

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS**

SAVANA DIEGUES

**VARIAÇÃO GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO CATIVA DE
MUTUM-DO-SUDESTE (*CRAX BLUMENBACHII* SPIX, 1825) (AVES:
CRACIDAE) COMO SUBSÍDIO PARA MANEJO E CONSERVAÇÃO**



**SÃO CARLOS
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS**

SAVANA DIEGUES

**VARIAÇÃO GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO CATIVA DE
MUTUM-DO-SUDESTE (*CRAX BLUMENBACHII* SPIX, 1825) (AVES:
CRACIDAE) COMO SUBSÍDIO PARA MANEJO E CONSERVAÇÃO**

**Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ecologia e Recursos Naturais do
Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde da Universidade Federal de São
Carlos, como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Ciências com área de concentração em
Ecologia e Recursos Naturais.**

Orientação: Pedro Manoel Galetti Junior

**SÃO CARLOS
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D559vg

Diegues, Savana.

Varição genética de uma população cativa de Mutum-do-Sudeste (*Crax blumenbachii* Spix, 1825) (Aves : Cracidae) como subsídio para manejo e conservação / Savana Diegues. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
65 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Conservação da natureza. 2. Cracídeos. 3. Genética de aves. 4. Parentesco. 5. Microsatélites. 6. Manejo. I. Título.

CDD: 574.5 (20ª)

Savana Diegues

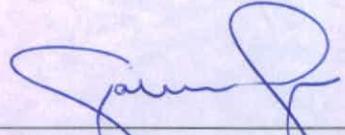
Variação genética de uma população cativa de Mutum-do-Sudeste (*Crax blumenbachii* Spix 1825) (Aves: Cracidae) como subsídio para manejo e conservação

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 06 de maio de 2011

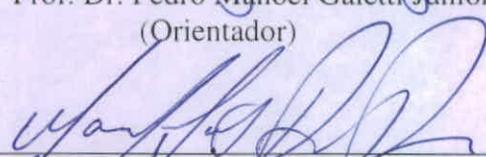
BANCA EXAMINADORA

Presidente



Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior
(Orientador)

1º Examinador



Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Prof. Dr. Luis Fábio Silveira
USP/São Paulo-SP

*À esperança em Clara e Beatriz,
Pequenas porções de luz mesmo em meio às tempestades do dia a dia.*

*Aos meus familiares e amigos,
Em especial a meus pais, Maria de Lourdes e Waldemar,
Responsáveis por tudo que hoje sou...*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha fortaleza e refúgio mesmo quando eu me afasto e tento seguir sem Sua ajuda.

Agradeço a minha Família, pelo amor incondicional, por estar sempre por perto me apoiando e respeitando minhas mudanças de humor e minhas ausências, mesmo sem entender direito o que eu estava passando e fazendo nesse mestrado sei que sempre torceram muito por mim. Vocês são meu porto seguro, sempre. Um agradecimento especial aos meus padrinhos e avós, pela acolhida, amparo, orações e incentivo a todos meus sonhos e também nas minhas decepções e tristezas.

Ao Jorge, parte muito importante da minha vida de uns tempos pra cá, pelo companheirismo, apoio, cuidado, amor e compreensão, sempre.

Agradeço imensamente aos meus Amigos, os de perto e os de longe, os novos e os antigos, os quase irmãos e os colegas também, que me deram incontáveis horas de conversa, colo, abraços, passeios, risadas e conselhos nas muitas vezes que tudo parecia dar errado e comemoraram comigo cada pequena conquista, por mais “genética” que ela fosse. Vocês souberam aguentar meus desabafos e crises, meus desesperos e choros nos grandes desafios desse mestrado, pessoalmente ou não, e isso estará sempre guardado nas minhas melhores lembranças.

A algumas pessoinhas especiais do meu programa de pós-graduação, que acompanharam os problemas e incentivaram minhas conquistas.

Em especial, agradeço às meninas do Laboratório de Biologia Molecular e Conservação (DGE/UFSCar), sem vocês nada disso teria acontecido. Cada conhecimento teórico e prático na rotina diária do lab foi precioso e todos só merecem meu reconhecimento e gratidão. Pela paciência, colaboração e amizade em todos os momentos.

Ao prof. Mercival Roberto Francisco, pelas coletas e conversas, ideias e auxílio em diferentes fases do projeto.

Agradeço ao meu orientador, prof. Pedro Galetti Jr e a profa. Patrícia Freitas, pela oportunidade de realização deste trabalho e pelo apoio diante de tantos desafios enfrentados.

A CAPES e REUNI pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é apenas curiosidade;
outras, para alcançarem fama, e isso é apenas vaidade;
outras ainda, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe;
outras, para serem edificadas, e isso é prudência;
mas há outras que desejam saber para edificar os outros,
e isso é amor.”

São Tomás de Aquino

RESUMO

A conservação da biodiversidade é necessária para a manutenção dos ecossistemas naturais e suas interações ecológicas. A perda de espécies por ações antrópicas, acentuada nas últimas décadas, deve ser minimizada e a busca pela sua conservação se faz necessária. As espécies da fauna ameaçadas necessitam de esforços para um manejo adequado e a manutenção da diversidade genética é essencial para o sucesso desse manejo. Os cracídeos são um grupo de aves importantes para a manutenção e regeneração dos ecossistemas em que estão inseridos. Sendo assim, subsidiar estudos para a análise da diversidade genética desses animais é de suma importância para um manejo adequado em cativeiro e vida livre. Microsatélites são marcadores moleculares muito utilizados para análises de diversidade genética e possuem vantagens em relação a outros métodos, porém são específicos, sendo necessário isolá-los para cada espécie que se pretende estudar. Deste modo, prospectou-se microsatélites para *Crax blumenbachii*, cracídeo ameaçado, validando-os e subsidiando estudos de sua diversidade genética. Esses marcadores foram utilizados para analisar a variação genética e o grau de parentesco de uma população cativa de mutuns-do-sudeste do Criadouro de Poços de Caldas/MG. Os resultados indicam um número de alelos por loco de dois a quatro, a heterozigosidade esperada variou de 0,35 a 0,70 e a observada variou de 0,41 a 1,0, não havendo diferença significativa entre elas. Baseando-se nos valores de PIC encontrados, nenhum loco é considerado pouco informativo. A P_{ID} , considerando todos os locos, foi de $2,46 \times 10^{-7}$, o que significa que os locos caracterizados em conjunto apresentam um bom poder de resolução na identificação individual. Os quatro locos polimórficos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foi encontrado desequilíbrio de ligação significativo entre nenhum par de locos. Não encontrou-se nenhuma evidência de gargalo populacional recente os resultados do F_{IS} não indicam excesso nem déficit de heterozigotos nos locos analisados, inferindo-se que o manejo e reprodução em cativeiro estão sendo planejados adequadamente. Os marcadores moleculares desenvolvidos neste trabalho mostraram-se uma boa ferramenta para avaliação da variação genética da população cativa da espécie estudada e subsidiam estudos genéticos para maximizar a eficiência do manejo para conservação dos cracídeos em geral. Com os dados de análises de parentesco obtidos foi possível propor casais não relacionados geneticamente para reprodução, o que maximiza a variabilidade genética da população cativa.

Palavras-chave: Cracídeos. Conservação da biodiversidade. Parentesco. Microsatélites. Manejo em cativeiro.

ABSTRACT

The biodiversity conservation is necessary for the natural ecosystems maintenance and their ecological interactions. The loss of species by human actions, which has been accentuated over the last decades, must be minimized and the search for its conservation is necessary. The endangered species of fauna require efforts for a proper management and the maintenance of genetic diversity is essential to the management success. The Cracid birds are an important group to the maintenance and regeneration of the ecosystems where they live. Thus, support studies to analyze the genetic diversity of these animals are critical for an appropriate management in captivity and wild life. Microsatellites are molecular markers for genetic diversity analyzes widely used and they have advantages over other methods, however, they are specific and they need to be isolated for each species in research. Therefore, microsatellites were prospected to *Crax blumenbachii*, an endangered type of cracid, validating them and supplying researches for their genetic diversity in search of biodiversity conservation. These markers have been used to analyze the genetic variation and the kinship degree of a captivity population of southeastern curassows from Poços de Caldas/MG breeding site. The results show a number of alleles per locus from two to four, the expected heterozygosity ranged from 0.35 to 0.70 and the observed one ranged from 0.41 to 1.0, which do not have a significant difference. Based on the found PIC values none locus is considered uninformative. The P_{ID} , considering all the loci, was 2.46×10^{-7} which means that the loci, characterized together, present a good resolution to individual identification. All the polymorphic loci were in Hardy-Weinberg equilibrium and it was not found significant linkage disequilibrium among any loci pair. It was found no evidence of a recent population bottleneck. The F_{IS} results do not indicate neither excess nor heterozygote deficit at the analyzed loci, implying that the captive management and breeding are being planned properly. With the obtained data from the kinship analyzes it was possible proposing not related couples to reproduction which would maximize the captive population's genetic variability. The developed molecular markers in this research proved to be a good tool for genetic variation assessing of the captive population of the studied species and they supply genetic researches to maximize the management efficiency for cracid birds' conservation.

Keywords: Cracid birds. Biodiversity conservation. Kinship. Microsatellites. Management in captivity.

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Relação de todos os microssatélites prospectados: nomenclatura e <i>motifs</i>	40
TABELA 02. <i>Primers Forward</i> e <i>Reverse</i> desenhados para os microssatélites prospectados.....	41
TABELA 03. Relação dos microssatélites prospectados e amplificados com sucesso: nomenclatura, <i>motifs</i> e composição.....	42
TABELA 04. Caracterização dos microssatélites prospectados e amplificados com sucesso: <i>Primers Forward</i> e <i>Reverse</i> ; temperatura de anelamento; tamanho do fragmento (pb); número de alelos; heterozigosidade observada; heterozigosidade esperada; teste de significância em relação a desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	42
TABELA 05. <i>Polymorphism Information Content</i> (PIC) e Probabilidade de Identidade (P_{ID}) para os locos de microssatélites polimórficos de <i>Crax blumenbachii</i>	44
TABELA 06. Coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) e P-smaller.....	45
TABELA 07. Valores de probabilidade de exclusão (PE) encontrados por locos na população cativa analisada.....	46
TABELA 08. Casais propostos para reprodução no Criadouro Poços de Caldas, baseados nos programas ML Relate, Kingroup e GenAEx.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Conservação da Biodiversidade	10
1.2. Parentesco, Soltura e Reintrodução	12
1.3. Genética da conservação	14
1.4. Marcadores moleculares.....	15
1.5. Família Cracidae.....	18
1.6. <i>Crax blumenbachii</i>	22
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Extração, quantificação e diluição do DNA	35
3.2. Prospecção de microssatélites	35
3.3. Análise dos dados	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A - Protocolo de Extração de DNA com Fenol: clorofórmio: álcool isoamílico em <i>eppendorf</i>	58
ANEXO B - Protocolo de Schuelke.	64
ANEXO C - Protocolo de reações de PCR.....	65
APÊNDICE A - Tabela comparativa de valores de r obtidos pelos programas ML Relate, Kingroup e Genalex.	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conservação da Biodiversidade

Diversidade Biológica significa a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas (BRASIL, 2000).

Existem divergências sobre qual dos níveis (genes, espécies ou ecossistemas) deve ser priorizado nos planos de manejo, mas está claro que, para que a conservação da biodiversidade tenha êxito, os três níveis precisam ser preservados (BOWEN, 1999). Para Luck *et al.* (2003), o nível da biodiversidade definido pelas “populações locais geneticamente distintas” é considerado o mais importante e sobre o qual deve-se concentrar os maiores esforços de conservação.

A diversidade genética é encontrada no menor nível hierárquico da biodiversidade, o que aumenta a sua importância uma vez que todos os outros níveis são direta ou indiretamente influenciados por ela. É ela que possibilita às populações flexibilidade para evoluir e se adaptar às contínuas mudanças ambientais (TEMPLETON *et al.*, 2001; BEGON *et al.*, 2006). Portanto, a diversidade genética tem papel importante na conservação de espécies ameaçadas e na manutenção de suas populações ao longo do tempo, pois espécies com baixa variação genética têm geralmente uma redução na habilidade de sobreviver a mudanças ambientais durante o seu processo evolutivo (FRANKHAM, 1995).

A população humana cresce continuamente e, com isso, também o impacto previsto sobre a vida selvagem. As taxas de extinção deverão acelerar marcadamente, por até mil vezes ou mais que a taxa normal deduzida pelos registros fósseis (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A destruição e fragmentação de habitats, bem como a poluição, são fatores que mais vêm ameaçando a biodiversidade. Geralmente esses fatores levam à diminuição do tamanho efetivo das populações, tornando-as mais suscetíveis às catástrofes e a efeitos estocásticos ambientais, demográficos e genéticos, incluindo a perda da diversidade genética e o acúmulo de mutações deletérias (FRANKHAM, 1995; FIGUEIREDO, 2008).

Diversas estratégias e esforços estão sendo utilizados para garantir a conservação dessa diversidade biológica. Entre estas estratégias encontra-se a conservação *in situ* e a conservação *ex situ*.

A conservação *in situ* ocorre quando a espécie é mantida em seu habitat natural, como, por exemplo, em Unidades de Conservação da Natureza, e a *ex situ* quando isso ocorre fora dele, em cativeiro, ou seja, com a manutenção de indivíduos em condições artificiais, sob supervisão humana (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

As populações de animais selvagens em cativeiro tornaram-se um importante instrumento para a conservação da biodiversidade (CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS, 2007). Segundo PEREIRA (1996), estratégias de conservação *ex situ* são recomendadas para espécies que não apresentam boas chances de sobrevivência em vida livre ou para aumentar seu número de indivíduos ao longo do tempo.

Várias espécies consideradas extintas na natureza são mantidas em cativeiro e utilizadas em programas de conservação, como o cervídeo *Elaphurus davidianus*, cavalo-de-Przewalski *Equus caballus przewalski*, mutum-de-Alagoas *Mitu mitu*, bisão europeu *Bison bonasus*, oryx árabe *Oryx leucoryx*, furão-de-pés-pretos *Mustela nigripes* e condor-da-Califórnia *Gymnogyps californianus*. O condor-da-Califórnia pôde ser salvo da extinção graças a esforços conjuntos e planejamento, assim como o corvo-havaiano, o furão-de-pés-pretos e outros que agora são objeto de reprodução em cativeiro e programas de reintrodução (RICKLEFS, 2010).

Segundo Hedrick (2001), a depressão por endogamia e carga genética têm sido de grande preocupação quando se trata da extinção espécies e evitar a endogamia tornou-se prioridade nos programas de reprodução em cativeiro, sendo essencial para isso a realização de análises genéticas nos indivíduos cativos.

Pereira (1996) cita que métodos de conservação *ex situ* podem ajudar a preservar as espécies de várias formas:

- a) indivíduos de populações cativas podem ser liberados periodicamente na natureza para manter o número e a variabilidade genética de populações naturais;
- b) pesquisas sobre a biologia da espécie e novas estratégias de reprodução podem ser desenvolvidas e testadas em populações cativas;

- c) a reprodução em cativeiro evita a retirada de mais animais da natureza e
- d) campanhas educacionais podem ser desenvolvidas com o público para mostrar a necessidade de se proteger a espécie e seu habitat natural.

1.2. Parentesco, Soltura e Reintrodução

Pereira (1996) verificou que a literatura científica é relativamente pobre em trabalhos que analisam programas de reintrodução desde a implantação do plantel até o monitoramento intensivo das populações que foram estabelecidas a partir de reintroduções realizadas por intervenção humana, especialmente em relação ao monitoramento genético. Tentativas de reintroduções podem suprir deficiências demográficas, e até mesmo genéticas, desde que elas ocorram em áreas protegidas que tenham uma capacidade de suporte para o estabelecimento de uma nova população ou em uma área que possua uma população pequena, mas que possa ser aumentada (PEREIRA, 1996).

Os responsáveis pelo projeto de soltura devem assegurar-se de que os indivíduos reintroduzidos apresentem as melhores condições possíveis para sobreviver no local escolhido e que os mesmos tenham condições potenciais de adaptação a eventuais modificações no ambiente (FRITZEN, 2008).

Quando populações estão separadas há muito tempo, as diferenças genéticas acumuladas podem ser muito grandes a ponto de que a formação de híbridos entre indivíduos das populações divergentes pode ser prejudicial (FRITZEN, 2008). Sendo assim, análises genéticas dos indivíduos a serem reintroduzidos são essenciais, demonstrando a importância de desenvolvimentos e uso dos marcadores moleculares como ferramentas para tal.

Indivíduos de espécies ameaçadas de extinção são preciosos e não devem servir de “pilotos de teste” em programas de reintrodução que não cumpram os requisitos adequados. Estes exemplares podem ser mantidos e multiplicados em cativeiro enquanto as pesquisas sobre biologia e a escolha dos habitats adequados ainda estão em curso. Os mesmos só devem ser libertados após todas as condições para a reintrodução terem sido observadas (WAJNTAL; SILVEIRA, 2000).

Diante disso, o manejo dos indivíduos cativos deve ser feito de forma adequada, buscando a manutenção das populações a longo prazo. Populações *ex situ* devem ser manejadas para atingir metas objetivas de manutenção de uma variabilidade genética representativa (RUSSELO; AMATO, 2004). Estudos de parentesco, como exclusão de paternidade, geram informações úteis para um manejo efetivo e conservação de populações selvagens e cativas de espécies ameaçadas (FIELD *et al.*, 1998).

Em um contexto ecológico, estratégias de acasalamento em programas de conservação para espécies ameaçadas de extinção, por exemplo, exigem conhecimentos de parentesco em relação aos parceiros em potencial. O parentesco reflete a história comum dos membros da mesma família ou da mesma população, e por isso indica os indivíduos que possuem componentes genéticos semelhantes (WEIR; ANDERSON; HEPLER, 2006).

O grau de parentesco genético (estimativa r) entre dois indivíduos baseia-se na probabilidade de que dois dos seus alelos sejam idênticos por descendência (I.B.D., do inglês *identity-by-descent*). Dois alelos que descenderam a poucas gerações de um mesmo alelo ancestral são denominados “idênticos por descendência” e estas estimativas geram valores de r que podem categorizar as relações de parentesco entre indivíduos. Os valores teóricos médios esperados de r são de 0,5 para irmãos completos, 0,25 para meio-irmãos e 0,0 para indivíduos não-relacionados (RUSSELO; AMATO, 2004; LYNCH; WALSH, 1998).

O manejo de espécies ameaçadas cativas ou reintroduzidas pode utilizar estudos de parentesco e filiação baseados em marcadores moleculares. Quando o objetivo é maximizar a diversidade genética em programas de reprodução em cativeiro, as análises genéticas podem identificar os indivíduos que podem ter prioridade para a reprodução e manejo adequados (AVISE, 2004 *apud* MIÑO *et al.*, 2009).

No geral o melhor marcador para análise de parentesco e relações familiares são os microssatélites, sendo o marcador mais utilizado nos últimos anos (PEMBERTON, 2009; JONES *et al.*, 2010), por características como serem altamente polimórficos, co-dominantes, baseados em PCR e replicáveis. Embora o desenvolvimento de microssatélites seja dispendioso, essa abordagem é viável para a maioria dos organismos.

Para os geneticistas de populações, todas as populações cativas, mesmo as manejadas para conservação da diversidade genética, são consideradas pequenas populações fragmentadas. Assim, pode-se antecipar se o efeito fundador e a deriva genética, como agentes do acaso, podem resultar no aparecimento de doenças genéticas em algumas populações de animais do plantel e dados do *studbook* podem ser usados para obter informações sobre possíveis portadores de locos prejudiciais (RYDER, 2003).

Para Valladares-Padua *et al.* (2003), o aspecto mais dramático da crise ambiental atual é a irreversibilidade da extinção de uma espécie. Como uma espécie é resultado da história evolutiva de seu patrimônio genético em relação a seu ecossistema, sua conservação só faz sentido se inserida no contexto do meio ambiente em que habita, assegurando-se acima de tudo a funcionalidade desse ecossistema. Por isso é importante, além dos conhecimentos ecológicos e genéticos da espécie, buscar outras estratégias como a presença de áreas naturais protegidas implantadas e efetivas e a situação estável e segura da espécie em cativeiro, incluindo a manutenção da máxima variabilidade genética possível.

1.3. Genética da conservação

A Biologia da Conservação se desenvolveu em resposta a atual crise da biodiversidade e tem por objetivo, além de entender como as alterações antrópicas afetam as demais espécies, comunidades e ecossistemas, utilizar esse conhecimento na prevenção da extinção de espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A genética da conservação é uma disciplina do campo da biologia da conservação que tem por objetivo estimar e propor medidas para a manutenção da diversidade genética, além de avaliar os impactos nessa diversidade e as diferentes causas dos mesmos (MEFFE; CARROL, 2006; FIGUEIREDO, 2008).

A diversidade genética é o fundamento para toda a diversidade biológica e a persistência e o potencial evolutivo das espécies depende dela (LAIKRE *et al.*, 2010).

“Genética da conservação é o uso da teoria e técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas e objetiva, a longo prazo, preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptar às mudanças ambientais” (FRANKHAM et al., 2008).

Ela foca as conseqüências que surgem da redução de uma população, onde fatores estocásticos e efeitos da endogamia são extremamente importantes. Também inclui o uso das análises genéticas moleculares para elucidar aspectos da biologia da espécie relevantes para o seu manejo e conservação. Um exemplo é a utilização de amostragem não invasiva para análises genéticas, evitando exagerado esforço de busca ou o *stress* da captura. O material genético pode ser obtido de pêlos, penas, descamações da pele, fezes, entre outros, e depois amplificado, possibilitando que estudos genéticos possam ser realizados de maneira a ser o menos invasivo possível para o indivíduo (FRANKHAM et al., 2008)

A diversidade genética pode ser avaliada pelas diferenças individuais detectadas tanto no fenótipo quanto no genótipo dos indivíduos de uma espécie. O grau de variabilidade genética ao nível molecular é tipicamente descrito através dos níveis de polimorfismo, heterozigosidade e diversidade alélica (FRANKHAM et al., 2008). Considera-se que a variabilidade genética está associada à capacidade de adaptação das espécies ao meio ambiente e, por esse motivo, a manutenção dos níveis de variabilidade genética das populações é um dos focos principais nas estratégias de conservação (FRANKHAM et al., 2002).

Embora interesses ecológicos, forças políticas, econômicas e outras podem ser norteadoras para evitar a extinção de espécies ameaçadas, em relação à persistência a longo prazo, as variáveis genéticas devem ser enfocadas no esforço de conservação. Em particular, a aplicação de novas técnicas moleculares tem tornado viável a realização de análises genéticas em espécies ameaçadas e tornou estas ferramentas amplamente utilizadas em pesquisas de conservação (HEDRICK, 2001).

1.4. Marcadores moleculares

Ferramentas moleculares podem ser úteis como meio para planejar a longo prazo a manutenção da diversidade genética e para esclarecer questões demográficas e ecológicas no início da recuperação de espécies (HAIG, 1998).

Marcadores moleculares neutros são usados frequentemente em estudos de populações naturais para a determinação dos padrões de fluxo gênico, de processos histórico-demográficos (e.g. gargalos e expansões populacionais) e estimativas de variabilidade genética (LOPES,2006)

Os locos de microssatélites, também conhecidos como repetições de seqüências simples (SSR) se caracterizam por subunidades repetitivas justapostas de 1 a 6 pares de bases, geralmente localizados no genoma nuclear. São marcadores não-codificantes em sua grande maioria e normalmente caracterizados por um elevado grau de polimorfismo. Eles são marcadores codominantes de tamanho relativamente pequeno, que podem ser facilmente amplificados por PCR. Embora marcadores microssatélites sejam considerados seletivamente neutros, eles representam muitas vezes polimorfismos funcionalmente relevantes, como contribuir para a estrutura do DNA, a organização da cromatina, regulação da recombinação do DNA, transcrição e tradução, a expressão de genes e a dinâmica do ciclo celular (CHRISTIAKOV *et al.*, 2006).

A maior dificuldade para a utilização de microssatélites em estudos genéticos é a necessidade de prospecção desses locos para cada espécie que se pretende trabalhar (LOPES, 2006). Isso se deve ao fato de que microssatélites são normalmente encontrados em regiões não-codificadoras onde a taxa de substituição de nucleotídeos é maior do que em regiões codificadoras. Sendo assim, a estratégia de concepção de *primers* universais correspondentes às seqüências conservadas, a qual foi muito eficaz para o DNA mitocondrial, é uma tática problemática para microssatélites (ZANE, 2002).

Nos últimos anos, *locos* de microssatélites têm sido utilizados em diferentes tipos de análise, como por exemplo, estudos de parentesco, genética forense, estrutura genética das populações, entre outras. Por serem marcadores altamente variáveis e possuírem uma alta taxa de evolução, os microssatélites possibilitam uma melhor resolução da estrutura genética da população quando comparados aos marcadores nucleares menos polimórficos como as alozimas (HEDRICK, 1999).

Estudos genéticos utilizando microssatélites podem identificar se espécies vulneráveis estão sofrendo alterações em sua estrutura genética, perda de variabilidade, ocorrência de endogamia e ainda suas consequências, como a própria

diminuição de diversidade genética, redução do tamanho efetivo populacional e eventos demográficos que possam afetar a sobrevivência das populações (FAZZA, 2010).

Os microssatélites vêm sendo muito utilizados para responder várias perguntas relacionadas à genética de populações, como análises de fluxo gênico, paternidade e estruturação populacional, que resultam em dados sobre a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, que são essenciais para a adoção de medidas de conservação tanto *ex situ* quanto *in situ* (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

De todas as publicações utilizando ferramentas moleculares em estudos de conservação de 1990 a 2006, as mais significativas com relação à conservação utilizam microssatélites. Há uma tendência de expansão cada vez maior, principalmente pela sua robustez e importância, sendo que um dos limitantes de uso desta ferramenta é o isolamento dos marcadores microssatélites a partir de DNA genômico em bibliotecas enriquecidas, um protocolo custoso (MEDEIROS *et al.*, 2006).

Segundo Vernesi *et al.* (2008), poucos trabalhos usaram seus dados e métodos quantitativos para propor soluções práticas de conservação, o que indica que os biólogos da conservação não estão fazendo pleno uso dos seus dados para um manejo efetivo, buscando a conservação da biodiversidade. Os autores propõem dois objetivos para o desenvolvimento da genética da conservação como uma disciplina madura e indispensável: a aplicação regular e correta das ferramentas mais sofisticadas de análise de conjuntos de dados reais (que exigem uma colaboração conjunta entre biólogos teóricos e de campo) e a utilização eficiente destes resultados para definir estratégias práticas de conservação e influenciar políticas públicas (VERNESI *et al.*, 2008).

Lochran *et al.* (2010) recomendam que os atores da conservação incluam limiares genéticos e demográficos em suas avaliações e reconheçam certa deficiência quando os mesmos não são cumpridos. A importância da compreensão da dinâmica ecológica local e sua interação com a variabilidade genética e persistência da população destaca-se como uma área essencial de futuras investigações e uma abordagem integrada baseada em genética, ecologia e etologia melhoraria as estratégias de conservação da biodiversidade (VERNESI *et al.*, 2008).

1.5. Família Cracidae

Os Cracídeos são um grupo primitivo de Galliformes, originários provavelmente da América Central e sul da América do Norte. Há cerca de 40–50 milhões de anos atrás parece ter vivido uma ave primitiva arbórea – o ancestral mais recente conhecido dos Cracídeos, definido por um fóssil de 50 milhões de anos encontrado em Wyoming/EUA (DEL HOYO, 1994). Além disso, fósseis mais recentes (~30 milhões de anos), similares aos aracuãs atuais, foram encontrados em Dakota do Sul (TORDOFF; MACDONALD, 1957). Fragmentos recentes de fósseis de Cracídeos contemporâneos (e.g. *Crax*, *Penelope*) foram encontrados em sua distribuição atual e foram datados cerca de 20.000 anos atrás (DEL HOYO *et al.*, 1994).

Atualmente, os Cracídeos ocorrem desde o sul do Texas nos Estados Unidos até o norte da Argentina e Uruguai, apresentando distribuição geográfica bem definida. (GRAU, 2008; SICK, 1993)

A distância entre os cracídeos e os outros Galliformes é ilustrada pela sua não hibridização com membros de outras famílias, como é comum em perus e faisões. Eles também constituem a única família largamente arbórea na ordem, sugerindo que, ao contrário do que se imaginava, os Galliformes ancestrais podem ter sido arbóreos e os cracídeos são seus descendentes mais próximos (DEL HOYO *et al.*, 1994).

Os cracídeos habitam principalmente florestas tropicais ou florestas em áreas montanhosas e úmidas, sendo importantes na manutenção dos ecossistemas onde vivem (PEREIRA; WANTJAL, 2001 a).

A importância fundamental desta família reside no seu papel chave na regeneração de florestas tropicais e do seu equilíbrio ecológico, através da dispersão de sementes (como alguns jacus do gênero *Penelope* e jacutingas do gênero *Pipile*) e controle da densidade de plantas através da predação de sementes (como alguns mutuns dos gêneros *Crax* e *Mitu*) (GALETTI *et al.*, 1996; PEREIRA; WANTJAL, 2001 b). Eles também têm uma alta sensibilidade em relação a qualidade de habitat, sendo indicadores importantes na regeneração de habitats e de monitoramento (PEREIRA; WANTJAL, 2001 b).

Segundo Pereira (2000), os cracídeos podem ser distinguidos em três tipos morfológicos: mutuns (*Crax*, *Mitu*, *Nothocrax* e *Pauxi*) da subfamília Cracinae,

jacus e jacutingas (*Aburria*, *Chamaepetes*, *Oreophasis*, *Penelope* e *Penelopina*, e *Pipile*) e aracuãs (*Ortalis*) da subfamília Penelopinae.

Os mutuns representam os maiores indivíduos da família Cracidae (80-90 cm, exceto *Nothocrax*, com 58 cm) e apresentam hábitos mais terrestres que os demais cracídeos. A pélvis é mais alongada e estreita que a dos jacus, os quais são mais arborícolas. Muitas espécies possuem intumescências na cera (ceroma), localizadas na base do bico, as quais podem apresentar coloração azul, vermelha ou amarela, e cristas bem desenvolvidas. Os mutuns vêm ao solo mais freqüentemente do que os jacus, jacutingas e aracuãs (PEREIRA, 2000).

A tendência geral da dieta parece ser mais folhas e menos frutos nas espécies menores, como as chachalacas, e mais frutos e menos folhas nas espécies maiores, como os mutuns (IUCN, 2004). Parece que pequenos animais estão mais inclusos na dieta das espécies menores (e.g. insetos na dieta de *Ortalis*, moluscos na de *Pipile*) do que nos mutuns (IUCN, 2004).

Segundo Cândido Júnior (1996), há preferência de alimentação de *Crax blumenbachii*, *Penelope superciliaris* e *Crax fasciolata* cativos por materiais vegetais macios e de coloração avermelhada, especialmente quando glabros (partes vegetais sem pêlos). Nos estudos realizados não houve interesse por diplópodos e a rejeição de insetos impalatáveis se deu rápida e intensamente (CÂNDIDO JÚNIOR, 1996).

Como são fortemente afetados por perturbações antrópicas e há facilidade de recenseamento de suas populações, os Cracídeos podem ser usados facilmente (junto com outras aves e mamíferos) como indicadores de manejo em parques e áreas de proteção na região Neotropical (STRAHL; GRAJAL, 1991). O monitoramento das populações de cracídeos pode ajudar os gestores de parques e reservas naturais a determinar se os recursos alimentares florestais estão sendo superexplorados (BROOKS; FULLER, 2006).

Os cracídeos tem ainda importância econômica nos países latino-americanos pelo seu consumo por populações locais, sendo de fácil visualização e captura. São fonte de alimentação para indígenas e camponeses, estando presente em quase todos os estudos de caça nos Neotrópicos, representando grande biomassa (IUCN, 2004).

As principais ameaças aos cracídeos, segundo o Plano de Ação da IUCN (2004) são: pressão de caça, destruição de habitat e falta de conhecimento, além de seus predadores. Predadores naturais dos cracídeos incluem felinos, raposas e gaviões de grande porte, que atacam tanto filhotes como adultos. Grandes lagartos predam ovos e filhotes e primatas, quatis, furões e gralhas destroem os ninhos (AZEREDO *et al.*, 2001).

Por serem animais que habitam florestas, a destruição de habitats para uso antrópico é fator de ameaça constante, restando pequenas populações, muitas vezes, apenas em áreas legalmente protegidas, como Unidades de Conservação da Natureza. A combinação da caça excessiva e destruição de habitat têm contribuído muito para o rápido declínio dos Cracídeos nas últimas décadas (IUCN, 2004).

O estudo de Begazo e Bodmer (1998) com populações de cracídeos nativas sujeitas a caça (*Pipile cumanensis*, *Mitu tuberosa*, *Penelope jaquacu* e *Ortalis guttata*) sugere que o impacto dessa atividade em cracídeos pode ser minimizado se a caça ocorre de forma extensiva, se for esporádica e se essas áreas forem cercadas por populações naturais não caçadas. Áreas próximas a vilarejos possuem maior pressão de caça, em contraste com áreas abertas e inabitadas. O constante fluxo de indivíduos entre essas duas situações pode ajudar a sobrevivência das populações, pois a ocorrência de reprodução e imigração sugerem fluxo gênico.

Desde que as espécies de cracídeos tornaram-se raras, o comércio ilegal vem se tornando uma ameaça adicional. A princípio abundante esta família de aves é agora uma das mais ameaçadas do Brasil (AZEREDO *et al.*, 2001).

Dentre as 50 espécies de Cracídeos, 34 necessitam de alguma atenção conservacionista urgente, representando 68% de toda a Família. Destas, deve ser dada uma maior atenção às espécies com prioridade imediata de conservação, sendo elas: *Oreophasis derbianus*, *Mitu mitu*, *Pipile pipile*, *Penelope perspicax*, *Penelope albipennis*, *Crax alberti*, *Crax blumenbachii* (objeto do presente estudo) e *Pauxi pauxi* (IUCN, 2004; PEREIRA; WAJNTAL, 2001).

O Brasil tem o maior número de Cracídeos endêmicos de todos os países Neotropicais. As florestas ao leste e na região central são de interesse especial, onde um bom número de espécies estão em perigo ou altamente ameaçadas (incluindo *Mitu mitu*, *Crax blumenbachii* e *C. fasciolata pinima*), além da

região do Atlântico Sul, onde *Pipile jacutinga* se encontra restrita a populações fragmentadas (IUCN, 2004).

Existem relativamente poucos dados de campo para embasar planos efetivos de manejo de Cracídeos e, comparativamente a outros grupos, pouca pesquisa tem sido feita em populações naturais nas últimas décadas. Há necessidade de pesquisas em relação a questões simples como sistema social básico, padrões espaciais e dieta (praticamente todos assuntos-chave para programas de manejo) (IUCN, 2004). Experimentos que investiguem e documentem a importância de cracídeos na dinâmica de regeneração de florestas (i.e. dispersão e predação de sementes) também são vitais (BROOKS; FULLER, 2006).

Entre as recomendações para conservação dos cracídeos da IUCN (2004), encontra-se:

- pesquisa geral sobre status e distribuição, biologia e ameaças, taxonomia, uso pelo homem e viabilidade do habitat;
- desenvolver projetos de educação ambiental e promoção de recursos alternativos de alimentação;
- criação, implantação e gestão adequada de Unidades de Conservação (identificando áreas prioritárias) e
- melhoria, adequação e aplicação da legislação pertinente, bem como fiscalização eficiente.

Para Brooks e Fuller (2006), se faz necessário proteger o habitat, regulamentar a caça, encorajar o uso sustentável, conduzir programas de divulgação da conservação, incentivar o ecoturismo, além de reintroduzir e translocar espécimes, através de projetos de reintrodução, por exemplo.

Os Cracídeos tem um bom potencial para criação em cativeiro, sendo um ponto positivo para seu manejo e conservação, por exemplo, tornando-os facilmente utilizáveis para reintrodução na natureza (PEREIRA; WAJNTAL, 2001).

São prioritários projetos com a intenção de melhorar as condições da criação *ex situ* de cracídeos e ajudar a aplicar as técnicas desta criação em cativeiro para a conservação. Promove-se assim esforços organizados para a criação e manutenção de linhagens genéticas de espécies ameaçadas em cativeiro por todo o mundo, bem como o desenvolvimento cooperativo de técnicas de reintrodução e translocação de manejo de populações silvestres. O desenvolvimento e manutenção

de um *studbook* internacional de cracídeos cativos, incluindo aqueles em coleções particulares na região Neotropical e outros lugares, também é desejável (IUCN, 2004).

Um dos exemplos de reintrodução de cracídeos é o realizado na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Peti (Santa Bárbara-MG), onde espécies como o *Crax blumenbachii* e *Penelope superciliaris*, entre outras, podem ser visualizadas constantemente, demonstrando o sucesso da reintrodução das mesmas (FARIA *et al.*, 2006).

Um país megadiverso como o Brasil terá sempre muitas oportunidades para pesquisas sobre a biodiversidade, mas devido à urgência da necessidade de ações de conservação, estudos estratégicos devem ser priorizados e implementados o quanto antes. Sendo assim, é essencial aumentar a compreensão acerca de grupos sobre os quais o conhecimento permanece fragmentado, porém crescente (p. ex., vertebrados e vegetação) (BRANDON *et al.*, 2005). Deve-se levar em consideração também as espécies endêmicas e raras, bem como as já ameaçadas de extinção, como muitos cracídeos. Essa estratégia pode facilitar o refinamento das prioridades para proteção do habitat e dimensionar as pesquisas prioritárias.

1.6. *Crax blumenbachii*

O mutum do sudeste (*Crax blumenbachii*) tem um comprimento total que varia entre 80 e 93 cm, pesando de 3 a 3,5 kg. Passa a maior parte do dia no chão, procurando sementes, frutas, folhas, insetos. Empoleiram-se no final da tarde, permanecendo durante a noite nas copas das árvores (MMA/IBAMA, 2004).

É um cracídeo de grande porte, normalmente encontrado em casais e que apresenta dimorfismo sexual de plumagem, além dos machos serem usualmente maiores que as fêmeas (Figura 01). Os machos possuem cabeça, pescoço, peito, dorso, asas e cauda negro brilhante, com o ventre e o crisso brancos.

Apresentam também uma pequena crista negra, formada de penas curvas. A área nua sobre o bico (cere) é vermelha e as fêmeas apresentam a cere negra, embora em alguns exemplares possam ser observados traços de vermelho

nesta estrutura. A região facial é nua e negra em ambos os sexos, mas alguns machos podem apresentar alguns traços de vermelho. A coloração da íris é laranja-avermelhado nas fêmeas, variando entre castanho e marrom escuro nos machos. As fêmeas apresentam um maior grau de polimorfismo de plumagem. A podoteca (pele escamosa que reveste o pé das aves e répteis) é cinza nos machos e avermelhada ou rósea nas fêmeas. A plumagem dos filhotes de cracídeos possui alto grau de polimorfismo. (MMA/IBAMA, 2004; DEL HOYO, 1994; AZEREDO *et al.*, 2001).

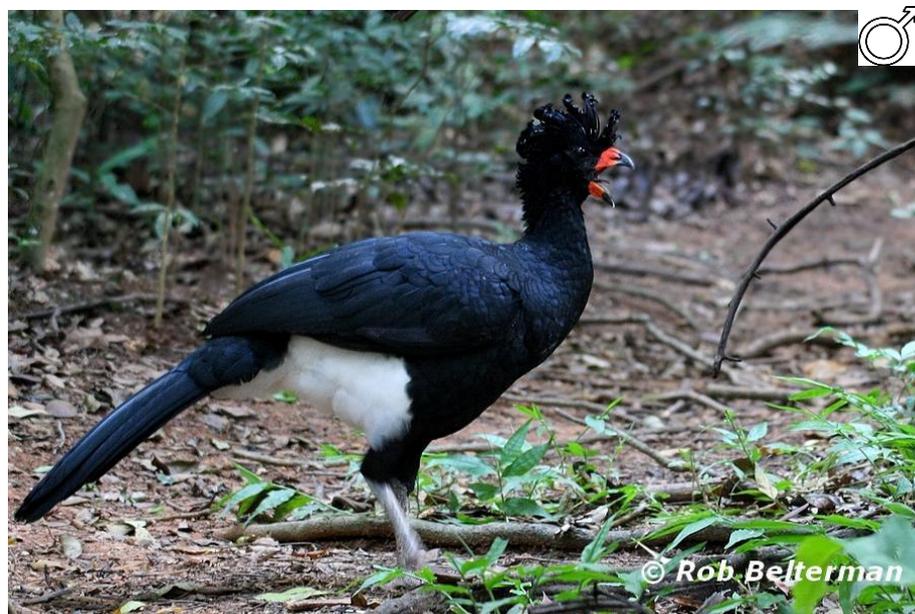




Figura 01: Machos e Fêmeas de Mutum-do-sudeste (*Crax blumenbachii*)

FOTO: *criadouropocosdecaldas.com* e *The Internet Bird Collection- IBC*

As informações disponíveis sobre sua biologia são principalmente provenientes de criação em cativeiro (CANDIDO-JÚNIOR, 1996; AZEREDO 1996; BIANCHI, 2006).

Segundo Azeredo *et al.* (2001), observações em aves de vida livre indicam que as fêmeas se tornam férteis aos 2 ou 3 anos de idade e permanecem até pelo menos 11 anos. O tamanho da ninhada é normalmente de dois filhotes, algumas vezes podendo ser apenas um. Em condições de cativeiro ou semi-liberdade a maturidade sexual é alcançada aproximadamente com 2,5 anos de idade e as fêmeas normalmente se reproduzem por 21 anos. Normalmente dois ovos são colocados, raramente três. A época reprodutiva na sua área de distribuição natural é de setembro a fevereiro. A postura geralmente ocorre no final da tarde, com intervalo de 48h entre os ovos (AZEREDO *et al.*, 2001).

O macho escolhe a árvore e constrói o ninho numa forquilha alta e resistente, usando pequenos ramos e a fêmea incuba os ovos. Sob condições normais de temperatura o período de incubação dura em média 30,5 dias. Na incubação artificial a temperatura deve permanecer entre 37.2°C e 37.8 °C, com umidade entre 55 e 60%. Os ovos devem ser virados a cada 12h (AZEREDO *et al.*, 2001).

Durante a incubação na natureza os ovos logo perdem sua coloração branca inicial e apresentam coloração cor de terra, camuflados entre os pés da fêmea. A fêmea deixa o ninho durante as horas mais quentes do dia, não raramente mais que uma vez por dia, exceto na última semana. Os filhotes podem permanecer com os pais por cerca de oito meses. Apenas uma ninhada ocorre por ano. Em cativeiro, se os ovos são recolhidos e incubados artificialmente, a fêmea pode realizar postura até oito vezes (AZEREDO *et al.*, 2001).

Na natureza os filhotes normalmente saem do ovo no começo da manhã, permanecem cerca de 6h no ninho e pulam para o solo, independente da altura que o ninho possa estar. Dependendo das condições climáticas na área de distribuição, os filhotes não necessitam de aquecimento (nem os filhotes de incubação artificial) (AZEREDO *et al.*, 2001). Quando criados pelos pais, os filhotes imediatamente recebem, através do contato físico, uma proteção de óleo que os mantém secos (eles nascem na estação chuvosa). Quando as penas se desenvolvem, eles adquirem sua própria proteção (AZEREDO *et al.*, 2001).

Filhotes recém-eclodidos sempre andam embaixo das caudas dos pais, abertas para tal propósito. Os pais alimentam os filhotes, ensinando-os como e o que comer. Folhas e insetos são a comida básica no início da vida. Em cativeiro, a comida para as aves de todas as idades pode ser similar a alimentação de faisões, suplementada com folhas, frutas e tubérculos. Na época reprodutiva, o nível de proteína deve ser aumentado de 10% a 20% para os casais adultos (AZEREDO *et al.*, 2001).

O mutum-do-sudeste (*Crax blumenbachii*) podia ser encontrado no passado restrito a uma pequena área de Floresta Atlântica brasileira, nos estados do Espírito Santo, Bahia, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A distribuição histórica é na floresta abaixo de 500 metros de altitude no sul da Bahia em direção de Rio de Janeiro e leste de Minas Gerais. Os europeus colonizaram a região cedo e a pressão de caça e, posteriormente, a destruição do habitat, levaram a espécie à beira da extinção quando, em 1970, Helmut Sick descobriu uma população a cerca de 60 km ao norte de Linhares, Espírito Santo, perto do que é agora a Reserva de Sooretama (GOCHFELD; KEITH, 1977). Estas florestas remanescentes localizadas a baixas altitudes foram dramaticamente reduzidas nos últimos 100 anos, especialmente durante o grande ciclo de desmatamento ocorrido no norte do

Espírito Santo nas décadas de 1960-70, e no sul da Bahia a partir da década de 1980 (IBAMA/MMA, 2004).

Os registros recentes e confiáveis de populações naturais do mutum-do-sudeste estão restritos a apenas nove localidades, a saber: Ituberá, Parque Estadual da Serra do Conduru, Parques Nacionais do Descobrimento, Monte Pascoal e do Pau Brasil, Reserva Biológica de UNA, Serra das Lontras (Bahia), Reserva Biológica de Sooretama e Reserva Natural do Vale do Rio Doce (Espírito Santo). Além disso, três populações foram reintroduzidas em Minas Gerais. A estimativa populacional *in situ* disponível é de menos de 250 indivíduos na natureza, em populações pequenas e severamente fragmentadas (SAVE BRASIL, 2011; LIMA *et al.*, 2008; IBAMA/MMA, 2004).

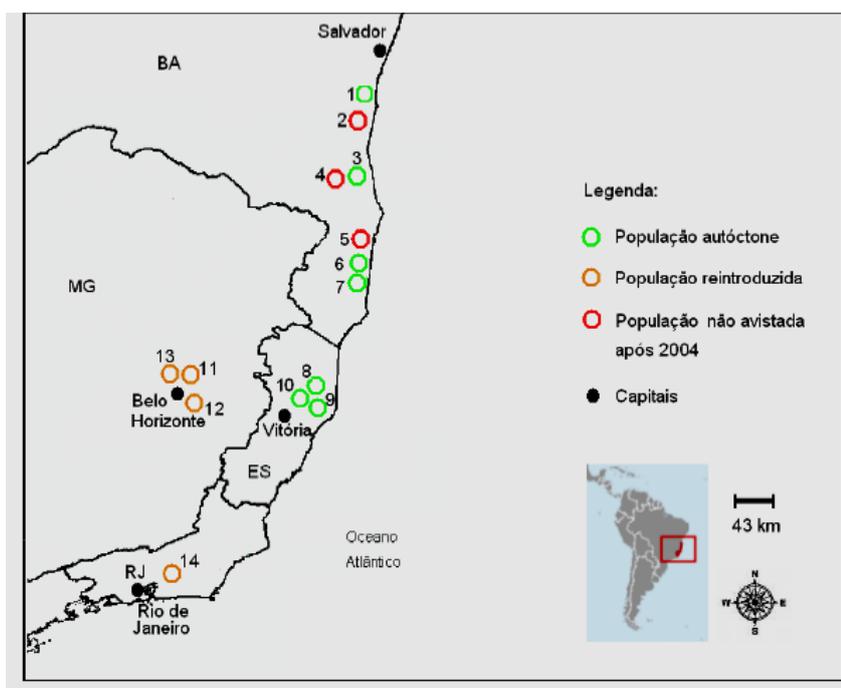


Figura 2: Populações de mutuns-do-sudeste (extraído de Bernardo, 2010):

- 1- Fazenda Michelin, 2- Serra do Conduru, 3- Reserva Biológica de Una, 4- Serra das Lontras, 5- Parque Nacional Pau-Brasil, 6- Parque Nacional Monte Pascoal, 7- Parque Nacional do Descobrimento, 8- Reserva Biológica Sooretama, 9- Reserva Natural Vale, 10- Fazenda Cupido, 11- Reserva dos Fechos, 12- RPPN Fazenda Macedônia, 13- Estação Ambiental de Peti, 14- Reserva Ecológica de Guapiçu.

Para aumentar esse número populacional existem várias estratégias a serem consideradas. De acordo com Pereira (1996), a possibilidade de expandir os limites do Parque Nacional na Bahia precisa ser avaliada, assim como estimular o

estabelecimento de reservas particulares, incluindo remanescentes de floresta dentro da área de distribuição de *Crax blumenbachii*. É essencial ter proteção eficiente em todas as reservas dentro da área de distribuição de *Crax blumenbachii* (especialmente na Reserva Biológica do Una, e Parques Nacionais Pau Brasil e Descobrimento), estabelecendo infra-estrutura de reserva, guardas, regularização de posse de terra e remoção de ocupantes humanos.

O conhecimento científico adequado é um dos pilares de projetos de conservação bem sucedidos. Ainda há grandes lacunas no conhecimento sobre a distribuição geográfica, status de populações e história natural da espécie. Estas lacunas devem ser preenchidas para que estratégias de manejo mais adequadas sejam determinadas (MMA/IBAMA, 2004).

A perda de habitat e a caça são as ameaças principais à espécie (SAVE BRASIL, 2011; IBAMA/MMA, 2004). A degradação dos remanescentes florestais por incêndios, efeito de borda, fragmentação e outros impactos antrópicos é considerado um impacto significativo, bem como a caça, tanto por lazer como de subsistência. O reconhecimento das ameaças reais é a base para a proteção legal das espécies (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A Instrução Normativa nº 03 de 27 de maio de 2003 do Ministério do Meio Ambiente lista *Crax blumenbachii* como uma das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção sem, no entanto, indicar uma categoria. Este é o marco legal que designa a espécie como ameaçada no Brasil. Na lista das espécies ameaçadas da IUCN, a espécie aparece como ameaçada, com população em declínio, sendo que em 1994 estava na categoria “criticamente ameaçada” (IUCN, 2011). Esta classificação atual reflete graus de risco de extinção (criticamente em perigo, em perigo, vulnerável e baixo risco) que são definidos em termos de taxas de declínio no tamanho populacional atual, restrições de habitats e/ou a probabilidade de extinção prevista quantitativamente (FRANKHAM *et al.* 2008). Embora existam muitos outros sistemas para categorizar o grau de ameaça que são utilizados por alguns países e estados em particular, a IUCN proporciona o único sistema internacional e é a base para elaboração da lista de espécies apresentada no Livro vermelho das Espécies Ameaçadas da IUCN, referência mundial no assunto.

Ações voltadas para a conservação do habitat de *Crax blumenbachii* terão impactos positivos não apenas para os mutuns, mas também para outras

espécies que compartilham seu habitat, muitas das quais não despertam o mesmo interesse. Isto resulta na possibilidade de uso de *Crax blumenbachii* como uma espécie-bandeira para catalisar ações de conservação que beneficiem a fauna da chamada “Hiléia Baiana” e das florestas associadas (IBAMA/MMA, 2004).

Segundo a IUCN, as pesquisas deveriam focar a revisão do status de campo e biologia do mutum-do-sudeste (*Crax blumenbachii*) no leste do Brasil, e desenvolver métodos de reintrodução e manejo genético de populações cativas e silvestres, como realizado pela Fundação CRAX (Stichting Crax) (IUCN, 2004)

A criação em cativeiro do mutum-do-sudeste tem sido desenvolvida especialmente na Fundação CRAX, uma instituição para a conservação de cracídeos e outras aves, no estado de Minas Gerais. O programa de conservação deste mutum na CRAX começou em 1975, com a observação *in situ* no município de Teixeira de Freitas, Bahia. Em 1978 e 1979 dois casais foram capturados na natureza e trazidos para o cativeiro. Outros quatro indivíduos diferentes somaram-se ao plantel entre 1979 e 1985. Cerca de 400 mutuns-do-sudeste nasceram em cativeiro na CRAX durante os últimos 20 anos, todos descendentes destas oito aves originais, o que implica necessidade de estudos que envolvam a genética da população. Na década de 90, 60 casais foram soltos no município de Ipatinga, no vale do Rio Doce, em uma reserva reflorestada onde a espécie não havia sido previamente observada. Estas aves representam aproximadamente a nona geração dos oito fundadores originais e aves nascidas em vida livre têm sido observadas desde 1995, indicando o sucesso das solturas (AZEREDO, 1996).

A considerável população cativa e a produtividade obtida por alguns criadores resultaram em disponibilidade de um grande número de *Crax blumenbachii* para fins de reintrodução. A população cativa encontra-se plenamente estabelecida e conta com um efetivo populacional importante. No entanto, nem todos os mantenedores da espécie manejam seu plantel de forma integrada a fim de que não haja perda de linhagens genéticas. Como a maioria da população cativa está em mantenedores privados, há uma demanda de infraestrutura e recursos materiais e humanos para manter seus plantéis, realizar pesquisas e colaborar com os programas de conservação. A questão da segurança dos plantéis mantidos por estes mantenedores também é importante (IBAMA/MMA, 2004).

Uma das prioridades é realizar a análise genética dos fundadores dos plantéis cativos, visando definir as linhagens genéticas e orientar pareamentos para manter e aumentar a diversidade genética das populações cativas através do *studbook* (MMA/IBAMA, 2004).

O *studbook* é a ferramenta mais importante, cientificamente, na gestão de populações *ex situ* de animais selvagens, buscando garantir tamanho suficiente, estabilidade demográfica e alto nível de diversidade genética. São nos *studbooks* onde todos os dados relevantes para a população em cativeiro de certas espécies são coletados e continuamente atualizados (WAZA, 2011).

Os *studbooks* contem o número de registo de cada animal da espécie em cativeiro, seu sexo e data de nascimento, identidade (número de registo) de seus pais, onde nasceu e para onde (e quando) o indivíduo foi transferido, informações de propriedade, como o próprio nome da instituição e seus identificadores (tais como transponders, tatuagens e marcas). Outras informações importantes para o manejo da espécie também devem estar incluídas, como dados ou características comportamentais que afetem a sua capacidade de ser incorporado a programas de melhoramento ou soltura, e também, se já morto, as causas da morte (WAZA, 2011).

O *studbook* de *Crax blumenbachii* tem como *studbook keeper* Roberto De Motta Avelar Azeredo, da CRAX Sociedade de Pesquisa, em Contagem MG. O total de animais vivos registrados em 2008 era de 320 indivíduos. Dentre estes, nove indivíduos foram nascidos naquele ano e aproximadamente 16 morreram naquele mesmo ano. Os dados disponíveis até 2009 no ISIS/WAZA *studbook library* é de 1061 animais no total (INTERNACIONAL, 2010).

Segundo dados do IBAMA mais de 90% da população cativa da espécie é mantida no Brasil, principalmente em criadores particulares, com uma pequena parcela em zoológicos. O *studbook* internacional aponta como fundadores um grupo de apenas oito aves. Um total de 164 indivíduos (85 machos e 79 fêmeas) foram reintroduzidos (IBAMA/MMA, 2004).

A reintrodução pode ser realizada com sucesso e é a ferramenta mais indicada para aumentar o número de populações da espécie em vida livre (MMA/IBAMA, 2004).

O Projeto de Conservação de *Crax blumenbachii* da Fundação CRAX, descrito por Azeredo (2001), relata que a primeira incubação em cativeiro ocorreu em 1981 e, desde então, cerca de 1000 nascimentos foram registrados. Estes dados confirmam o sucesso das técnicas para manejo e reprodução compiladas pela Fundação para desenvolver uma metodologia básica para o Programa Integrado de Conservação de Espécies Selvagens, o qual segue os seguintes estágios:

- Definição das espécies a serem estudadas;
- Aquisição de casais reprodutores ou grupos;
- Desenvolvimento de técnicas de manejo e reprodução em cativeiro;
- Multiplicação do número de indivíduos em cativeiro;
- Identificação de reservas naturais para reintrodução das espécies;
- Reintrodução e distribuição selecionada;
- Monitoramento pós-soltura e
- Promoção de educação ambiental e cooperação científica.

Em 1991 a Fundação CRAX considerou-se apta a reintroduzir a espécie de volta na natureza, seguindo o Projeto de Conservação (AZEREDO *et al.*, 2001).

“Em 9 de janeiro de 1991, depois de 8,5 meses de período de adaptação em um aviário de 20m de comprimento, 14m de largura e 13 m de altura, construído dentro da floresta em uma área escolhida dentro da Fazenda Macedônia com a participação de autoridades ambientais, 15 casais da espécie, com cerca de 1,5 anos de idade foram soltos. Em 17 de fevereiro de 1993, para alcançar o objetivo e repor as 7 mortes, 21 machos e 16 fêmeas foram soltos, com idade média de 2 anos. A Fundação CRAX tem reduzido pouco a pouco a idade de soltura, sempre com bons resultados – as aves mais jovens se adaptam melhor a vida selvagem. Ambas as solturas são amparadas com água e comida estrategicamente distribuídas próximas ao aviário, especialmente nas primeiras semanas, pra fazer uma dispersão tão gradual e segura quanto for possível para as aves. Desde a primeira soltura um programa de monitoramento foi iniciado, continuando até hoje em dia. Pelo menos 26 aves (15 machos e 11 fêmeas) nasceram e indivíduos da terceira geração já estão presentes no grupo, o que representa uma taxa favorável com recompensa a iniciativa desenvolvida.” (AZEREDO *et al.*, 2001)

O *Crax blumenbachii* foi a primeira, entre as 50 espécies ameaçadas estudadas pela CRAX, para a qual todos os estágios da metodologia foram completados, através do Projeto Mutum.

Este projeto é desenvolvido na Fazenda Macedônia desde 1990, sendo pioneiro na reintrodução de aves silvestres ameaçadas de extinção. Desde a implantação já possibilitou a soltura do Mutum-do-sudeste (*Crax blumembachii*), do

Macuco (*Tinamus solitarius*), da Capoeira (*Odontophorus capueira*), do Jaó (*Crypturellus n. noctivagus*), do Inhambuaçu (*Crypturellus obsoletus*), do Jacuaçu (*Penelope obscura*) e da Jacutinga (*Pipile jacutinga*).

A área de florestas nativas da Fazenda Macedônia é um dos principais remanescentes de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais, sendo que parte dela (560 ha.) é reconhecida pelo IBAMA como Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN), por meio da portaria Nº 111, de 14 de outubro de 1994.

Segundo o mesmo autor, um trabalho adicional do centro de pesquisas da Fundação CRAX inclui seleção de casais reprodutivos ou grupos de diferentes linhagens genéticas, combinando: pesquisa em incubação natural ou artificial dos ovos e criação dos filhotes; identificação dos filhotes com bandos próximos com aproximadamente 60 dias de idade; pré-adaptação em semi-cativeiro em áreas florestais; seleção de indivíduos adequados para reintrodução; testes de saúde; pesos, medidas e monitoramento pós-soltura (CENIBRA, 2010).

Outro projeto de reintrodução de mutuns-do-sudeste foi o realizado por Bernardo (2010) na Reserva Ecológica de Guapiaçu (Cachoeiras de Macacu/RJ), incluindo adaptação dos indivíduos e monitoramento pós-soltura. Programas de reintrodução da espécie, como já citados anteriormente, ocorrem desde a década de 1990, mas até hoje existem poucas informações e dados publicados oficialmente sobre o sucesso ou falha desses projetos. Uma espécie reintroduzida deve ser monitorada, para obtenção de dados relevantes que evidenciem sucesso ou falha do projeto, para melhorar as estratégias futuras de reintrodução.

Entre 2006 e 2008 foram transferidos 53 mutuns-do-sudeste nascidos em cativeiro na Fundação CRAX. Houve probabilidade anual de sobrevivência de 76%. Machos e fêmeas apresentaram probabilidades de sobrevivência semelhantes e constantes. O maior período de vulnerabilidade das aves foi durante os 18 primeiros meses na natureza, devido principalmente a predação por animais silvestres, cães domésticos e caça. Alguns foram localizados até 12 km do local da liberação e com maior frequência próximo a cursos d'água. Algumas recomendações de manejo imediatas incluem a remoção de cães domésticos da área, aumento de fiscalização no entorno da reserva contra caçadores, além de contínua conscientização ambiental das pessoas que moram nas comunidades vizinhas. Estas informações podem ser utilizadas para o planejamento de futuras

liberações de mutuns (BERNARDO, 2010). É importante ainda que se façam análises genéticas dos indivíduos a serem utilizados para futuras solturas.

Azeredo *et al.* (2001) lembra que a metodologia proposta e aplicada pela CRAX pode ser adaptada a outras espécies para minimizar as ameaças de extinção. Assinala ainda que os projetos de reintrodução de animais na natureza, junto com iniciativas públicas ou privadas de reservas naturais e recursos, promovem o conceito de desenvolvimento sustentável, proporcionando condições para que se construa casos clássicos que podem servir como referência para políticas ambientais, científicas e comerciais, entre outras.

Azeredo *et al.* (2001) indica como atuais estratégias primárias de conservação a serem alcançadas: reprodução e estudos em cativeiro, proteção de áreas naturais onde a espécie ainda ocorre, recuperação de áreas onde a espécie existia e reintrodução das aves nessas áreas.

Sendo assim, análises genéticas da população cativa e propostas aplicadas de manejo e reprodução adequados em busca da maior variabilidade genética disponível são essenciais para a conservação desta espécie ameaçada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a variação genética de uma população cativa da espécie de cracídeo ameaçado *Crax blumenbachii*, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites, fornecendo subsídios para manejo adequado *ex situ* e *in situ*, gerando importantes dados e ferramentas práticas para conservação da espécie ameaçada.

2.2. Objetivos específicos

- Prospectar e validar marcadores microssatélites para a espécie *Crax blumenbachii*;
- Analisar a variação genética da população cativa do Criadouro de Poços de Caldas/MG;
- Propor casais geneticamente não-relacionados que sejam mais adequados para reprodução em cativeiro por meio de análise de parentesco;
- Fornecer subsídios para manejo adequado *ex situ* e *in situ*, gerando importantes dados e ferramentas para conservação da espécie ameaçada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Como não havia microssatélites descritos para a espécie *Crax blumenbachii* realizou-se a prospecção e validação dos mesmos para análise genética da população cativa. Dois indivíduos adultos, um macho e uma fêmea, do plantel do Parque Ecológico Dr. Antonio T. Vianna (São Carlos SP) tiveram amostras biológicas coletadas (sangue) em outubro de 2009 e foram armazenadas em álcool 100%, sob refrigeração (-20°C), sendo utilizados para o isolamento e caracterização de microssatélites. Os locos de microssatélites isolados foram validados em uma população cativa de 17 indivíduos (seis machos e onze fêmeas) do Criadouro de Poços de Caldas/MG, objeto deste estudo. As coletas de material biológico (sangue) desses 17 indivíduos ocorreram em outubro de 2010 e os filhotes não foram amostrados. Todos os indivíduos tiveram suas anilhas ou *chips* identificados, bem como o sexo de cada indivíduo.

O criadouro Poços de Caldas, onde se coletou as amostras biológicas para o presente estudo, localiza-se no município de Poços de Caldas/MG. Possui cerca de 4000 aves de 325 diferentes espécies, mantidas em viveiros de alvenaria, recintos abertos e grandes lagos. Em 1980, o fundador adquiriu 13 ha de terra e montou os primeiros viveiros para criar tinamídeos e começou a reproduzir também psitacídeos, muitos deles ameaçados de extinção. Atualmente seu fundador, Moacyr de Carvalho Dias, é considerado pelo IBAMA e pelo Instituto Chico Mendes o maior criador de aves silvestres do Brasil (CRIADOURO POÇOS DE CALDAS, 2010).

Com o passar do tempo, técnicas para melhorar a reprodução e o bem estar das aves cativas foram adotadas, como separação das aves por casal em viveiros menores e com solário. Em agosto de 1999, o criadouro Poços recebeu de um criador, através do IBAMA, dez casais de Mutum de Alagoas, aves descendentes de apenas três espécimes, extintas em seu bioma original. Hoje o local possui perto de 80 destes mutuns, alvo de vários estudos e convênios com universidades e com o Instituto Chico Mendes, colaborando com a conservação dos cracídeos (CRIADOURO POÇOS DE CALDAS, 2010).

Segundo o site do Criadouro, outra característica importante é o enfoque cultural e educativo, pois mantém um banco de dados constante das atividades realizadas, contribuindo com a manutenção de diversas espécies.

3.1. Extração, quantificação e diluição do DNA

Realizou-se a extração do DNA total das amostras biológicas pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, modificado de Sambrook *et al.* (1989), incluindo fase de digestão, precipitação e lavagem (ANEXO 1).

Quantificou-se o DNA total em gel de agarose (1%) aplicando o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder TM (Invitrogen Life Technologies), analisando o DNA no trans-iluminador de luz UV e quantificando em comparação com as bandas do Low DNA Mass Ladder.

O DNA foi armazenado em estoque e também diluído em soluções para uso com aproximadamente 50ng DNA/ μ l.

3.2. Prospecção de microssatélites

Iniciou-se a prospecção de locos de microssatélites com a construção de uma biblioteca genômica parcial enriquecida, de acordo com o protocolo modificado de Hamilton *et al.* (1999). Tal protocolo inicia-se com a clivagem dos fragmentos de DNA (com concentração de 200 ng/ μ l) com a enzima *Rsa I*. Em seguida, realizou-se a purificação e eluição do DNA clivado, isolando os fragmentos de DNA com tamanhos entre 300 e 1000pb com o “GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). Fez-se então a ligação do DNA eluído a oligonucleotídeos dupla-fita de sequências conhecidas (*linkers*) SuperSNX24 e SuperSNX24+4p e verificou-se a eficiência da ligação. A hibridização dos fragmentos de DNA replicados às sondas de oligonucleotídeos biotinizados (AAAC)₆, (AAAG)₆, (AATC)₆, (AATG)₆, (ACCT)₆, (ACAG)₆, (ACTC)₆ e (AATC)₆ ocorreu via PCR e em seguida fez-se lavagens em solução com partículas magnéticas ligadas a estreptavidina, a qual se liga a biotina e captura dos fragmentos de DNA hibridizados com ajuda de uma estante magnética. A amplificação dos fragmentos de DNA já enriquecidos ocorreu via PCR.

O processo de clonagem iniciou-se com a ligação do DNA enriquecido a vetores utilizando o *kit pGem-T Easy Vector* (Promega). O vetor recombinante (contendo o DNA enriquecido) foi inserido, por choque térmico, em células

competentes da linhagem DH5 α de *Escherichia coli*, as quais foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina, X-Gal e IPTG.

Após o crescimento das colônias de bactérias, os clones positivos foram selecionados e replaqueados em meio CG líquido com ampicilina. Os plasmídeos recombinados, contendo os fragmentos clonados, foram extraídos e enviados para sequenciamento. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI3730XL pela empresa Macrogen Inc (Coréia do Sul) e a qualidade do seqüenciamento foi verificada visualizando-se os eletroferogramas pelo software BIOEDIT (HALL, 1999).

Utilizou-se em seguida o programa CID (FREITAS *et al.* 2008) para encontrar regiões de microssatélites nas 96 seqüências. Num primeiro momento nenhuma seqüência apresentou SSRs, utilizando-se os parâmetros-padrão de exigência do software. Houve então uma mudança de parâmetros para adequação, com uma menor exigência para identificação de SSRs e construção dos *primers*. A seleção de 15 seqüências com microssatélites e a identificação das regiões flangeadoras adequadas para construção dos *primers* foi feita através do programa VECSCREEN (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), CID e GENNE RUNNER, (disponível em <http://www.generunner.net/>).

Finalizou-se a síntese dos pares de *primers* com a adição de uma cauda M13 de 18pb (5'- TGTAACGACGGCCAGT – 3') na porção 5' de um dos *primers*, possibilitando a realização da genotipagem dos locos utilizando o protocolo propôsto por Schuelke (2000), tornando o processo mais econômico (ANEXO 2).

Foram feitas reações de amplificação via PCR, seguindo o protocolo descrito no ANEXO 3.

Para a avaliação de polimorfismo, os locos amplificados com fluorescência foram enviados para genotipagem em sequenciador automático MegaBace na empresa DNA Consult (São Carlos, SP) e analisados no programa MEGABACE™ FRAGMENT PROFILER (GE Healthcare Life Science).

3.3. Análise dos dados

Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o desequilíbrio de ligação e as frequências alélicas foram estimados utilizando o software GENEPOP, bem como o número de heterozigotos e homozigotos esperado e observado (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Calculou-se, com base nestes dados, a heterozigosidade esperada e observada. Com os dados do software FSTAT obteve-se o valor do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) (GOUDET, 1995). A correção sequencial de Bonferroni foi utilizada para corrigir os intervalos de significância.

Com o uso do programa BOTTLENECK (PIRY *et al.*, 1999) verificou-se a possibilidade de existência de gargalos populacionais recentes. Foi utilizado o teste de Wilcoxon, que pode ser utilizado para menos de 20 locos e possui alto poder estatístico. O modelo de mutação escolhido foi o TP (Two-Phase), estabelecido com 25% para o modelo IA (Infinity Alleles) e 75% para o SM (Stepwise Mutation), segundo a distribuição da frequência alélica por loco. A variância considerada foi igual a 12, conforme indicado para microssatélites pelo artigo que descreve o programa.

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi estimado por meio do programa LDNe (WAPLES; DO, 2008).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC – Polymorphism Information Content) foi calculado com o programa CERVUS 3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998). Os locos foram classificados de acordo com os valores obtidos em: pouco informativos (até 0,25), razoavelmente informativos (de 0,25 a 0,5) e altamente informativos (acima de 0,5) (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

O programa GIMLET (VALIÈRE, 2002) foi utilizado para o cálculo da Probabilidade de Identidade (P_{id}) e indica a probabilidade de identificar um indivíduo através do seu genótipo multiloco, ou seja, a probabilidade de dois indivíduos apresentarem o mesmo genótipo multiloco ao acaso.

Em relação a análises de parentesco, o programa GENALEX 6 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado para o teste de Probabilidade combinada de Exclusão para todos os locos, não conhecendo nenhum dos pais.

O programa ML RELATE (KALINOWSKI *et al.*, 2006) utiliza simulações e uma abordagem de máxima verossimilhança, baseada em dados genotípicos, para comparar supostas relações de parentesco. Realizou-se análises de parentesco

entre os indivíduos da população do Criadouro Poços de Caldas, categorizando-os como: não relacionados (U), meio-irmãos (HS), irmãos completos (FS) ou pais/filhos (PO). O estimador de máxima verossimilhança, utilizado por este programa e discutido no artigo de Milligan (2003), oferece diversas vantagens em comparação a outros estimadores e por isso foi o escolhido para as análises. Os programas GENALEX e KINGROUP (KONOVALOV; MANNING; HENSHAW, 2004) também foram utilizados e se baseiam em outro estimador, de Queller e Goodnight (1989), tendo seus resultados comparados com os obtidos pelo ML RELATE no APÊNDICE 1.

As categorias de parentesco consideradas e utilizadas para proposição dos casais não-relacionados para reprodução foram as geradas pelo programa ML RELATE e os casais propostos foram definidos após análise destas categorias conjuntamente com os valores estimados de r (grau de parentesco genético) dos três programas, para aumentar a confiabilidade dos resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o isolamento dos locos de microsatélites foram selecionadas e sequenciadas 96 colônias recombinantes. Através da análise das sequências no programa CID inicialmente não se obteve nenhuma região com locos microsatélites. Sendo assim, optou-se por alterar alguns parâmetros do software, como tamanho do par de *primers*, temperatura de anelamento do par de *primers*, porcentagem de GC e salinidade, tornando-os menos restritivos. Obteve-se então 20 regiões com microsatélites, demonstradas na Tabela 01.

Tabela 01: Relação de todos os microsatélites prospectados: nomenclatura dos locos e *motifs*.

Loco	Motif
02	(AGAA) ₆
05	(GGT) ₄
15	(CT) ₄ GTTCCCTG (CACT) ₂
20	(AAACGT) ₃
27	(TC) ₅
51	(CT) ₅
52	(CCTTTT) ₈
55	(GA) ₁₀
56	(TCC) ₃ TGGCGTT (GGCA) ₂
60	(AG) ₅
61	(TGCC) ₂ AACGCC (AGG) ₃
72a	(AAAAAG) ₁₅
72b	(AAAGAG) ₁₇
68	(TC) ₅
75	(TTTG) ₆
78	(TCA) ₄ CCACGTGCCTGCTGCAGTCAGGAG (GAA) ₃
82	(AGC) ₃ (AGCA) ₂ GGCATCAGGCCGACAGGTCTCAGGC (AGCA) ₂
90	(TGCC) ₂ AACGCC (AGG) ₃
96a	(AC) ₅
96b	(AC) ₄ AG (AC) ₃ AGACAG (AC) ₅

A partir disso foi possível a confecção de *primers* para 15 delas com ajuda do software GENE RUNNER, como pode ser visto na Tabela 02. Os *primers*

marcados em destaque em cada loco referem-se aos mais indicados para adição da cauda M13, possibilitando a realização do protocolo de Schuelke (2000).

Tabela 02: *Primers Forward e Reverse* desenhados para os microssatélites prospectados.

Loco	Primer Foward	Primer Reverse
05	<u>GAACTGCTCCACGAAGAA</u>	GTTGCCACTCCTGAAATG
15	<u>CAGTCCTCTTATCCAGCCTC</u>	CTGGAATGGGTGGTCTGG
20	<u>CAACGCAGGTGGAAAGAA</u>	CTACTTCTCTTCACCTTGCG
27	CTCCCTGTTGGCTCTGTG	<u>CTGCAAACCTTGAGGACGTC</u>
51	CCCAACTCTCACAACGAC	<u>GAGGCAGAAAGCATAACAAC</u>
52	CCCAGAGGACAATATGAAA	<u>CAAGAAAGAAGAAGGAGAAG</u>
55	<u>GTGTAGAAGGAAGGAAGG</u>	CTTTCTCATCCTCCCTCT
56	<u>GCAGAAGCCCAACAGCAG</u>	GGGCAGAGTTGTGGAGATG
60	GGTGGACAAGTGATAGATGG	<u>CTCTGCTCACACTGCTCTG</u>
61	GGCAGAGTTGTGGAGATG	<u>GCAGCAGAAGCCCAAC</u>
68	<u>GTTTCTAAGCAATCCCTC</u>	TTAGGAAGGTGAGGAGAC
75	<u>CCCTGAATCTCTGACCTCT</u>	ACCCAGAAGACCGAAGG
78	GCATTCAGCACTCAGCAG	<u>ACAGCTTTGAACCCACAG</u>
82	<u>CTGTGTGGGAGCGAGGGA</u>	TGCCTGATGCCTGACGATG
96	CCCAACACACACAGACACA	<u>GTGTGTATGGAGTGCTTCAG</u>

Destes pares de *primers* testados, cinco foram amplificados com sucesso. As tentativas para obtenção do sucesso de amplificação via PCR foram realizadas com aumento de MgCl₂, aumento do número de ciclos da PCR, gradientes refinados de temperatura (de 1 em 1 grau, de 46 a 64°), uso de *Taq* de diferentes fabricantes (*Taq* Platinum - Invitrogen, *Taq* Fermentas, *GoTaq*, *GoTaq* Hot Start), aumento do volume da reação (10, 15 e 20ul), aumento da quantidade de DNA utilizado na reação (20, 50 e 100 ng/ul), uso de BSA, uso de M13 sem marcação e também marcado com fluoróforos diferentes (FAM, HEX, TET e NED), separação do ciclo de anelamento do *primer* M13 (verificando a amplificação antes de sua adição), uso de equipamentos diferentes, preparo de novas alíquotas dos *primers*, do DNA extraído, do *primer* M13, de H₂O MilliQ autoclavada e outros reagentes envolvidos.

Foram enviados para genotipagem 17 indivíduos, os quais compreendem a população adulta total cativa desta espécie do Criadouro Poços de Caldas.

Entre os cinco locos prospectados, caracterizados na Tabela 03 e 04, quatro deles são polimórficos, sendo eles P20, P27, P56 e P60. O loco P61 foi considerado monomórfico e descartado das análises. Encontrou-se um total de 15 alelos, sendo que o número de alelos por loco variou de dois a quatro, com uma média de três alelos por loco. A heterozigosidade esperada variou de 0,354 (loco P27) a 0,705 (loco P56). Já a heterozigosidade observada variou de 0,411 (loco P27) a 1,0 (loco P56), como pode ser observado na Tabela 04 e não houve diferença significativa entre elas, após correção de Bonferroni.

Tabela 03: Relação dos microssatélites prospectados e amplificados com sucesso: nomenclatura, *motifs* e composição.

Loco	Motif	Composição
P20	(AAACGT) ₃	hexa
P27	(TC) ₅	di
P56	(TCC) ₃ tggcggt (GGCA) ₂	tri - tetra
P60	(AG) ₅	di
P61	(TGCC) ₂ aacgcc (AGG) ₃	tetra - tri

Tabela 04: Caracterização dos microssatélites prospectados e amplificados com sucesso. Primers *Forward* e *Reverse*; Ta: temperatura de anelamento; Tamanho do fragmento; Na: número de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; P: teste de significância em relação a desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, considerando a correção de Bonferroni (P<0,01).

Loco	Primers	Ta	Tamanho (pb)	N alelos	Ho	He	P (HW)
P20	F: CAACGCAGGTGGAAGAA	46°	163	4	0,60	0,54	0,776
	R: CTAATTCTCTCACCTTGCG						
P27	F: CTCCTGTTGGCTCTGTG	62°	220	3	0,41	0,35	1
	R: CTGCAAACCTTGAGGACGTC						
P56	F: GCAGAAGCCCAACAGCAG	56°	219	4	1,00	0,70	1
	R: GGGCAGAGTTGTGGAGATG						
P60	F: GGTGGACAAGTGATAGATGG	54°	137	2	0,87	0,53	1
	R: CTCTGCTCACACTGCTCTG						

Tem sido observada uma riqueza alélica bastante variável entre as aves. Fazza (2010) encontrou na espécie de arapaçu-liso *Dendrocincla turdina* (Dendrocolaptidae) uma riqueza alélica estimada de 2 a 16. Alcaide *et al.* (2010) comparou a riqueza alélica de populações naturais, cativas e reintroduzidas da ave *Falco naumanni* e encontrou variação não significativa nos valores obtidos, variando entre 4,59 e 5,12.

Em cracídeos, Gonçalves *et al.* (2010) observaram que a riqueza alélica variou de 3,99 a 9,51 para indivíduos de *Crax fasciolata* cativos e de 4 a 9 em indivíduos de vida livre. Já Hughes e Larson (2000) encontraram um número de alelos de 4 a 6, em estudo com 23 indivíduos e seis locos polimórficos para *Crax globulosa*. Os resultados do presente trabalho, com indivíduos cativos de *Crax blumenbachii*, demonstraram uma riqueza alélica de 2 a 4, menor que o observado em *C. fasciolata* e *C. globulosa*, sugerindo uma diferença nos níveis de polimorfismos entre os locos utilizados em ambos os trabalhos.

A diversidade genética é caracterizada pela heterozigosidade observada (H_o), esperada (H_e) e a diversidade alélica. A heterozigosidade esperada neste trabalho com *Crax blumenbachii* variou de 0,35 a 0,70.

Pereira e Wajntal (2001) encontraram uma heterozigosidade média estimada variando de $H= 0,96$ em *Crax blumenbachii* de um criadouro a $H= 0,75$ em um plantel mais endogâmico da mesma espécie. A maior variabilidade foi interpretada como indicativo da origem variável das aves selvagens capturadas presentes no primeiro criadouro do estudo.

Gonçalves *et al.* (2010) em *Crax fasciolata*, utilizando três locos transferidos de *C. globulosa*, demonstraram uma variação de heterozigosidade de 0,54 a 0,82. Já Hughes e Larson (2000) encontraram para *Crax globulosa* uma heterozigosidade média de $H_e=0,71$, variando de 0,66 a 0,78 enquanto Grau *et al.* (2003) por DNA *fingerprint* e *band-sharing coefficient* (BSC) em mutuns-de-alagoas (*Mitu mitu*) obtiveram uma heterozigosidade média de $H= 0,82$ para aves nascidas antes de 1990 e de $H= 0,89$ para as nascidas após essa data, quando houve a inclusão de *Pauxi tuberosa* no programa de reprodução.

É possível que essa aparente redução da variação genética esteja mais relacionada a uma condição da população cativa estudada de *C. blumenbachii* do que a uma característica da espécie. Embora não necessariamente estejam

relacionados, parece haver um paralelo entre um menor valor de riqueza alélica e uma menor heterozigiosidade em *Crax blumenbachii*.

O PIC, calculado pelo software CERVUS, indicou como mais informativo o loco P56, com valor 0,706, seguido por P20 (0,445), P60 (0,367) e P27, com valor 0,313. Com base nesses resultados, pode-se afirmar que nenhum loco é considerado pouco informativo (até 0,25), três são considerados razoavelmente informativos (valores de 0,25 a 0,5) e um é considerado altamente informativo (acima de 0,5). O P_{ID} calculado para cada loco encontra-se na Tabela 05 e o P_{ID} considerando todos os locos foi de $2,46 \times 10^{-7}$, o que significa que os locos caracterizados em conjunto apresentam um bom poder de resolução na identificação individual.

Tabela 05: Polymorphism Information Content (PIC) e Probabilidade de Identidade (P_{ID}) para os quatro locos de microssatélites polimórficos de *Crax blumenbachii*.

Loco	PIC	P_{ID}
P20	0,445	$3,42 \cdot 10^{-2}$
P27	0,313	$1,26 \cdot 10^{-1}$
P56	0,706	$1,25 \cdot 10^{-2}$
P60	0,367	$4,58 \cdot 10^{-3}$
Total / Média	0,457	$2,46 \cdot 10^{-7}$

Todos os locos polimórficos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foi encontrado desequilíbrio de ligação significativo entre nenhum par de locos. Os resultados do F_{IS} , apresentados na Tabela 06, não indicam excesso e nem déficit de heterozigotos nos quatro locos analisados, o que era esperado por não apresentarem desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e sugerem a não ocorrência de efeito de endogamia na população estudada.

Tabela 06: Coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) e P-smaller: valores de p para excesso de heterozigotos, considerando a correção de Bonferroni ($P < 0,0125$).

Loco	F_{IS}	Ps
P27	-0.167	0.4875
P20	-0.105	0.3250
P56	-0.437	0.0250
P60	-0.684	0.0125
All	-0.363	0.0125

Adicionalmente, não foi encontrada nenhuma evidência de gargalo populacional recente pelo software BOTTLENECK, pois os valores obtidos para o teste de Wilcoxon não foram significativos ($P=0,31250$). Assim, a aparente redução da variação genética da população estudada, comparada com a espécie congênere, também não parece associada a um gargalo populacional.

Entretanto, o valor de tamanho efetivo populacional (N_e), calculado pelo software LDNe, encontrou um valor infinito de indivíduos no intervalo de confiança de 99%, sugerindo a necessidade de um número muito elevado de indivíduos para manter a atual diversidade genética encontrada na população, assumindo o modelo de acasalamento ao acaso,

O software BOTTLENECK indica gargalos populacionais recentes, mas que já ocorreram. No caso da população estudada, não houve evidências de gargalo passado, porém, se a mesma está passando atualmente pelo gargalo populacional, isso não é detectado. É possível que o resultado obtido de N_e , o qual evidencia que seria necessário um número infinito de indivíduos para manter a diversidade atual, esteja sugerindo que a variabilidade momentânea pode estar em declínio, por causa do número populacional reduzido e/ou como vem sendo manejada, na escolha de casais para reprodução. Parece, portanto, necessário a escolha de casais com indivíduos geneticamente menos relacionados, buscando a manutenção da variabilidade genética.

As análises de parentesco utilizando-se o teste de Probabilidade combinada de Exclusão para todos os locos, não conhecendo nenhum dos pais, foram realizadas com sucesso. Os resultados por locos encontram-se na Tabela 07.

O valor para os quatro locos combinados foi de 0,87 (ou seja, 87%), valor muito próximo do utilizado em estudos comparáveis com outras espécies de

aves. Miño *et al.* (2009), por exemplo, trabalhando com Ciconiiformes, também utilizaram quatro locos e obtiveram uma probabilidade combinada de exclusão de 90% para as aves cativas e 96% para as de vida livre.

Tabela 07: Valores de probabilidade de exclusão (PE) encontrados por locos na população cativa analisada.

Loco	PE
p20	0,39
p27	0,29
p56	0,59
p60	0,28

Utilizou-se ainda análises de parentesco para proposição de casais não relacionados geneticamente para reprodução no Criadouro. Com os valores de r e as categorias de relacionamento geradas pelo programa ML RELATE, em comparação com os valores gerados pelos programas KINGROUP e GENALEX e informações sobre o sexo dos indivíduos montou-se a Tabela 08, sugerindo a formação de casais não-relacionados para reprodução no cativeiro, em busca da manutenção da maior variabilidade genética disponível. Optou-se por sugerir apenas casais em que os valores e a categoria estivessem em concordância nos três programas utilizados, dando maior confiabilidade ao resultado.

Tabela 08: Casais não relacionados geneticamente, propostos para reprodução no Criadouro Poços de Caldas, baseados nos programas ML Relate, Kingroup e GenAEx.

Sexo	Indivíduo	Identificação	Casal proposto com indivíduos:
Macho	1	microship - p131	15, 16
Fêmea	2	microship - p142	8, 11, 14, 17
Macho	3	anilha CCCPC 2669	9, 15, 16
Fêmea	4	anilha CCCPC 2661	8, 11, 14, 17
Fêmea	5	anilha CCCPC 2718	11, 14, 17
Fêmea	6	anilha CCCPC 1171	8, 11, 14, 17
Fêmea	7	sem anilha	8, 14, 17
Macho	8	anilha CCCPC 2875	2, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 15, 16
Fêmea	9	anilha CCCPC 2579	3, 11, 14
Fêmea	10	anilha CCCPC 1169	8, 14, 17
Macho	11	anilha CCCPC 2886	2, 4, 5, 6, 9
Fêmea	12	anilha CCCPC 2578	8, 17
Fêmea	13	anilha CCCPC 2713	8
Macho	14	anilha CCCPC 2617	2, 4, 5, 6, 7, 9, 10
Fêmea	15	anilha CCCPC 951	1, 3, 8, 17
Fêmea	16	anilha CCCPC 170	1, 3, 8,
Macho	17	anilha CCCPC 168	2, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 15

Analisou-se ainda a importância dos indivíduos para o plantel do Criadouro Poços de Caldas, baseando-se no número de indivíduos não-relacionados geneticamente para cada um, ou seja, indivíduos com maior número de indivíduos não-relacionados são mais representativos para o plantel. Os machos 8 e 17 são não-relacionados geneticamente com doze indivíduos cada, sendo nove fêmeas para o indivíduo 8 e oito fêmeas para o indivíduo 17. A fêmea 15 é não-relacionada geneticamente com onze indivíduos do plantel, quatro deles sendo machos. Estes três indivíduos devem ter prioridade de manutenção e manejo adequado no criadouro, pela representatividade genética que possuem, garantindo a maior variabilidade genética possível no cativeiro.

Observa-se que os locos de microssatélites que foram isolados e caracterizados no presente estudo foram bastante eficientes para trazer à luz vários

aspectos importantes da estrutura genética da população cativa estudada de *C. blumenbachii*. Como já comentado, a família Cracidae possui muitas espécies ameaçadas de extinção (cerca de 70% do total) e desempenham importante papel nos ecossistemas onde estão inseridas, incluindo predação, controle e dispersão de sementes e frutos.

Ainda são necessárias muitas informações sobre os cracídeos e suas interações. Na área de genética e biologia molecular destas aves quase nada é conhecido e uma das razões disso é a não disponibilidade de marcadores para estudos populacionais para a maioria das espécies. Nesse contexto, o presente estudo fornece um conjunto importante de ferramentas novas para estudos populacionais no grupo e traz informações relevantes que podem subsidiar o manejo adequado da população cativa estudada.

Também fornece subsídios para outros estudos semelhantes em outras espécies e em outras instituições que manejam animais silvestres. Como a ciência tem se tornado mais integrativa e complexa, é fácil imaginar um futuro onde as colaborações entre os geneticistas (que podem não ter o conhecimento para obter as amostras de campo) e biólogos e ecólogos (que podem não ter os conhecimentos e / ou facilidades para obtenção de genótipos) sejam comuns e sirvam para responder a perguntas fundamentais e aplicadas, em busca da conservação efetiva da biodiversidade (DE WOODY, 2005).

Esse estudo demonstra como a conservação *ex situ* merece atenção e investimento, podendo colaborar efetivamente com a conservação *in situ*, sobretudo para espécies ameaçadas de extinção. Os microssatélites, isolados a partir de indivíduos cativos, podem ser importantes em investigações da diversidade genética da espécie em vida livre, gerando informações valiosas para o manejo e planejamento, visando sua conservação.

Os microssatélites aqui descritos também deverão subsidiar estudos genéticos para maximizar a eficiência do manejo e trocas entre cativo e vida livre, como translocações e reintroduções, tanto dentro como entre mantenedores e criadores autorizados. Também indica a necessidade de um aumento da população cativa, para minimizar efeitos negativos, como perda de alelos por deriva genética.

Algumas espécies ameaçadas, como o mutum-do-sudeste, podem funcionar como espécie-bandeira ou guarda-chuva pra outras espécies, pois ao

propor a criação e expansão de Unidades de Conservação ou planos de manejo, por exemplo, protege-se o ecossistema de outras espécies. No caso do mutum-do-sudeste, desde 2003, na área de distribuição da espécie, algumas Unidades de Conservação tiveram suas áreas expandidas e novas Unidades foram criadas, configurando um importante passo na conservação *in situ*.

Acredita-se que os seres humanos estão causando a sexta extinção em massa de seres vivos, através do uso de recursos naturais, fragmentação de habitats, introdução de espécies alóctones, disseminação de patógenos, supressão de espécies e causando as mudanças climáticas globais. Se assim for, a recuperação da biodiversidade não irá ocorrer em um período de tempo significativo para as pessoas: a evolução de novas espécies normalmente demora pelo menos centenas de milhares de anos e recuperação após episódios de extinção em massa provavelmente ocorre em escalas de tempo englobando milhões de anos. A grande diferença entre onde estamos agora, e onde podemos estar facilmente dentro de algumas gerações revela a urgência de aliviar as pressões que estão empurrando as espécies atuais para a extinção (BARNOSKY et al., 2011).

5. CONCLUSÕES

1. Os marcadores moleculares desenvolvidos neste trabalho mostraram-se uma boa ferramenta para avaliação da espécie, sendo possível caracterizar geneticamente a população cativa de mutuns-do-sudeste do Criadouro Poços de Caldas/MG. Os cinco locos de microssatélites descritos foram validados na população e geram subsídios para novas pesquisas.

2. Os microssatélites descritos podem servir de base para amplificação cruzada em outras espécies do mesmo gênero e até mesmo da família Cracidae como um todo. O sucesso desta transferibilidade pode minimizar custos e empenho na busca de novos microssatélites, permitindo que pesquisas tenham foco em áreas ainda em déficit total de conhecimento.

3. Não se observou evidências de endogamia e de gargalo populacional recente na população cativa analisada, embora a estimativa do tamanho efetivo populacional possa estar sugerindo uma tendência de declínio da variação genética, corroborada por valores menores de riqueza alélica e de heteroziguidade, quando comparada com uma espécie congênera.

4. As análises de parentesco mostram uma população cativa heterogênea, com indivíduos não relacionados e outros com graus de parentesco diferentes, inclusive pais e filhos. A proposição de casais geneticamente distintos auxilia na manutenção a longo prazo da variabilidade genética no cativeiro, essencial para a conservação desta espécie ameaçada. Ressalta-se que os resultados fornecem uma aplicação prática e direta para o manejo adequado destes indivíduos.

6. REFERÊNCIAS

AZEREDO, R. Reintrodução de *Crax blumenbachii* na natureza. **Ann. V Congr. Orn.** Campinas: UNICAMP, 1996.

AZEREDO, R. M. A, SIMPSON, J. G. P.; BARROS, L. P. *Crax blumenbachii* preservation project. In: **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals** (Fowler, M.E.; Ed.). Ames, USA: Iowa State University Press. 2001.536p.

BARNOSKY, A. D. et al. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? **Nature**, v. 471, p. 51-57, 2011.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecology: from individuals to ecosystems**. London: Blackwell Publishing, 2006. 1068p.

BGAZO, A. J.; BODMER, R. E. Use and conservation of Cracidae (Aves: Galliformes) in the Peruvian Amazon. **Oryx**, v. 32, n.4, p. 301-309, 1998.

BERNARDO, C. S. S. **Reintrodução de mutuns-do sudeste *Crax blumenbachii* (Cracidae) na Mata Atlântica da Reserva Ecológica de Guapiaçu (Cachoeiras de Macacu, RJ, Brasil)**. 2010. 153p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Depto de Ecologia, UNESP, Rio Claro/ SP, 2010.

BIANCHI, C. A. Mutum-do-Sudeste (*Crax blumenbachii*). In: **Conserving Cracids: the most Threatened Family of Birds in the Americas** (D.M. Brooks, Ed.). Houston, TX: Misc. Publ. Houston Mus. Nat. Sci., 2006.116p.

BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BOWEN, B. W. Preserving genes, species or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. **Molecular Ecology**, v. 8, p. s5-s10, 1999.

BRANDON, K. et al. Conservação Brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**, v.1, n. 1, p. 7-13, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção sobre a diversidade biológica: Cópia do Decreto Legislativo n. 2, de 05 de junho de 1992**. Brasília, DF, 2000. 30p.

BROOKS, D. M.; FULLER, R.A. Biologia e Conservação de cracídeos. In: **Conserving Cracids: the most Threatened Family of Birds in the Americas** (D.M. Brooks, Ed.). Houston, TX: Misc. Publ. Houston Mus. Nat. Sci., 2006.116p.

CÂNDIDO JÚNIOR, J. F. Aceitação de alimento por *Crax blumenbachii*, *C. fasciolata* e *Penelope superciliaris* (Cracidae) em cativeiro. **Ararajuba**, v. 4 (1), p. 42-47, 1996.

CENIBRA, 2010. RPPN Fazenda Macedônia. Disponível em: <<http://www.cenibra.com.br/cenibra/MeioAmbiente/MeioAmbienteFlorestal/RppnFazendaMacedonia.aspx?&codigo=divFilhos5.1&familia=4&nivel=3&item=3>>. Acesso em: dez 2010.

CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, p. 1–29, 2006.

CRIADOURO POÇOS DE CALDAS. História do Criadouro. Disponível em: <www.criadouropocosdecaldas.com>. Acesso em: fev 2011.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina veterinária**. São Paulo, SP: Ed. Roca, 2007. 1376p.

DEL HOYO, J., ELIOTT, A.; SARGATAL, J. **Handbook of the Birds of the World**. Vol. 2. Lynx Ed., Barcelona, 1994. 638p.

DE WOODY, J. A. Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: Practical applications for wild animals. **Journal of Wildlife Management**, v. 69 (4), p. 1400-1418, 2005.

FARIA, C. M. A. et al. Aves de um fragmento de Mata Atlântica no Alto Rio Doce, Minas Gerais: colonização e extinção. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23 (4), p. 1217-1230, 2006.

FAZZA, A. C. **Variação genética do arapaçu-liso *Dendrocincla turdina* (Aves, Dendrocolaptidae) na Mata Atlântica. Uma contribuição para conservação dessas aves**. 2010. 59p. Dissertação (mestrado em Genética e Evolução) – Depto. de Genética e Evolução, UFSCar, São Carlos, 2010.

FIELD, D. et al. Paternity determination in captive lowland gorillas and orangutans and wild mountain gorillas by microsatellite analysis. **Primates**, v. 39, p.199-209, 1998.

FIGUEIREDO, M. G. 2008. **Caracterização genética de duas populações de jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Felidae, Carnívora) do corredor de fluxo de biodiversidade do Rio Paraná.** São Carlos: UFSCar. 51p. Mestrado (Genética e Evolução) – UFSCar. CCBS. GEv.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação.** Ribeirão Preto, SP: Editora SBG, 2008. 290p.

FRANKHAM, R. Inbreeding and Extinction: A Threshold Effect. **Conservation Biology**, v. 9 (4), p. 792–799, 1995.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A.. **Introduction to conservation genetics.** Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 617p..

FRITZEN, C. **Análise das ações de medicina veterinária no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CEREIAS), Aracruz – ES.** 2008. 64p. Monografia de conclusão do curso de Especialização *Latu sensu* em Medicina de Animais Selvagens e Exóticos. Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2008.

GALETTI, M. et al. Ecology and conservation of the jacutinga *Pipile jacutinga* in the Atlantic Forest of Brazil. **Biological Conservation**, v. 82, p. 31-37, 1997.

GOCHFELD, M.; KEITH, S. The Red-billed Curassow. **Oryx**, v. 14 (01), p. 22-23, 1977. Published online by Cambridge University Press 24 Apr 2009.

GONÇALVES, E. C. *et al.* Comparative genetic diversity of wild and captive populations of the Bare-Faced Curassow (*Crax fasciolata*) based on cross-species microsatellite markers: implications for conservation and management. **Biochem Genet**, v. 48. p. 472-479, 2010.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2.): a computer program to calculate F-statistics. **J. Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.

GRAU, E.T. *et al.* Molecular markers contribute in the management of a breeding program of the extinct in the wild Alagoas Curassow *Mitu mitu* and confirm the validity of the species. **Bird Conserv. Int.** n. 13, p. 115–126, 2003.

GRAU, E. T. 2008. **Filogenia molecular e Biogeografia: jacus e jacutingas (Cracidae)**. Tese de doutorado em ciências, IB – USP. São Paulo. 138p.

HAIG, S. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79 (2), p. 413-425, 1998.

HAMILTON, M. B. *et al.* Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **BioTechniques**, v. 27, p. 500-507, 1999.

HEDRICK, P.W. Perspective: highly variable genetic loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v. 53, p. 313-318, 1999.

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16 (11), p. 629-636, 2001.

HUGHES, C. R LARSON, E. D. Characterization of microsatellite loci developed for the wattled curassow, *Crax globulosa*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 629–644, 2000.

IBAMA/MMA. **Plano de Ação para Conservação do Mutum do Sudeste *Crax blumenbachii*** (L.F. Silveira, F. Olmos e C.A. Bianchi, Eds.). Brasília, DF, 2004.

INTERNATIONAL Studbooks for Rare Species of Wild Animals in Captivity. **International Zoo Yearbook**, 44: LI–LXXV, 2010.

IUCN – INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **Red List of Threatened Species**. Version 2010.4. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: mar 2011.

IUCN – INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **Mutum, jacus e aracuãs: Plano de Ação de Status e Conservação**, Grupo Especialista de Cracídeos da IUCN. Cambridge, UK: IUCN Publications Services Unit, 2004.

JONES, A. G. *et al.* A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, n. 10, p. 6–30, 2010.

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

KONOVALOV, D. A.; MANNING, C.; HENSHAW, M. T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 779–782, 2004.

LAIKRE, L. et al. Neglect of Genetic Diversity in Implementation of the Convention on Biological Diversity. **Conservation Biology**, v. 24 (01), p. 86-88, 2010.

LIMA, P. C.; MAGALHÃES, Z. S.; ALBANO, C. Registro da reprodução do mutum-do-sudeste em Ituberá na Bahia. **Atualidades Ornitológicas On-line**, n. 141, p. 105-106, 2008. ISSN 1981-8874.

LOPES, I. F. **Variabilidade genética em populações de *Jabiru mycteria* (Lichtenstein, 1819) e *Mycteria americana* (Linneaus, 1758) (Aves, Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia**. 2006. 106p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução), Depto de Genética e Evolução, UFSCar, São Carlos, 2006.

LUCK, W. G.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R. Population diversity and ecosystem services. **Trends in Ecology and Evolution**, n. 18, p. 331-336, 2003.

MARSHALL, T.C., *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.

MEDEIROS, C. F. L; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P. C. G. Uso de microssatélites em estudos de Biologia da Conservação. **Floresta e Ambiente**, v.13 (2), p. 25-36, 2006.

MEFFE, G. K.; CARROL, C. R. **Principles of Conservation Biology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 729p.

MILLIGAN, B. G. Maximum-Likelihood Estimation of Relatedness. **Genetics**, v. 163, p. 1153-1167, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Plano de ação para a conservação do Mutum-do-Sudeste (*Crax blumenbachii*)**. Série Espécies Ameaçadas, Vol.1. Brasília: IBAMA, 2004. 66p.

MIÑO, C.I et al. Parentage and relatedness in captive and natural populations of the Roseate Spoonbill (Aves: Ciconiiformes) based on microsatellite data. **J. Exp. Zool.** v. 311A, p. 453–464, 2009.

NETTO, L.E.S.; MERCK, C. F. M. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. In: **Biologia molecular e evolução**. (Matioli, S. R.;Ed). São Paulo, SP: Holos Editora. 2001. 202p.

OLIVEIRA, E.J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29 (20), p. 294-307, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288–295, 2006.

PEMBERTON, J.M. Wild pedigrees: the way forward. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 275, p. 613–621, 2009.

a PEREIRA, S. L.; WAJNTAL, A. Studies of captive stocks of the endangered Red-billed Curassow (*Crax blumenbachii*) suggest that this species is not depleted of genetic variability. In: BROOKS, D. M.; GONZALEZ-GARCIA, F. **Cracid Ecology and Conservation in the New Millenium**. Houston: Misc. Publ. Houston Mus. Nat. Sci., 2001. 225p.

b PEREIRA, S. L.; WAJNTAL, A. Estimates of the genetic variability in a natural population of Bare-faced Curassow *Crax fasciolata* (Aves, Galliformes, Cracidae). **Bird Conservation International**, v. 11, p. 301–308, 2001.

PEREIRA, S. L. **Variabilidade genética em cracídeos e monitoramento de populações reintroduzidas em áreas reflorestadas**. 1996. 109 pp. Dissertação (Mestrado), IB/USP, São Paulo, 1996.

PEREIRA, S. L. **Filogenia e evolução molecular em Cracidae (Aves)**. 2000. 184p. Tese (Doutorado), IB/USP, São Paulo, 2000.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J-M. Bottleneck: a computer program or detecting recent reductions in effective population size from allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, PR: Gráfica e Editora Midiograf, 2001. 328 p.

QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers.

Evolution, v. 43, p. 258–275, 1989.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicist. **J. Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

RICKLEFS, R. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2010. 546p.

RYDER, O. A. Genetic studies in zoological parks and their application to conservation: past, present and future. **International Zoo Yearbook**, v. 38, p. 102–111, 2003.

RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Ex situ population management in the absence of pedigree information. **Molecular Ecology**, v. 13 (9), p. 2829-2840, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 2. ed. USA : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1886 p.

SAVE BRASIL. Mutum-do-sudeste. Disponível em: <
<http://www.savebrasil.org.br/?q=content/mutum-do-sudeste>>. Acesso em: jan 2011.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000.

SICK, H. **Birds in Brazil: a natural history**. New Jersey: Princeton University Press, 1993. 704 p.

SIMPSON, J.; AZEREDO, R. The Red-billed Curassow project in Brazil. In: STRAHL, S.D. et al (Eds.) **The Cracidae: their Biology and Conservation**. Washington, USA: Hancock House Publ. 1997.

SOUZA, A. S. M. C. **Caracterização genética populacional e parentesco em populações naturais de tapicuru (*Plegadis chihî*) no Rio Grande do Sul**. 2011. 62p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Depto de genética e Evolução, UFSCar, São Carlos, 2011.

STRAHL, S.D.; GRAJAL, A. Conservation of large avian frugivores and the management of Neotropical protected areas. **Oryx**, v. 25, p. 50–55, 1991.

TEMPLETON, A. R. et al. Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. **Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**, v. 98 (10), p 5426-5432, 2001.

TORDOFF, H.B.; MACDONALD, J.R. A new bird (Family Cracidae) from the early Oligocene of South Dakota. **Auk**, v. 74, p. 174–184, 1957.

TRAILL, L. W. et al. Pragmatic population viability targets in a rapidly changing world. **Biological Conservation**, v. 143, p. 28–34, 2010.

VALLADARES-PADUA, C. B.; MARTINS, C. S.; RUDRAN, R. Manejo de espécies ameaçadas. In: CULLEN JR., C.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PÁDUA, C. **Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Fauna Silvestre**. 2.ed. Curitiba: Ed. UFPR, 2003. 667p.

VERNESI, C. et al. Where's the Conservation in Conservation Genetics? **Conservation Biology**. v. 22 (3), p. 802–804, 2008.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

WAJNTAL, A.; SILVEIRA, L. F. A soltura de aves contribui para sua conservação? **Atualidades Ornitológicas**, n. 98, p. 07-09. 2000.

WAZA - WORLD ASSOCIATION OF ZOOS AND AQUARIUMS. International Studbooks. Disponível em: <<http://www.waza.org/en/site/conservation/international-studbooks>>. Acesso em: jan 2011.

WEIR, B. S.; ANDERSON, A. D.; HEPLER, A. B. 2006. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 771-780, 2006.

APÊNDICE A - TABELA COMPARATIVA DE VALORES DE R OBTIDOS PELOS PROGRAMAS ML RELATE, KINGROUP E GENEALEX.

Para cada par de indivíduos possível apresenta-se o valor de parentesco genético (r) identificado por Queller e Goodnight (1989) segundo o programa GENEALEX e KINGROUP, o valor de parentesco genético e a categoria de relacionamento genético mais provável identificada por máxima verossimilhança pelo programa ML RELATE, sendo PO como pais/filhos, FS como irmãos-completos, HS como meio-irmãos e U como não-relacionados. Os valores em destaque são os que foram considerados para proposição dos casais não-relacionados geneticamente para reprodução em cativeiro no Criadouro, por apresentarem concordância entre os três programas utilizados.

indivíduo	com indivíduo	KINGROUP	GENEALEX	ML RELATE	
		r	r	r	Categoria
1	2	-0,0303	0,244	0,4679	FS
1	3	1	1,000	1	FS
1	4	0,0941	0,314	0,5941	FS
1	5	-0,0886	-0,137	0,2118	U
1	6	0,0941	0,314	0,5942	FS
1	7	0,4308	0,414	0,5438	FS
1	8	-0,0913	-0,104	0	U
1	9	-0,0886	-0,137	0,2118	U
1	10	0,6328	0,749	0,7308	FS
1	11	0,4383	1,000	0,5851	FS
1	12	1	1,000	1	FS
1	13	0,3382	0,328	0,2566	U
1	14	-0,022	-0,093	0,5009	U
1	15	-0,1951	-0,447	0	U
1	16	-0,1152	-0,196	0	U
1	17	-0,4198	-0,571	0	U
2	3	-0,0303	0,244	0,4679	FS
2	4	1	1,000	1	FS
2	5	1	1,000	1	FS
2	6	1	1,000	1	FS
2	7	-0,0303	0,244	0,4679	FS

2	8	-0,3077	-0,439	0,0749	U
2	9	1	1,000	1	FS
2	10	-0,0303	0,244	0,4679	FS
2	11	-0,5455	-0,214	0	U
2	12	-0,0303	0,244	0,4679	FS
2	13	-0,727	-0,693	0	U
2	14	-1,04	-1,480	0	U
2	15	-0,7436	-1,480	0	U
2	16	-1,04	-1,480	0	U
2	17	-1,2387	-1,474	0	U
3	4	0,0941	0,314	0,5941	FS
3	5	-0,0886	-0,137	0,2117	U
3	6	0,0941	0,314	0,5942	FS
3	7	0,4308	0,414	0,5439	FS
3	8	-0,0913	-0,104	0	U
3	9	-0,0886	-0,137	0,2118	U
3	10	0,6328	0,749	0,7308	FS
3	11	0,4383	1,000	0,5851	FS
3	12	1	1,000	1	FS
3	13	0,3382	0,328	0,2566	U
3	14	-0,022	-0,093	0,5009	U
3	15	-0,1951	-0,447	0	U
3	16	-0,1152	-0,196	0	U
3	17	-0,4198	-0,571	0	U
4	5	0,3263	0,549	0,774	FS
4	6	1	1,000	1	FS
4	7	-0,4246	-0,395	0,2116	U
4	8	-0,252	-0,292	0	U
4	9	0,3263	0,549	0,774	FS
4	10	0,1563	0,499	0,5209	FS
4	11	-0,4011	-0,045	0	U
4	12	0,0941	0,314	0,594	FS
4	13	-0,727	-0,693	0	U

4	14	-0,8704	-1,146	0,1086	U
4	15	-0,6699	-1,694	0	U
4	16	-0,7114	-1,096	0	U
4	17	-0,7045	-1,054	0	U
5	6	0,3263	0,549	0,7741	FS
5	7	0,0642	0,063	0,2117	U
5	8	0,3609	0,566	0,2676	U
5	9	1	1,000	1	FS
5	10	-0,6109	-0,654	0,2117	U
5	11	-0,3884	-0,627	0	U
5	12	-0,0886	-0,137	0,2117	U
5	13	-0,727	-0,693	0	U
5	14	-0,7114	-0,716	0	U
5	15	-0,878	-1,188	0	U
5	16	0,023	0,039	0,1443	U
5	17	0,1979	0,188	0,1443	U
6	7	-0,4246	-0,395	0,2118	U
6	8	-0,252	-0,292	0	U
6	9	0,3263	0,549	0,774	FS
6	10	0,1563	0,499	0,5209	FS
6	11	-0,4011	-0,045	0	U
6	12	0,0941	0,314	0,5941	FS
6	13	-0,727	-0,693	0	U
6	14	-0,8704	-1,146	0,1087	U
6	15	-0,6699	-1,694	0	U
6	16	-0,7114	-1,096	0	U
6	17	-0,7045	-1,054	0	U
7	8	0,0161	0,096	0	U
7	9	0,0642	0,063	0,2118	U
7	10	0,0078	0,013	0,5437	U
7	11	0,0386	0,156	0	U
7	12	0,4308	0,414	0,5438	FS
7	13	0,3382	0,328	0,2566	U

7	14	-0,3293	-0,340	0	U
7	15	-0,371	-0,529	0	U
7	16	-0,0033	0,004	0	U
7	17	-0,2433	-0,271	0	U
8	9	0,3609	0,566	0,2676	U
8	10	-0,4941	-0,587	0	U
8	11	0,3491	-0,573	0,1374	HS
8	12	-0,0913	-0,104	0	U
8	13	-0,4494	-0,513	0	U
8	14	-0,5389	-0,649	0	U
8	15	-0,2933	-1,089	0	U
8	16	-0,0044	0,073	0	U
8	17	0,4127	0,611	0,5013	PO
9	10	-0,6109	-0,654	0,2117	U
9	11	-0,3884	-0,627	0	U
9	12	-0,0886	-0,137	0,2117	U
9	13	-0,727	-0,693	0	U
9	14	-0,7114	-0,716	0	U
9	15	-0,878	-1,188	0	U
9	16	0,023	0,039	0,1443	U
9	17	0,1979	0,188	0,1443	U
10	11	0,3436	0,713	0,5	PO
10	12	0,6328	0,749	0,7308	FS
10	13	0,3382	0,328	0,2566	U
10	14	0,0693	0,092	0	U
10	15	0,133	0,220	0	U
10	16	-0,5164	-0,516	0	U
10	17	-0,7753	-0,780	0	U
11	12	0,4383	1,000	0,5851	FS
11	13	0,3929	1,000	0,5	PO
11	14	0,4383	1,000	0,5851	FS
11	15	0,6846	0,238	0,5	PO
11	16	0,2044	0,587	0	U

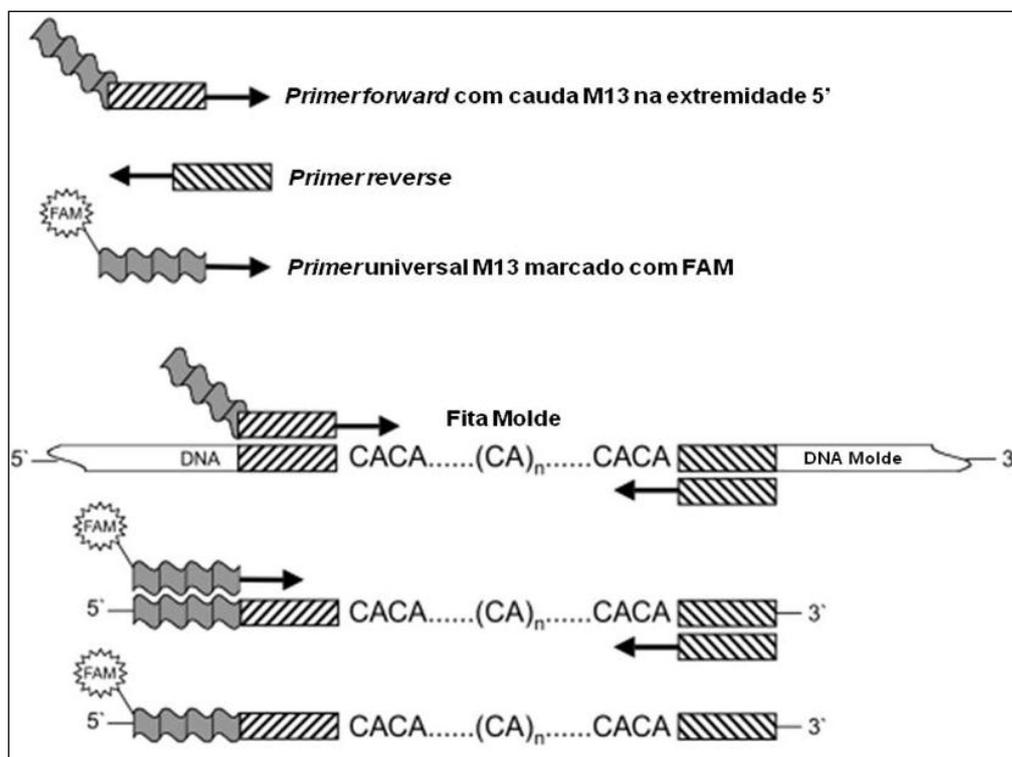
11	17	-0,3339	-0,573	0	U
12	13	0,3382	0,328	0,2566	U
12	14	-0,022	-0,093	0,5009	U
12	15	-0,1951	-0,447	0	U
12	16	-0,1152	-0,196	0	U
12	17	-0,4198	-0,571	0	U
13	14	0,5027	0,490	0,5618	PO
13	15	0,2944	0,490	0,5	PO
13	16	0,5027	0,490	0,5618	PO
13	17	0,3026	0,411	0,5346	FS
14	15	0,4801	0,657	0,3534	FS
14	16	0,6865	0,745	0,6177	FS
14	17	-0,1481	-0,152	0,095	U
15	16	0,1267	0,212	0,3534	FS
15	17	-0,4988	-0,599	0	U
16	17	0,4023	0,437	0,5	PO

ANEXO A - Protocolo de Extração de DNA com Fenol: clorofórmio: álcool isoamílico em *eppendorf*, adaptado de Sambrook (1989).

- 1) Colocar sangue (ou outro tecido) em um *eppendorf* de 1,5 ml, dar um *spin* e eliminar o excesso de álcool com a ponteira.
- 2) Colocar 500ul da solução de digestão (Tris HCl 0,01 M; EDTA 0,1 M; NaCl 0,4 M; SDS 0,5%; Rnase 0,1 mg/ml), vortexar, e deixar 1h no banho maria a 37°C.
- 3) Acrescentar 7ul de proteinase K (10mg/ml), verter o tubo e deixar 2h no banho Maria a 42° C, agitando suavemente a cada 30 min.
- 4) Dobrar o volume da solução no *eppendorf* com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e verter por 5 min.
- 5) Centrifugar 15 min a 10.000 RPM.
- 6) Recuperar o sobrenadante e acrescentar NaCl 5M de maneira que no tubo fique 1M de NaCl.
- 7) Precipitar com etanol 100% gelado e centrifugar 10 min.
- 8) Descartar o sobrenadante e lavar com 500 ul de etanol 70% gelado.
- 9) Secar na estufa e diluir em TE.

ANEXO B - Protocolo de Schuelke (2000).

O protocolo de Schuelke (2000) utiliza um *primer* M13 marcado com fluorescência, em conjunto com o par do *primer* específico para o loco microssatélite, o qual incorpora-se ao fragmento amplificado durante a PCR, como pode ser visto na figura abaixo. Desta forma, a incorporação do fluoróforo em cada um dos pares de *primer* se torna desnecessária, reduzindo os custos relacionados à genotipagem em seqüenciador automático.



Esquema de amplificação com protocolo proposto por Schuelke (2000)

ANEXO C - Protocolo de reações de PCR.

As reações de amplificação via PCR ocorreram com volume final de 10µl, contendo 50ng de DNA, solução tampão 10X, 0,2mM de dNTPs, 2mM de MgCl₂, 0,5 U de *Taq* DNA Platinum (Invitrogen), 0,2µM do *primer* com a cauda M13, 0,5µM do *primer* sem cauda M13 e 0,5 µM do *primer* M13 com fluorescência FAM, HEX ou TET. Para alguns *primers* padronizou-se a reação com *GoTaq* Hot Start Colorless Master Mix (Promega), contendo 2x Colorless *GoTaq* Reaction Buffer (ph 8,5), 400µM dATP, 400 µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP , 4mM MgCl₂, também com volume final de 10ul e 50 ng de DNA.

Os ciclos das PCRs iniciaram-se com uma desnaturação a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento específica do par de *primer* por 45 segundos e 72°C por um minuto. Em seguida adicionou-se 10 ciclos correspondentes ao anelamento do *primer* M13, constituídos por 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, sendo finalizado com uma extensão a 72°C por 10 minutos.