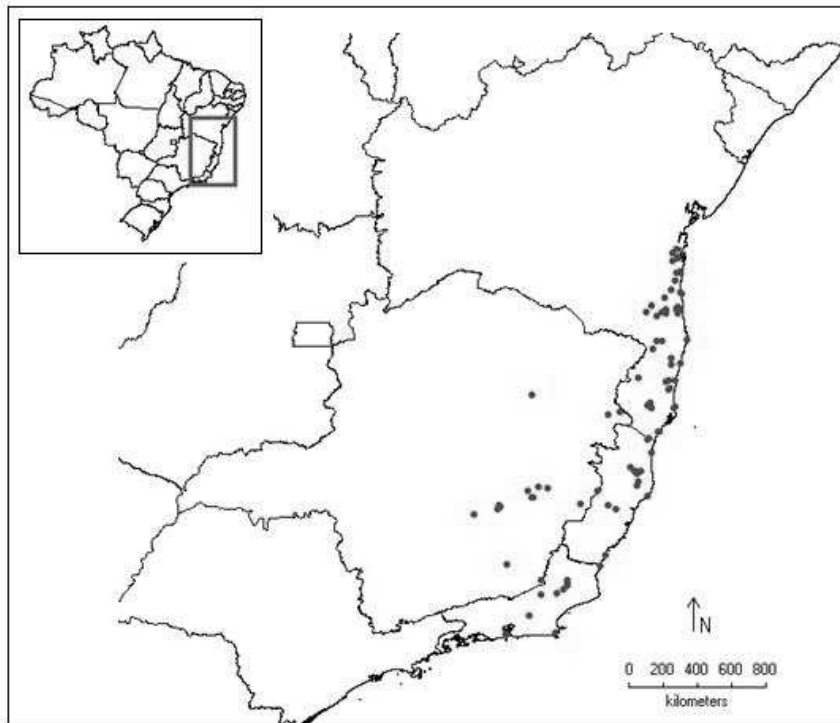


Figura 1. Área de ocorrência histórica do Mutum-do-Sudeste, *Crax blumenbachii* Spix, 1825.

A espécie é de grande porte, com comprimento total entre 80 e 93 cm, peso entre 3 a 3,5 kg e apresenta dimorfismo sexual bastante característico (Figura 2) (Sick 1997) e podem ser considerados monogâmicos (Sick 1997), porém grupos de um macho e duas fêmeas foram documentados por Srbek-Araujo e colaboradores (2012) em ambiente natural sugerindo poligamia na espécie, o que é comumente observado em cativeiro. Alcançam a maturidade sexual entre 2,5 e 3 anos de idade, com postura de dois ovos por estação reprodutiva (agosto a fevereiro). Os indivíduos continuam férteis em cativeiro até os 18 anos e podem alcançar 25 anos de idade. Alimentam-se predominantemente de frutos e sementes, porém consomem secundariamente folhas e invertebrados (Muñoz and Kattan 2007).

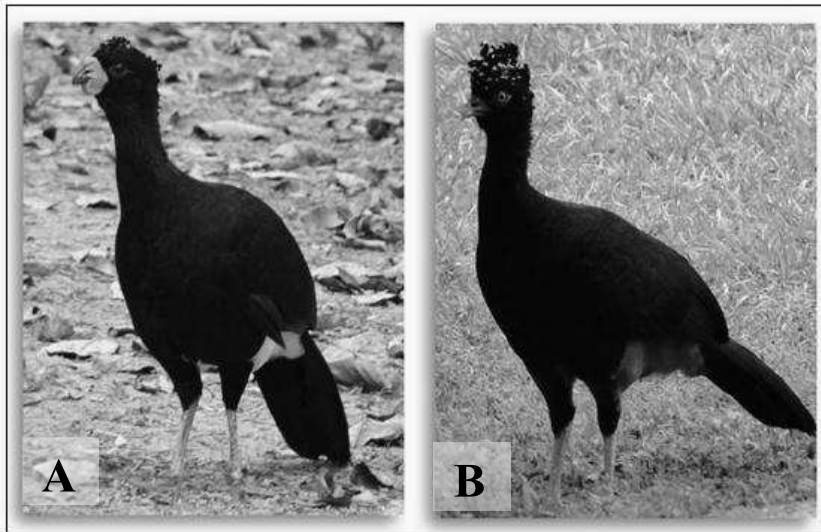


Figura 2. A) Macho e B) Fêmea de Mutum-do-Sudeste, *Crax blumenbachii* Spix 1825 (Foto: Mercival Roberto Francisco, 2013).

A maior população natural está localizada na Reserva Natural da Vale, área adjacente a Fazenda Cupido que foi estimada suportar entre 555 e 740 animais (Srbek-Araujo *et al.* 2012). Outra área importante parece ser “Reserva de Sooretama”, no entanto, não existem estimativas do censo para esse local. Nas demais áreas a presença do Mutum-do-Sudeste é limitado a alguns registros e apenas populações relictual devem estar presente. Sendo assim, as populações de cativeiro têm uma grande importância para a conservação de *C. blumembachii*, dado que o número de animais na natureza foi estimado em 250 enquanto a população de cativeiro já chegou a atingir 600 indivíduos (IBAMA, 2004), que são reproduzidos principalmente em quatro criatórios conservacionistas. A população da Fundação CRAX-Brasil, em Contagem (MG), foi iniciada com quatro indivíduos capturados na natureza no sul da Bahia entre 1978 e 1979 e posteriormente foram incluídos mais quatro indivíduos provenientes do Espírito Santo (1985). Hoje este é o principal criatório da espécie com aproximadamente 130 animais (IBAMA, 2004). A partir de descendentes provenientes desta população, foram fundadas as populações do Instituto Ave é Vida em Poços de Caldas (MG) (hoje com menos de 30 animais) e do Criadouro Tropicus (RJ) (aproximadamente 15 animais). O quarto é o Criadouro Científico para fins de Conservação Pontões localizado em Vitória (ES) que abriga 16 animais provenientes do antigo Criadouro Chaparral que existiu em Recife (PE). Este último pode ser de grande importância porque foi fundado a partir de um grupo distinto de indivíduos trazidos da natureza. Embora não se saiba quantos foram os fundadores deste plantel, ele pode apresentar uma diversidade de alelos diferente dos demais criatórios.

A fim de estabelecer novas populações de *C. blumenbachii* em áreas de distribuição original em que a espécie foi extinta, foram realizadas reintroduções em quatro localidades:

- A) Na Fazenda Macedônia em Ipaba (MG) foi realizada a reintrodução de 67 indivíduos entre 1991 e 1993 (IBAMA 2004, CENIBRA-CRAX 2008). A fazenda administrada pela empresa CENIBRA com cerca de três mil hectares abriga uma área de Reserva Particular de Patrimônio Natural (RPPN) com cerca de 560 hectares na margem direita do Rio Doce. Atualmente, são avistados casais e filhotes na área, o que pode indicar o sucesso da reintrodução (IMABA 2004, Edson Valgas de Paiva, comunicação pessoal).
- B) Na RPPN Comodato Reserva de Peti em São Gonçalo do Rio Abaixo (MG) foram reintroduzidos de 31 indivíduos entre 1999 a 2001. A RPPN é de propriedade da Companhia Vale do Rio Doce e possui cerca de 100 hectares (IBAMA 2004).
- C) Na Área de Proteção de Fechos em Nova Lima (MG) foram reintroduzidos 79 indivíduos entre 1996 e 1998. A área de proteção possui cerca de 1.000 hectares, e é um importante remanescente florestal localizado na região Metropolitana de Belo Horizonte (IBAMA 2004).
- D) Na Reserva Ecológica de Guapiaçu em Cachoeiras de Macacu (RJ) foram reintroduzidos 46 indivíduos entre 2006 e 2008 (Bernardo 2012). Esse projeto de reintrodução foi o único em que foi realizado monitoramento sistemático dos indivíduos reintroduzidos por rádio transmissor (Bernardo *et al.* 2011a). Durante o período de estudo, 15 animais (7 fêmeas e 8 machos) não sobreviveram após as reintroduções, sendo a predação natural a principal causa de morte dos indivíduos (Bernardo *et al.* 2011b).

Nesse sentido, foi desenvolvido pela CRAX - Sociedade de Pesquisa da Fauna Silvestre - um protocolo de reprodução em cativeiro e reintrodução na natureza da espécie, que está disponível no "Plano de Ação Nacional para a Conservação do Mutum-do-sudeste (*Crax blumenbachii*)" idealizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em 2004 e atualmente gerenciado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e coordenado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE). O Plano de Ação é uma medida governamental a fim de estabelecer políticas públicas, pactuadas com a sociedade, para identificar e orientar as ações prioritárias para combater as ameaças que põem em risco as populações de espécies e os ambientes naturais. Com dois objetivos específicos: 1) Promover a proteção de *Crax blumenbachii* e de seu hábitat e 2) Aumentar o conhecimento científico de

Crax blumenbachii, o Plano de Ação foi estabelecido em reuniões com especialistas e foram determinadas pelo menos 30 ações que deveriam ser realizadas em 4 anos. Dentre as diretrizes apresentadas neste plano, encontra-se a necessidade de realizar análises genéticas dos fundadores dos plantéis cativos, visando definir as linhagens e orientar pareamentos para manter a diversidade genética das populações através da reprodução monitorada. No entanto, após a primeira reunião com o grupo assessor em 2004, as atividades foram retomadas apenas em 2011 e, recentemente, foi aprovado o programa de cativeiro do Mutum-do-Sudeste (Portaria Nº 25, De 10 de março de 2014).

Sendo assim, existem questões genéticas importantes que ainda não foram levadas em consideração e que se constituem em demandas apresentadas pelo Plano de Ação. Primeiramente, os níveis de variabilidade e estruturação genética dos plantéis são desconhecidos. Além disso, como a maioria das populações de espécies ameaçadas em cativeiro, o plantel de *C. blumembachii* foi fundado a partir de um número reduzido de animais e não existe informação sobre o número de fundadores que realmente se reproduziram, o que pode ter acentuado os efeitos de endogamia e perda de diversidade alélica. Neste sentido, a implantação do monitoramento genético poderia contribuir para orientar os acasalamentos de maneira a evitar a endogamia e aumentar os níveis de heterozigose nas gerações futuras. Estas análises permitirão também o manejo integrado dos plantéis, indicando se existe a necessidade de translocação de indivíduos entre eles e quais animais deveriam ser permutados a fim de aumentar a variabilidade dentro de cada plantel.

As reintroduções experimentais realizadas até o momento serviram para o desenvolvimento dos protocolos (IUCN, 2009) que permitirão a realização de repovoamentos maiores no futuro. No entanto, estas ações foram realizadas sem a caracterização genética das populações fonte e dos animais utilizados nas solturas. A implantação do manejo genético seria importante também para que as futuras reintroduções utilizem indivíduos com altos níveis de heterozigose, que contribuam com a formação de populações naturais com níveis satisfatórios de variabilidade genética, no entanto, sem colocar em risco a diversidade genética presente nos próprios criatórios (Frankham *et al.* 2004).

A reprodução *ex-situ* e a reintrodução na natureza são alternativas eficientes para a conservação desta espécie, uma vez que animais nascidos em cativeiro hoje já se reproduzem com sucesso em áreas onde haviam sido extintos (Faria *et al.* 2006, Bernardo *et al.* 2011b; Bernardo, 2012). A implantação de um programa de monitoramento genético permitirá aprimorar as ações que buscam reverter o quadro de ameaça desta importante espécie da fauna brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Diante disso, o objetivo principal deste projeto é realizar a análise da variabilidade genética da população cativa de *C. blumenbachii* através do uso de marcadores de microssatélites.

2.2 *Objetivos específicos*

- Analisar a estruturação genética dentre os quatro dos principais plantéis de *C. blumenbachii*;
- verificar o nível de variabilidade genética das linhagens genéticas;
- evidenciar a existência de gargalos populacionais recentes;
- avaliar a necessidade de translocação de animais entre os plantéis analisados;
- introduzir informações genéticas para auxiliar nas tomadas de decisões referentes às reintroduções na natureza.

3. CAPÍTULO 1

Population structuring and genetic variability in the captive population of the endangered Red-billed Curassow, *Crax blumenbachii* (Aves, Cracidae), and its implications for reintroduction programs.

¹ Este capítulo será publicado na forma de artigo em uma revista científica.

3.1 Introduction

Captive populations of endangered species are often small, isolated, and founded by a limited number of individuals, which makes them more susceptible to genetic drift and inbreeding effects (Shaffer 1987, Frankham 2004, Ramirez *et al.* 2006, Alaide *et al.* 2010, Witzemberger and Hochkirch 2011). The resulting loss of genetic variability may translate into reduced survival, fertility, and capability of the populations to adapt to changing environments (Shaffer 1987, Frankham 2004). Together, these problems jeopardize the success of both captive propagation and reintroductions into the wild (Witzemberger and Hochkirch 2011), making the preservation of the maximum genetic variability within species a major concern of captive breeding programs (Ramirez *et al.* 2006, Alaide *et al.* 2010, Yang and Jiang 2011, Mukesh *et al.* 2013). To achieve this purpose, founders ideally should be sampled from various natural populations and reproduction in captivity should not be dominated by a small number of genetic lineages (Witzemberger and Hochkirch 2011). When different lineages are present and levels of genetic variability are low within them, the long-term survival of an endangered species can be enhanced by intermixing individuals from distinct groups, as it leads to increased heterozygosity (Mukesh *et al.* 2013). Then, understanding the levels of population structuring and genetic variability is an important step for developing management strategies that maximize long-term viability of captive populations (Nielsen *et al.* 2007, Nsubuga *et al.* 2010). When information on the origin, number, and levels of genetic variability of founder individuals are incomplete or totally absent, population genetics can provide relevant data that are difficult or impossible to study using other approaches (Russello and Amato 2004, Alaide *et al.* 2010, Mukesh *et al.* 2013).

The Cracidae family is endemic to the Neotropics and comprise medium-sized to large frugivorous birds that are popularly known as curassows, guans and chachalacas (Sick 1997). The cracids play a significant role in tropical forest dynamics, especially through dispersing large-seeded plants (Sedaghatkish *et al.* 1999), and most species depends on large primary forest tracts to survive, which make them highly vulnerable to habitat disturbances (Brooks and Fuller, 2006). Moreover, these birds have been one of the major sources of proteins and have been overexploited by subsistence hunters (Thiollay 1994). As a result, many species are vanishing, and 24 of the approximately 50 existing species are under some level of threat (Brooks and Fuller, 2006). In Brazil, the most critically endangered cracid species are those endemic to the Atlantic Forest, due to the drastic devastation that this important hotspot has

suffered in the last decades (Ribeiro et al. 2009). The most dramatic case is the Alagoas Curassow, *Pauxi mitu*, extinct in the wild since the late seventies (Silveira *et al.* 2004), and the endangered Red-billed Curassow, *Crax blumembachii*, and the Jacutinga, *Aburria jacutinga* (IUCN 2014).

The Red-billed Curassow (*Crax blumenbachii*) is endemic to the Brazilian lowland Atlantic Forests, with historical distribution from southern Bahia to northeast Rio de Janeiro and eastern Minas Gerais states (Sick 1997, IBAMA 2004, del Hoyo and Kirwan 2013). In 2004, the captive population reached 637 individuals, while no more than 250 animals were living in the wild (IBAMA 2004, BirdLife International 2015). Currently, the species can be considered extinct in most of its original distribution, occurring in only six private or public forest fragments (ICMBio 2013, del Hoyo and Kirwan 2013). The largest natural population is in “Reserva Natural da Vale” and “Fazenda Cupido”, two adjacent areas where at least 555-740 animals are estimated to occur (Srbek-Araujo et al. 2012). Another important area seems to be “Reserva Sooretama”, to where, however, census estimates are not available. In the other areas the presence of the Red-billed Curassow is limited to a few records, and only relictual populations must be present. The captive population was initiated in the 70s with the independent foundation of two breeding stocks, CRAX Foundation (in Minas Gerais state) and Chaparral (Pernambuco state). The population of CRAX Foundation was formed by four animals captured in southern Bahia and four from the state of Espírito Santo, but for Chaparral breeding facility the number of founders and their origins are not known. Moreover, there is no information about the level of relatedness between these founders or whether all individuals have contributed with the gene pool (IBAMA 2004). With the success of the captive propagation, a reintroduction program has started in 1991 in three private fragments from Minas Gerais state, where about 180 animals were released so far (with 10% mortality), and 46 animals were reintroduced in a private reserve in the state of Rio de Janeiro, with 33% mortality (Bernardo *et al.* 2011b). However, only animals descending from CRAX Foundation captive stock were used in these reintroductions, and the capability of the other lineages to increase genetic variability in these, and future released populations, has never been investigated.

In this study we used 8 microsatellite loci and Bayesian clustering methods to address the following questions: 1) is there population genetic structuring in the captive Red-billed Curassows? 2) is there evidence for inbreeding? 3) have they experienced recent genetic bottlenecks? Identifying genetic lineages and their history (inbreeding levels and bottlenecks) can provide valuable insights for designing conservation strategies in this species.

3.2 Methods

Sampling and DNA extraction

In collaboration with the four main breeding centers of Red-billed Curassow in Brazil, in 2011 we conducted blood samples collection of 121 adult individuals. “Ave é Vida” Institute (PC, $n = 17$), CRAX-Brazil Foundation (CB, $n = 80$), Tropicus (TR, $n = 8$), and “Criadouro Científico para fins de Conservação Pontões” (CH, $n = 16$). Institutions containing isolated animals were not considered in this work. Approximately, 20 μ l blood sample was preserved in 100% alcohol and stored at -20°C . DNA was extracted using a standard phenol:chloroform protocol (Sambrook *et al.* 1989).

Microsatellite genotyping

DNA sample from all individuals were amplified at eight cross-specific microsatellite loci isolated for the Jacutinga, *Aburria jacutinga* and Razor-billed Curassow, *Pauxi tuberosa* (*Aburria* 48, *Pauxi* 1-4, *Pauxi* 1-16, *Pauxi* 1-30, *Pauxi* 1-36, *Pauxi* 2-30, *Pauxi* 3-1 and *Pauxi* 3-4 (Costa *et al.* 2014). Details on loci isolation and PCR conditions used to amplify individual loci are described in Sousa *et al.* (2013) and Costa *et al.* (2014). All forward primer was fluorescently labeled, and the amplified products were scored on an ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems), and alleles were scored relative to an internal size standard (500 ROX) using Gene Marker 2.6.0 (Soft Genetics).

Population genetic structure analyses

Population genetic structuring and individual assignment to their population of origin were determined using the Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). The model assumes that there are K distinct populations or genetic clusters in a set of multi locus genotypes, each with a distinctive set of allele frequencies at each locus. We used an admixture model with correlated allele frequencies using prior population information. The model using locations as prior information can to assist the clustering when the data set has the signal of structure relatively weak. This is often the case for data sets with few markers or few individuals (Hubisz *et al.* 2009). For the analysis, we ran 500,000 MCMC iterations (discarding 5,000 as burn-in) of each K (1-8). Ten independent replicates at each K value were run. The most appropriate K was defined using the Evanno method (Evanno *et al.*, 2005), implemented by software STRUCTURE HARVESTER (Earl and Vonholdt, 2012), where the true K corresponds to greatest delta K (ΔK), averaging across

runs. To probabilistically evaluate the proportional membership of each individual (q) to each of the inferred clusters, thresholds of $q \geq 0.8$ were assigned to one cluster while those with $q < 0.8$ were determined as an admixed individual (Lecis *et al.* 2006, Nsubuga *et al.* 2010, Mukesh *et al.* 2013). We evaluated the levels of genetic differentiation between clusters (F_{ST}), using the statistics described by Weir and Cockerham (1984) implemented in FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). Possible recent bottlenecks was evaluated in software BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999), using as microsatellite mutation model the two-phase model (TPM) for each cluster, as suggested as most appropriate for detecting recent bottlenecks using microsatellites (Piry *et al.* 1999). The statistical significance of the results were determined using Wilcoxon sign-rank tests.

Genetic diversity analyses

For each captive population, we tested deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), expected (H_E) and observed (H_O) levels of heterozygosity, and number of observed alleles (N_A), using GENEPOP 4.2 (Raymond and Rousset, 1995). The critical levels of significance were adjusted in accordance with the sequential Bonferroni correction for multiple comparisons (Rice, 1989). The allelic richness (A_R) was estimated by rarefaction analysis to account for uneven sample sizes (el Mousadik and Petit, 1996) using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). The same software was used to estimate the levels the heterozygosity deficit, inbreeding coefficient (F_{IS}) according to Weir and Cockerham (1984).

3.3 Results

Population structuring

The Bayesian analyses run in software STRUCTURE showed that there is genetic structure between breeding facilities (Figure 1.1), and software STRUCTURE HARVESTER determined two as the best K for the sample (Figure 1.2). The individuals were assigned to one cluster on the basis of their q values, where 29 individuals were assigned to cluster 1 and 82 to cluster 2. All breeding facilities had individuals that were not assigned to a cluster ($q < 0.8$, $n = 10$). The population structure was highly significant between the two cluster ($F_{ST} = 0.0572$, $P < 0.05$). Software BOTTLENECK revealed a highly significant heterozygotes excess for Cluster 2 ($P = 0.002$), suggesting that a recent bottleneck may have occurred in this lineage, but it did not show the occurrence of recent bottlenecks in Cluster 1, since there was no significant heterozygotes excess ($P = 0.371$).

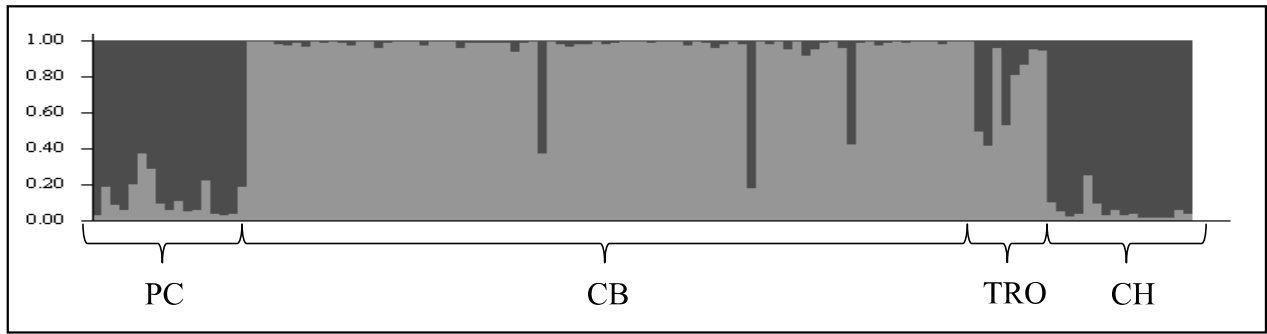


Figure 1.1 Proportional membership (q) of four captive population of the Red-billed Curassow in the genetic cluster inferred by Structure ($K = 2$).

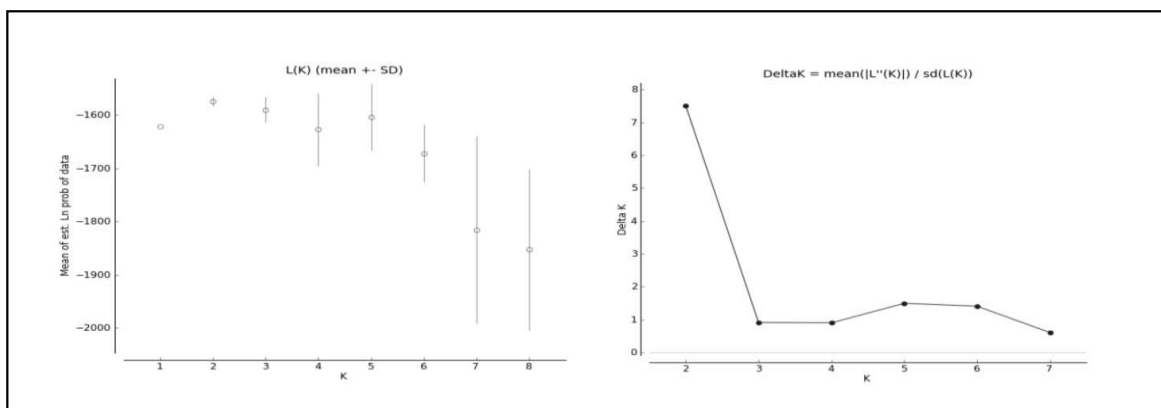


Figure 1.2. Outputs graphics from Structure Harvester, indicating the higher value of $\ln P(K)$ (left), and ΔK (right).

Genetic diversity

A total of 29 alleles were detected from 8 microsatellite loci, ranging from two to ten alleles per locus and the exclusive alleles of each cluster are shown in table 1.1. Mean number of alleles for cluster 1 and cluster 2 was 2.0 and 2.75, respectively. Observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities averaged respectively 0.40 (range: 0.21-0.83) and 0.46 (range: 0.25-0.787) for cluster 1 and 0.55 (range: 0.39-0.89) and 0.50 (range: 0.36-0.72) for cluster 2 (Table 1.2). Significant deviation from HWE was found in only one loci (*Pauxi* 1-36), for both clusters. The average number of alleles and allelic richness (rarefaction in 29 diploid individuals) were respectively 3.00 and 3.00 for cluster 1 and 2.75 and 2.66 for cluster 2 (Table 1.2). The F_{IS} estimates was not significantly greater than zero in any cluster.

Table 1.1. Types of alleles found for animals assigned to Cluster 1 and Cluster 2 by Bayesian clustering analysis.

| <i>Pauxi</i> 1-4 | | <i>Pauxi</i> 1-16 | | <i>Pauxi</i> 1-30 | | <i>Pauxi</i> 1-36 | | <i>Pauxi</i> 2-30 | | <i>Pauxi</i> 3-1 | | <i>Pauxi</i> 3-4 | | <i>Aburria</i> 48 | |
|------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|----------------------|----|
| C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 | C1 | C2 |
| 152 | 152 | 244 | 244 | 298 | 298 | 282 | 282 | 201 | 201 | 173 | 173 | 213 | 213 | 87 | 87 |
| 164 | 164 | 248 | 248 | 302 | 302 | 286 | | 205 | 205 | 175 | | 217 | 217 | 89 | 89 |
| 168 | | | | | | 290 | | | | 179 | 179 | 219 | 219 | | |
| 172 | 172 | | | | | 294 | 294 | | | 183 | 183 | | | | |
| 176 | | | | | | | 298 | | | | | | | | |
| | | | | | | | 306 | | | | | | | | |
| | | | | | | | 310 | | | | | | | | |
| | | | | | | | 314 | 314 | | | | | | | |
| | | | | | | | 340 | 340 | | | | | | | |
| | | | | | | | 344 | | | | | | | | |

Table 1.2. Number of alleles (N_A), allelic richness (A_R), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, inbreeding coefficient (F_{IS}), and its probability is greater than zero (P), and average and standard deviation (SD) for each cluster identified for the breeding facilities of Red-billed Curassow (*Crax blumenbachii*). (Cluster1, $n = 29$ and Cluster 2, $n = 82$)

| Locus | Cluster 1 | | | | | | | Cluster 2 | | | | | | |
|--------------------------|-----------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-----------|-------|-------|----------|-------|--|--|
| | N_A | A_R | H_O | H_E | F_{IS} | P | N_A | A_R | H_O | H_E | F_{IS} | P | | |
| <i>Aburria</i> 48 | 2 | 2.00 | 0.31 | 0.35 | 0.125 | 0.400 | 2 | 2.00 | 0.41 | 0.36 | -0.159 | 0.966 | | |
| <i>Pauxi</i> 1-4 | 4 | 4.00 | 0.25 | 0.50 | 0.045 | 0.456 | 3 | 2.95 | 0.52 | 0.48 | -0.087 | 0.856 | | |
| <i>Pauxi</i> 1-16 | 2 | 2.00 | 0.59 | 0.47 | -0.178 | 0.934 | 2 | 2.00 | 0.67 | 0.50 | -0.346 | 1.000 | | |
| <i>Pauxi</i> 1-30 | 2 | 2.00 | 0.31 | 0.78 | 0.344 | 0.044 | 2 | 2.00 | 0.55 | 0.48 | -0.141 | 0.937 | | |
| <i>Pauxi</i> 1-36 | 6 | 6.00 | 0.36 | 0.50 | 0.548 | 0.003 | 5 | 4.97 | 0.39 | 0.72 | 0.451 | 0.003 | | |
| <i>Pauxi</i> 2-30 | 2 | 2.00 | 0.83 | 0.25 | -0.663 | 1.000 | 2 | 2.00 | 0.89 | 0.50 | -0.778 | 1.000 | | |
| <i>Pauxi</i> 3-1 | 4 | 3.97 | 0.21 | 0.51 | 0.186 | 0.184 | 3 | 3.00 | 0.54 | 0.48 | -0.113 | 0.950 | | |
| <i>Pauxi</i> 3-4 | 2 | 2.00 | 0.31 | 0.35 | 0.391 | 0.037 | 3 | 2.34 | 0.45 | 0.47 | 0.049 | 0.315 | | |
| Average | 3 | 3.00 | 0.40 | 0.46 | 0.132 | 0.012 | 2.75 | 2.66 | 0.55 | 0.50 | -0.109 | 1.000 | | |
| SD | 1.51 | 1.51 | 0.21 | 0.16 | - | - | 1.03 | 1.03 | 0.16 | 0.10 | - | - | | |

$P < 0.003$ (Bonferroni)

3.4 Discussion

Our study presents the first evidences for population structuring in the captive population of Red-billed Curassow. Bayesian clustering analyses revealed that the animals from the four major breeding facilities are clustered into two clearly distinct lineages. One lineage (cluster 1) is composed by animals from CH and PC, and the other is represented by animals from CB (cluster 2), while TR has animals assigned to both lineages.

The observed structuring may reflect the founding effects occurred during the decade of 1970, when CB and CH were originated independently by a limited number of wild-caught animals. We also cannot exclude the possibility that these aviaries obtained animals from distinct populations that were structured in the wild (see for instance Nsubuga *et al.* 2010), which however, is difficult to test. The difficulties of capturing these animals alive, and the impossibility of collecting large samples in one only locality due to the level of vulnerability of most species, have limited studies on genetic structuring of wild populations of curassows. Besides, the remaining wild populations of Red-billed Curassows are so depauperated and fragmented that today it would be difficult to distinguish between natural structuring and anthropogenic isolation.

Since they were founded, CB and CH managed their lineages separately, except for three individuals clearly identifiable in Structure bar-plots that were translocated from CH to CB during the decade of 1990 (R.A. Azeredo, personal communication), which however, was not enough to homogenize these two highly distinct lineages. The predominance of CH lineage in PC suggests that although this population has been founded by individuals originated from both lineages, only animals from CH lineage have reproduced, while in TR animals with admixed ancestry were produced successfully. Although PC and TR were not founded by wild-caught animals, they proved to be important demographic and genetic repositories, especially of the CH lineage. It is worthy to note that we have not analyzed the total population of captive Red-billed Curassows. Four further individuals confiscated from illegal private aviaries by the governmental surveillance agencies were included in our analyses and they also clustered in one of the two identified lineages. But an unknown number of animals are distributed in small groups specially in Brazilian zoos, and although they are not part of the official breeding plan, we cannot eliminate the chance that some of these animals can belong to lineages other than the ones we have identified here.

Because none of the populations or lineages presented significant levels of inbreeding, they could be maintained as independent management units, but except for CB, the populations are all smaller than 17 animals, and they must be monitored to avoid inbreeding problems in a near future. Although CB lineage concentrates most of the animals, it presented the lower allelic diversity. This is a major conservation concern because in the last three years 128 young were produced in CB lineage, but none was produced in CH lineage. Then, an important recommendation to maintain as much of the genetic variability as possible in the captive population is to increase breeding rates in the CH lineage.

The evidences for two distinct lineages in the captive population of Red-billed Curassow has important implications for breeding and reintroduction. When different lineages are available in captivity, the choice of individuals for reintroduction into the wild can involve i) animals from only one population, ii) animals from a combination of populations, or iii) animals with admixed ancestry (Frankhan *et al.* 2004). When the source of captive individuals and the structure of native populations are known, individuals from one only populations should be used for reintroduction in areas with local adaptations. However, when the habitat has changed, e.g. due to deterioration or fragmentation, a combination of individuals from various populations, or admixed animals with high levels of heterozigosity can increase reintroduction success (Frankhan *et al.* 2004, Robert 2009, Zeisset and Beebee 2013).

Then, we suggest that a combination of individuals from the two lineages, or admixed animals with high levels of heterozigosity should be used in reintroductions for two main reasons: first, because natural structuring and genetic variability of the remaining native populations has probably been lost due to habitat reduction and fragmentation, and second because reintroductions are recommended to occur in protected areas where the species has been locally extinct (IUCN 2009, Robert 2009, Frankham 2010, Frankham *et al.* 2011), and original local adaptations in these areas will never be known. Importantly, the persistence of both natural and reintroduced populations of Red-billed Curassows have relied mostly on the existence of privet conservation units in which their owners have guaranteed efficient surveillance, while in the public areas the extinction of this species is just a matter of time, especially due to poaching. This depicts the vulnerability of the Brazilian Conservation Unities and shows the inefficiency of the current politics of Parks administration. Then, coordinated efforts between breeding facilities, researchers and governmental authorities are urgently needed for the conservation of this and other cracids from the Brazilian Atlantic Forest.

Acknowledgments

We are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2008/51197-0, 2010/08586-6, 2011/06210-1) for financial support, ICMBio for authorizing sample collections, Instituto Ave é Vida, Criadouro Tropicus, Criadouro Científico para fins de Conservação Pontões, and Fundation Crax-Brazil for providing samples and logistical support.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso do Plano de Ação Nacional para a Conservação do Mutum-do-Sudeste depende da interação entre as instituições de Pesquisa, o setor público e o setor privado. Há a necessidade de aumentar o conhecimento científico sobre *Crax blumenbachii*, principalmente de populações naturais, com por exemplo, a realização de estudos de história natural, censos populacionais em outras áreas de ocorrência da espécie e verificar o grau variabilidade e estruturação genética, a fim de analisar a necessidade de suplementação das populações selvagens. Além disso, nota-se que as populações autossustentáveis da espécie estão em áreas privadas de preservação, o que evidencia os problemas do Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), pois as áreas de preservação públicas do estado da Bahia, sofrem com a falta de infra-estrutura e funcionários especializados para realizar a fiscalização dessas unidades. Mas, o elo mais frágil dessa interação são os mantenedores dessa espécie, pois as quatro instituições que estão inseridas no programa de reprodução em cativeiro são particulares. O cenário é preocupante, pois o principal criatório da espécie, Fundação CRAX-Brasil, abrigava até a temporada reprodutiva de 2013/2014 cerca de 200 animais e já apresentava problemas recorrentes devido à superlotação, como demanda por mais recursos financeiros, novos recintos, mais funcionários, e principalmente a necessidade de destinação desses animais a outras instituições, a fim de aumentar o número de criatórios parceiros ao projeto pelo país e não concentrar a população cativa em apenas uma instituição. No entanto, durante esses anos de projeto percebemos o quão complexo é sugerir translocações, pois não há comprometimento por parte do setor público em financiar iniciativas particulares, desestimulando o comprometimento e participação dos criadores neste e em outros programas de conservação.

No caso do projeto de manejo genético da população em cativeiro, esse será estendido por mais dois anos com a inclusão nas análises dos filhotes de pelo menos três temporadas reprodutivas, em que será analisado o número efetivo de casais reprodutores, manutenção da variabilidade genética, endocruzamento, e posteriormente, indicação de indivíduos para as quatro reintroduções previstas no Plano de Ação a serem realizadas em 2017.

5. REFERENCIAS

- Alcaide, M., Negro, J. J., Serrano, D., Antolín J. L., Casado, S. and Pomarol, M. (2010) Captive breeding and reintroduction of the lesser kestrel *Falco naumanni*: a genetic analysis using microsatellites. *Conservation Genetics* 11: 331–338.
- Bachtrog, D., Agis, M., Imhof, M. and Schlötterer, C. (2000) Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs - Evidence from *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1277-1285.
- Bennet, P. M. and Owens, P. F. (1997) Variation in extinction risk among birds: chance or evolutionary predisposition? *Proceedings of the Royal Society B* 264: 401-408.
- Bernardo, C. S. S. (2012) Reintroduction as a conservation tool for threatened Galliformes: the Red-billed Curassow *Crax blumenbachii* case study from Rio de Janeiro state, Brazil. *Journal of Ornithology* 153: S135-S140.
- Bernardo, C. S. S., Cresswell, B., Lloyd, H., Azeredo, R. and Simpson, J. (2011a) Selection of radio transmitter and attachment method for post-release monitoring of captive-bred reintroduced Red-billed Curassow *Crax blumenbachii*, Brazil, *European Journal of Wildlife Research* 57:689–694
- Bernardo, C. S. S., Lloyd, H., Bayly, N. and Galetti, M. (2011b) Modelling post-release survival of reintroduced Red-billed Curassows *Crax blumenbachii*. *The International Journal of Avian Science* 153: 562–572.
- BirdLife International (2015) Species factsheet: *Crax blumenbachii* <http://www.birdlife.org>. Accessed 10 jan 2015
- Brooks, D. M. and Fuller, R. A. (2006) Biology and Conservation of Cracids. In: Brooks, D. M., (ed.) *Conserving Cracids: The most Threatened Family of Birds in the Americas*. Miscellaneous Publications of the Houston Museum of Natural Science, Houston, TX.
- CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2014) *Listas das aves do Brasil*. 11ª Edição, 2014. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- CENIBRA-CRAX (2008) Projeto de reintrodução de aves silvestres na Fazenda Macedônia. Relatório técnico de atividade. 35p.

- Costa, M. C., Camargo, C., Laganaro, N. M., Oliveira-Jr, P. R. R., Davanço, P. V., Azeredo, R. M. A., Simpson, J. G. P., Silveira, L. F. and Francisco, M. R. (2014) A suite of microsatellite markers for genetic management of captive cracids (Aves, Galliformes). *Genetics and Molecular Research* 13:9867-9873.
- del Hoyo, J. and Kirwan, G. M. (2013). Red-billed Curassow (*Crax blumenbachii*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. and de Juana, E. (eds.) (2013) Handbook of the Birds of the World Alive. Lynx Edicions, Barcelona. Disponível em <<http://www.hbw.com/node/53317>>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- Earl, D. A. and Vonholdt, B. M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- el Mousadik, A. and Petit, R. J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832-839.
- Ellegren, H. (2004) Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Faria, C. M. A., Rodrigues, M., Amaral, F. Q., Módena, E. and Fernandes, A. M. (2006) Aves de um fragmento de Mata Atlântica no alto Rio Doce, Minas Gerais: colonização e extinção. *Revista Brasileira de Zoologia* 23 (4): 1217-1230.
- Fernández, J., Clemente, I., Amador, C., Membrillo, A., Azor, P. and Molina, A. (2012) Use of different sources of information for the recovery and genetic management of endangered populations: Example with the extreme case of Iberian pig Dorado strain *Livestock Science* 149: 282–288.
- Frankham R. (2010) Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* 143: 1919–1927.

- Frankham, R. (2008) Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* 17: 325–333.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Eldridge, M. D. B., Lacy, R. C., Ralls, K., Dudash, M. R. and Fenster, C. B. (2011) Predicting the Probability of Outbreeding Depression. *Conservation Biology* 25: 465–475.
- Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. (2004) *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press, UK.
- Frank-Hoeflich, K., Silveira, L. F., Estudillo-López, J., García-Koch, A. M., Ongay-Larios, L. and Piñero, D. (2007) Increased taxon and character sampling reveals novel intergeneric relationships in the Cracidae (Aves: Galliformes). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45: 242-254.
- Galbusera, P., van Dongen, S. and Matthysen, E. (2000) Cross-species amplification microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1: 63-168.
- Glatston, A. R. (1986) Studbooks: the basis of breeding programs. *International Zoo Yearbook* 24:162-167.
- Goldstein, D. B. and Pollock, D. D. (1997) Launching Microsatellite: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *Journal of Heredity* 88: 335-342.
- Goudet, J. Fstat (1995) Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- Grau, E. T., Pereira, S. L., Silveira, L. F., Höfling, E. and Wajntal, A. (2005) Molecular phylogenetics and biogeography of Neotropical piping guans (Aves: Galliformes): *Pipile Bonaparte, 1856* is synonym of *Aburria* Reichenbach, 1853. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 637–645.
- Gregory, S. M. and Quinn, J. S. (2006) Microsatellite isolation from four avian species comparing two isolation techniques. *Molecular Ecology Notes* 6: 87-89.
- Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.

- Hughes, C.R. and Larson, E. D. (2000) Characterization of microsatellite loci developed for the wattled curassow, *Crax globulosa*. *Molecular Ecology* 9: 632:633.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2004) Plano de Ação para a Conservação do Mutum-do-sudeste, (*Crax blumenbachii*). MMA: Brasília, Brasil.
- ICMBio - Instituto Chico Mendes De Conservação Da Biodiversidade (2013) Plano de Ação Nacional para a conservação do Mutum-do-sudeste. Sumário Executivo.
- Ismail, K. (2011) Effects of an exceptional drought on daily activity patterns, reproductive behaviour, and reproductive success of reintroduced Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *Journal of Arid Environments* 75: 125-131.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature (2009) Guidelines for the Re-introduction of Galliformes for Conservation Purposes. Gland, Switzerland: IUCN and Newcastle-upon-Tyne, UK: World Pheasant Association. 86p.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature (2014). *Red List of Threatened Species*. Version 2014.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org> Acesso em: 05 nov 2014.
- Jones, K. L., Glenn, T. C., Lacy, R. C., Pierce, J. R., Unruh, N., Mirande, C. M. and Chavez-Ramirez, F. (2002) Refining the Whooping crane studbook by incorporating microsatellite DNA and leg-banding analyses. *Conservation Biology* 16: 789-7999.
- Keane, A., Brooke, M. L. and McGowan, P. J. K. (2005) Correlates of extinction risk and hunting pressure in gamebirds (Galliformes). *Biological Conservation* 126: 216–233.
- King, S. R. B. and Gurnell, J. (2010). Effects of fly disturbance on the behaviour of a population of reintroduced Przewalski horses (*Equus ferus przewalskii*) in Mongolia. *Applied Animal Behaviour Science* 125 (1-2): 22-29.
- Kruglyak, S., Durrett, R., Schug, M. D. and Aquadro, C. F. (2000) Distribution and abundance of microsatellites in the yeast genome can be explained by a balance between slippage events and point mutations. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1210-1219.
- Küpper, C., Burke, T., Székely, T. and Dawson, D. A. (2008) Enhanced cross-species utility of conserved microsatellite markers in shorebirds. *Genomics* 9.

- Lecis, R., Pierpaoli, M., Birò, S., Szemethy, L., Ragni, B., Vercillo, F. and Randi, E. (2006) Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Molecular Ecology* 15: 119–131.
- Levinson G. and Gutman G. A. (1987) High frequency of short frameshifts in poly-CA/GT tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 15: 5323-5338.
- Li, Y., Korol, A. B., Fahima, T. and Nevo, E. (2004) Microsatellites within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21: 991-1007.
- Mukesh, Fernandes, M., Han, J. and Sathyakumar, S. (2013) Genetics Driven Interventions for Ex Situ Conservation of Red Junglefowl (*Gallus gallus murghi*) Populations in India. *Zoo Biology* 32: 476–483.
- Muñoz, M. C and Kattan, G. H. (2007) Diets of Cracids: How much do we know? *Ornitologia Neotropical* 18: 21–36.
- Neff, B. D. and Gross, M. R. (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55: 1717–1733.
- Nielsen, R. K., Pertoldi, C. and Loeschcke. (2007) Genetic evaluation of the captive breeding program of the Persian wild ass. *Journal of Zoology* 272: 349–357.
- Nsubuga, A. M., Holzman, J., Chemnick, L. G. and Ryder, O. A. (2010) The cryptic genetic structure of the North American captive gorilla population. *Conservation Genetics* 11: 161–172.
- Pereira, S. L. and Baker A. J. (2004) Vicariant speciation of curassows (Aves, Cracidae): a hypothesis based on mitochondrial DNA phylogeny. *The Auk* 121: 682–694.
- Pereira, S. L., Baker, A. J. and Wajntal, A. (2002) Combined nuclear and mitochondrial DNA sequences resolve generic relationships within the Cracidae (Galliformes, Aves). *Systematic Biology* 51: 946–958.
- Piry, S., Luikart, G. and Cornuet, J. M. (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal Heredity* 90: 502–503.

- Primack, R. B. and Rodrigues, E. (2001) *Biologia Da Conservação*. Londrina: Planta.
- Primmer, C. R. and Merilä, J. (2002) A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics* 3: 445-449.
- Primmer, C. R., Moller, A. P. and Ellegren, H. (1996) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Moller, A. P. and Ellegren, H. (1997) Low Frequency of Microsatellite in the Avian Genome. *Genome Research* 7: 471-482.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Ralls, K. and Ballou, J. D. (2004) Genetic status and management of California Condors. *The Condor* 106: 215-228.
- Ralls, K., Ballou, J. D., Rideout, B. A. and Frankham, R. (2000) Genetic management of Chondrodystrophy in California condors. *Animal Conservation* 3: 145-153.
- Ramirez, O., Altet, L., Enseñat, C., Vilà, C., Sanchez, A. and Ruiz, A. (2006) Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics* 7: 861-878.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995) Genepop, Version 1.2: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J. and Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Rice, W. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Robert, A. (2009) Captive breeding genetics and reintroduction success. *Biological Conservation* 142: 2915-2922.
- Russello, M. A. and Amato, G. (2004) Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology* 13: 2829–2840.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a Ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres.
- Schlötterer C. and Tautz D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.
- Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365–371.
- Sedaghatkish, G., Galetti, M. and Denny C. (1999). The importance of *Pipile* as a seed disperser of economically important plants. In: Brooks, D. M., Begazo, A. J. and Olmos F. (eds) *Biology and Conservation of the Piping Guans (Pipile)*. Spec. Publ. CSG, Houston.
- Selkoe, K. A. and Toonen R. J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Shaffer, M. L. (1987). Minimum viable population: Coping with uncertainty. In: Soulé, M. E. (ed.). *Viable Populations Conservation*. New York: Cambridge University Press. p. 69-85.
- Sick, H. (1997). Ordem Galliformes. In: _____. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 270-282.
- Silveira, L. F., Olmos, F. and Long, A. J. (2004) Taxonomy, history, and status of Alagoas Curassow *Mitu mitu* (Linnaeus, 1766), the world's most threatened cracid. *Ararajuba* 12: 125-132.
- Silveira, L. F., Soares, E. S. and Bianchi, C. (2008) Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Galliformes Ameaçados de Extinção (arucuãs, jacus, jacutingas, mutuns e urus). Série Espécies Ameaçadas, nº 6. Brasília: ICMBio, 90 p.
- Sousa, L. M. S., Laganaro, N. M., Camargo, C., Davanço, P. V., Oliveira Jr., P. R. R., Azeredo, R. M. A., Silveira, L. F. & Francisco, M. R. (2013) Microsatellite markers for detecting hybrids between the extinct in the wild Alagoas Curassow (*Pauxi mitu*) and Razor-billed Curassow (*P. tuberosa*) (Aves, Galliformes). *Conservation Genetics Resources* 5: 181-183.

- Srbek-Araujo, A. C., Silveira, L. F. and Chiarello, A. G. (2012). The Red-Billed Curassow (*Crax blumenbachii*): Social Organization, and Daily Activity Patterns. *The Wilson Journal of Ornithology* 124:321–327, 2012.
- Tauz, D. and Schlötter, C. (1994) Simple Sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 832-837.
- Thiollay, J. M. (1994) Structure, density and rarity in an Amazonian rainforest bird community. *Journal of Tropical Ecology* 10: 449-481.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wisely, S. M., McDonald, D. B. and Buskirk, S. W. (2003) Evaluation of the genetic management of the endangered Black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Zoo Biology* 22: 287-298.
- Witzenberger, K. A. and Hochkirch, A. (2011) Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and Conservation* 20: 1843–1861.
- Yang, J. and Jiang, Z. (2011). Genetic diversity, population genetic structure and demographic history of Przewalski's gazelle (*Procapra przewalskii*): implications for conservation. *Conservation Genetics* 12: 1457-1468.
- Zane, L., Bargelloni, L. and Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zeisset, I. and Beebee, T. J. C. (2013) Donor population size rather than local adaptation can be a key determinant of amphibian translocation success. *Animal Conservation* 16: 359-366.