

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR

Fernanda Ribeiro Lima



**ARARA-AZUL-GRANDE (PSITTACIFORMES, AVES):  
INFORMAÇÕES GENÉTICAS PARA A  
CONSERVAÇÃO E O MANEJO EM CATIVEIRO**

SÃO CARLOS, SP

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR

FERNANDA RIBEIRO LIMA

ARARA-AZUL-GRANDE (PSITTACIFORMES, AVES): INFORMAÇÕES GENÉTICAS  
PARA A CONSERVAÇÃO E O MANEJO EM CATIVEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Genética Evolutiva e Biologia Molecular,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de mestre em Genética  
Evolutiva e Biologia Molecular.

*Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior*

SÃO CARLOS, SP

2014

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

L732aa Lima, Fernanda Ribeiro.  
Arara-azul-grande (Psittaciformes, Aves) : informações genéticas para a conservação e o manejo em cativeiro / Fernanda Ribeiro Lima. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 85 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Genética. 2. Conservação. 3. *Anodorhynchus hyacinthinus*. 4. Zoológico. 5. Parentesco. 6. Atribuição populacional. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

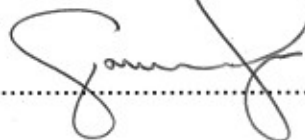
**“ARARA-AZUL-GRANDE (PSITTACIFORMES, AVES):  
INFORMAÇÕES GENÉTICAS PARA A CONSERVAÇÃO E O  
MANEJO EM CATIVEIRO”**

Dissertação de Mestrado de

**FERNANDA RIBEIRO LIMA**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior



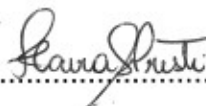
.....

Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco



.....

Dra. Flavia Torres Presti



.....



*A minha mãe Nice e aos meus  
irmãos Paulo, Bia e Marcos.*



*"No final só conservamos o que amamos,  
só amamos o que conhecemos e só  
conhecemos o que nos foi ensinado."*

*Baba Dioum*



## ARADECIMENTOS

A Deus por todo o amparo, amor e sabedoria para vencer mais uma etapa da minha vida.

À minha mãe e aos meus irmãos, por serem sempre presentes na minha vida e me apoiarem incondicionalmente. Por todos os bons e maus momentos em nossas vidas porque eles nos fizeram mais fortes e melhores. E aos pequenos que são a luz e alegria da nossa casa, Vivi (*in memorian*), Ceci, Cherry, Mio e Gata, por nos amarem sem medida.

À meu orientador, professor Pedro Galetti, por me receber no laboratório e pela contribuição para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos familiares que sempre estiveram presentes na minha vida e contribuem constantemente com seu amor, carinho e incentivo. Em especial a tia Clareti, a tia Eliana, a Bia, a tia Fátima e a Ná que acaba de nos dar uma alegria imensa chamada Pedro.

Ao meu amado avô Américo de Paula Lima (*in memorian*), que será sempre o incentivo para que eu faça as coisas de forma correta.

À minha família paranaense, Furlanetto Soares, por fazerem parte da minha vida me apoiando e me amando mesmo de longe. Guardo todos você no coração com um amor sem medida.

Às amigas antigas que perduram e contribuem com tanto amor e apoio: Ari, Kelly, Sandra, Lorena, Pollyana, Rodrigo (But's), Zayra e Vanessa.

Às minhas companheiras de casa e do dia a dia, Grazi e Raquel, por me apoiarem, me ouvirem, me entenderem e por todos os dias vividos.

Aos colegas de laboratório e laboratório vizinho que viraram amigos para vida: Aline, Andiara, Eliana, Josiane, Karla e Carlos. Obrigada por todo apoio, ajuda, carinho e principalmente pelos bons momentos.

À TODO Laboratório de Biologia Molecular e Conservação, técnico e alunos, pela ajuda durante o desenvolvimento do meu projeto, pelas risadas e festas e por todo barulho do dia a dia. Em especial os meninos, André, Bruno, Léo, Lucas, Paulo, Rapha e Ueslei por todo companheirismo e paciência. E as meninas Cá, Dany, Dri, Lele, Mari, Rô por todas as conversas, ajuda e amizade.



À todas as Instituições colaboradoras desse projeto:

Parque Ecológico de São Carlos  
Parque Ecológico Municipal de Americana  
Fundação Parque Zoológico de São Paulo  
Zoológico Municipal de Bauru  
Zoológico Municipal de Piracicaba  
Parque Ecológico Municipal de Leme  
Zoológico de Taboão da Serra  
Zoológico Municipal de Sorocaba  
Zoológico e Orquidário de Santos  
Zoológico Municipal de Ribeirão Preto  
Parque Zoológico Eugênio Walter de Boituva

e aos profissionais de cada uma, biólogos e veterinários, que contribuíram diretamente e gentilmente com a coleta de material biológico e informações sobre os espécimes.

À professora Dra. Cristina Miyaki e à Dra. Flávia Torres Presti por gentilmente cederem os dados das populações naturais de arara-azul-grande, sem os quais não seria possível atingir um dos objetivos desse trabalho.

À Red de Genética para la Conservación (ReGeneC) que tanto contribuiu com o aperfeiçoamento desse projeto e com o meu aprimoramento profissional. E a Fundação Luísa Sartori Pinho por me permitir tudo isso.

Aos professores, à secretária (Ivanildes) e ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

À banca examinadora Dra. Flávia Torres Presti e professor Dr. Mercival Roberto Francisco, pela atenção, contribuição e carinho.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.

Às araras-azuis-grande personagem principal desse estudo, que alegraram e embelezaram a minha vida durante esses dois anos.

E à todos que de alguma forma me ajudaram durante esses anos meu muito obrigada!!!





## Resumo

Os marcadores moleculares tipo microssatélites podem fornecer informações valiosas sobre relações de parentesco, estimativa de diversidade e origem populacional de indivíduos. Esses dados são essenciais para adoção de medidas de conservação *in-situ* e *ex-situ* para espécies ameaçadas. No presente estudo obtivemos dados genéticos sobre os indivíduos cativos da espécie *Anodorhynchus hyacinthinus*, arara-azul-grande, considerada em perigo de extinção. Analisamos 10 locos de microssatélite e realizamos a sexagem molecular para 50 espécimes de arara-azul-grande cativos nos parques zoológicos do Estado de São Paulo. Determinamos o sexo de indivíduos que não apresentavam essa informação e corrigimos a identificação errônea de dois outros espécimes. A diversidade genética encontrada para os espécimes cativos de arara-azul-grande não diferiu significativamente da apresentada para as populações naturais. Pudemos inferir a provável origem populacional de 89,8% dos espécimes cativos por meio de testes de atribuição populacional e dos genótipos multiloco das populações naturais. A maior parcela dos espécimes cativos foi atribuída às populações da região norte e nordeste. Estabelecemos as relações de parentesco e a similaridade genética entre os 49 espécimes cativos, focando os indivíduos cativos na mesma instituição. Mais de 70% das combinações par a par entre os espécimes de arara-azul-grande resultaram em valores de parentesco para indivíduos não relacionados, com valores de similaridade genética intermediária. A combinação dos resultados permitiu a sugestão dos melhores casais para reprodução em cada instituição, além de possibilitarem a visualização, pelas próprias instituições, dos melhores pareamentos reprodutivos entre todos os espécimes, visando assegurar a diversidade genética e preservar a história evolutiva de *A. hyacinthinus* em cativeiro.



## Abstract

Microsatellites loci can provide valuable information about kinship, diversity estimation and population origin of individuals. These data are essentials for adoption of conservation measures *in-situ* and *ex-situ* for endangered species. In the present study, we achieved genetic data on captive individuals of the specie *Anodorhynchus hyacinthinus*, hyacinth macaw, regarded in endangered of extinction. We analyzed 10 microsatellite loci and performed the molecular sexing to 50 of hyacinth macaw captive in the zoos of the São Paulo State. We determined the sex of individuals without this information and corrected the erroneous identification of the two other specimens. The genetic diversity for captive specimens hyacinth macaw did not differ significantly of the natural populations. We determine the probable populational origin of 89.9% of the captive specimens by population allocation tests and multilocus genotypes of the natural populations. The largest portion of captive specimens were assigned to the North and Northeast region. The largest portion of captive specimens were assigned to the North and Northeast populations region. We established the kinship and genetic similarity among 49 captive specimens, focusing on captive individuals in the same institution. More than 70 % of the pairwise combinations among the hyacinth macaw specimens resulted in values of kinship to unrelated individuals, with intermediate values of genetic similarity. The combination of the results of this present study allowed the suggestion of the best couples to breeding in each institution, beyond if they enable better visualization of reproductive pairings between all specimens to ensure the genetic diversity and preserve the evolutionary history of the *A. hyacinthinus* in captivity.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Parques zoológicos do Estado São Paulo que abrigam os indivíduos de arara-azul-grande amostrados nesse estudo. Com a sigla e número de indivíduos amostrados em cada instituição.....24
- Tabela 2. Locos de microssatélites amplificados para os espécimes cativos de arara-azul-grande. Suas respectivas sequências *forward* (F) e *reverse* (R), repetição, temperatura de anelamento (Ta) e referência.....27
- Tabela 3 - Resultado da sexagem molecular das 50 araras-azuis-grande amostradas nesse estudo. Número de registro de coleta de cada espécime, sigla da instituição a qual o espécime pertence, sexo informado pela instituição (fêmea (F), macho (M) e indeterminado (I)) e sexo de acordo com a sexagem molecular realizada pela técnica descrita por Griffiths et al. (1998).....37
- Tabela 4 - Estimativas de diversidade genética dos indivíduos cativos de arara-azul-grande baseada em 10 locos de microssatélites. Loco, número de indivíduos analisados em cada loco (N), número de alelos (Na), número efetivo de alelos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), diversidade gênica (DG) de acordo com Nei (1987), riqueza alélica (Ra), conteúdo de informação polimórfica (PIC).....39
- Tabela 5 - Resultado da atribuição populacional de cada espécime cativo de arara-azul-grande (EC). Realizada pelos métodos de verossimilhança, frequências alélicas e bayesiano, considerando três conjuntos gênicos naturais: Pantanal Norte (PN), Pantanal Sul (PS) e Norte+Nordeste (N+NE), resultado da análise bayesiana de agrupamento com k=3 e provável origem populacional de cada espécime cativo.....42
- Tabela 6 - Resultado da atribuição populacional de cada espécime cativo de arara-azul-grande (EC). Realizada pelos métodos de verossimilhança, frequências alélicas e bayesiano, considerando quatro conjuntos gênicos naturais: Pantanal Norte (PN), Pantanal Sul (PS), Norte (N) e Nordeste (NE) e provável origem populacional de cada espécime cativo.....43
- Tabela 7 - Melhores combinações par a par dos espécimes de arara-azul-grande cativos no PEMA para reprodução. Considerando o relacionamento indicado pelos dados genéticos/genealógicos (R) e a similaridade genética (PS) entre os espécimes.....50
- Tabela 8 - Melhores combinações par a par dos espécimes de arara-azul-grande cativos na FPZSP para reprodução. Considerando o relacionamento indicado pelos dados genéticos/genealógicos (R) e a similaridade genética (P<sub>s</sub>) entre os espécimes.....53
- Tabela A - Dados dos espécimes cativos de arara-azul-grande analisados. Registro do laboratório (RL), número de registro da instituição (NRI) (microchip(M)/anilha(A)/registro interno(RI)), instituição, sigla da instituição, sexo informado (SI), origem do espécime, data de coleta (DC), material biológico amostrado (MBA) e outras informações relevantes (InfoR).....73
- Tabela B – Estimativas de parentesco e similaridade genética entre os 49 espécimes de arara-azul-grande em cativeiro. Valores de parentesco (r) segundo Wang (2007) (TML) e Lynch e Li (1999) (LynchLi), suposto relacionamento por estimativas de verossimilhança: irmão-



---

completo (FS), pai e filho (PO), meio-irmão (HS) e não relacionado (U) e similaridade genética entre os espécimes cativos de arara-azul-grande.....75



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Espécies de arara-azul pertencentes ao gênero *Anodorhynchus*.....13
- Figura 2 – Localidades geográficas da espécie *Anodorhynchus hyacinthinus* amostradas e analisadas por Presti (2010) e suas populações genéticas correspondentes: Pantanal Sul, Pantanal Norte e região Norte e Nordeste.....17
- Figura 3 - Esquema de amplificação com uso da cauda M13.....28
- Figura 4 - Foto do gel de agarose 3% com o resultado da amplificação da sexagem molecular. Com fêmeas (♀) apresentando duas bandas (300 e 400pb) e machos (♂) uma única banda (300pb).....36
- Figura 5 - Gráfico gerado pelo programa Structure com k=4 (Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), região Norte (N) e região Nordeste (NE)) e os espécimes cativos de arara-azul-grande estudados (EC). Cada indivíduo é representado por uma barra com diferentes proporções das quatro cores que representam os quatro conjuntos gênicos naturais de arara-azul-grande.....39
- Figura 6 - Gráfico gerado pelo programa Structure com k=3 (Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), Norte e Nordeste (N+NE)) e os espécimes cativos de arara-azul-grande estudados (EC). Cada indivíduo é representado por uma barra com diferentes proporções das três cores que representam os três conjuntos gênicos naturais de arara-azul-grande.....39
- Figura 7 - Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Pritchard (2000).....40
- Figura 8 - Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Evano (2005).....40
- Figura 9 - Análise fatorial de correspondência demonstrando o padrão de distribuição espacial das populações naturais de arara-azul-grande (PN, PS, N e NE) e dos espécimes cativos (EC) da espécie. Cada indivíduo das populações naturais e os desse estudo são representados por cores: azul população PN, branco população PS, cinza população N, rosa população NE e amarelo EC.....41
- Figura 10 - Análise fatorial de correspondência demonstrando o padrão de distribuição espacial das populações naturais de arara-azul-grande (PN, PS, N+NE) e dos espécimes cativos (EC) da espécie. Cada indivíduo das populações naturais e os desse estudo são representados por cores: branco população PN, cinza população PS, azul população N+NE e amarelo EC.....41
- Figura 11 - Gráficos -log-verossimilhança para a atribuição populacional dos espécimes cativos de arara-azul-grande (EC) a cada um dos conjuntos gênicos naturais da espécie, Pantanal Norte (PN), Pantanal Sul (PS) e Norte e Nordeste (N+NE), e aos três conjuntos gênicos simultaneamente. Cada símbolo representa um indivíduo de uma das populações e do grupo de indivíduos cativos e os números correspondem ao número de registro dado nesse estudo a cada de cada espécime cativo.....45



Figura 12 - Categorias de relacionamento para cada estimador, distribuição dos valores encontrados para similaridade genética e porcentagem de categorias para similaridade genética. (a) gráfico com a porcentagem de pares de indivíduos das 1176 combinações par a par para as categorias de relacionamento: não relacionado (UN), parente de segundo-grau (PSG) e parente de primeiro-grau (PPG), para os estimadores de parentesco verossimilhança triádico (TML) (WANG, 2007) e LynchLi (LI; WEEKS; CHAKRAVARTI, 1993; LYNCH, 1998). (b) histograma da frequência dos valores encontrados para PS. (c) porcentagem de cada categoria de PS, baixa, intermediária e alta, para as 1176 combinações para a par de indivíduos de arara-azul-grande em cativeiro.....47

Figura 13 - Heredograma de uma parcela dos espécimes de arara-azul-grande cativos na FPZSP. Construído com base em dados genealógicos e genéticos, onde os números correspondem ao número de registro dado a cada espécime no laboratório.....51



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Justificativa .....	21
3. Hipóteses .....	22
4. Objetivos .....	23
5. Material e Métodos.....	24
5. 1. Amostras.....	24
5.2. Extração de DNA total .....	25
5.3. Sexagem Molecular.....	26
5.4. Amplificação dos locos de microssatélites .....	27
5.5. Análise Estatística dos Dados.....	29
5.5.1. Identificação de erros de genotipagem.....	29
5.5.2. Caracterização dos locos de microssatélites .....	30
5.5.3. Atribuição populacional .....	30
5.5.4. Parentesco e sugestão dos melhores casais para reprodução .....	33
6. Resultados.....	36
6. 1. Amostras e extração do DNA total .....	36
6. 2. Sexagem molecular .....	36
6.3. Caracterização dos locos de microssatélite e identificação de erros de genotipagem.....	38
6.5. Atribuição populacional.....	39
6.6. Parentesco e sugestão dos melhores casais para reprodução.....	46
7. Discussão.....	53
7.1. Sexagem molecular .....	53
7.2. Caracterização dos locos de microssatélite e erros de genotipagem. ....	54
7.3. Atribuição populacional.....	55
7.4. Parentesco e sugestões dos melhores casais para reprodução.....	56
7.5. Rota de tráfico e repatriação das aves .....	58
8. Conclusões.....	60
9. Referências Bibliográficas.....	61
APÊNDICES.....	72



## 1. Introdução

O território brasileiro faz parte da região neotropical do globo, que concentra a maior biodiversidade do nosso planeta. O Brasil ocupa uma posição de destaque neste cenário, sendo considerado um país megadiverso abrigoando cerca de 10 a 20% do total de espécies conhecidas no planeta (LEWINSOHN, 2006; LEWINSOHN; PRADO, 2005; MMA, 2010). Em relação à avifauna o país está entre os mais ricos, atrás somente da Colômbia e do Peru, abrigoando mais de 1.500 espécies de aves das quase 10 mil reconhecidas em todo o globo pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e *BirdLife* (BIRDLIFE, 2008a).

As aves representam um dos grupos de seres vivos mais bem estudados no mundo e são consideradas bons indicadores da saúde ambiental, podendo ser usadas para o monitoramento da situação da biodiversidade mundial (BIRDLIFE, 2008b). No entanto, na última avaliação realizada pela *BirdLife* (2011, 2013a) 1.253 espécies foram consideradas ameaçadas de extinção e dentre estas, 122 estão presentes em território brasileiro. Estudos apontam que nos últimos 500 anos 151 espécies de aves podem ter sido extintas (BIRDLIFE, 2011). Estas extinções têm sido causadas, principalmente, pela ação antrópica por meio da destruição de hábitat pela agricultura e exploração de madeira, da caça e tráfico ilegal e da introdução de espécies exóticas, como ratos e gatos (BIRDLIFE, 2013b). De acordo com a *BirdLife* (2013a) 23% das espécies de aves ameaçadas de extinção são psitacídeos. O Brasil é considerado o país mais rico em psitacídeos, com 85 espécies reconhecidas pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS, 2011) e dessas, 16 estão listadas como espécie ameaçada de extinção em diferentes classificações da IUCN (2012, 2013).

A família Psittacidae é composta por cerca de 350 espécies conhecidas popularmente como papagaios, araras, periquitos, jandaías, maracanãs, tuins, apuins, catatuas, calopsitas, caturritas, entre outras, distribuídas pelas regiões quentes e temperadas do globo (DEL HOYO, ELLIOT; SARGATAL, 1999; FORSHAW e KNIGHT, 2006; JUNIPER e PARR, 1998). Os psitacídeos apresentam grande variação de tamanho, coloração e peso, mas compartilham muitas características marcantes que facilitam seu reconhecimento imediato, como o bico curto, alto, recurvado, base larga, arredondado e maxila móvel articulada ao crânio. Possuem uma língua grossa, sensível e riquíssima em papilas gustativas. Apresentam o tarso muito curto, com quatro dedos em pé zigodáctilo, asas compridas e fortes, plumagem em cores vividas, curta, dura e rica em pó. A região perioftálmica é nua e de extensão variada, frequentemente possui um círculo estreito em volta dessa região, destacando um colorido





vivo, que pode ser realçado ainda mais por um segundo círculo (COLLAR, 1997; SICK, 1997).

Os representantes da família Psittacidae apresentam características que despertam grande interesse nos seres humanos, como sua plumagem colorida, inteligência, fácil adaptação ao cativeiro e capacidade de imitar a voz humana, tornando esse um dos grupos de aves que mais sofre com a caça e o tráfico ilegal (COLLAR, 1997; GUEDES, 2004; SYNDER et al., 2000). Os psitacídeos de maior tamanho corpóreo, como as araras, estão entre as espécies mais susceptíveis a extinção devido às suas baixas taxas de recrutamento e a sua sensibilidade à perda de hábitat (GALETTI; GUIMARÃES; MARSDEN, 2002). Adicionalmente, a falta de conhecimento sobre sua biologia básica torna a conservação dessas aves ainda mais difícil (GUEDES, 2004).

O gênero *Anodorhynchus* (Psittaciformes, Psittacidae) compreendia três espécies de arara-azul com grande similaridade morfológica (Figura 1): (i) *Anodorhynchus glaucus* (Vieillot 1816), arara-azul-pequena, extinta na natureza e sem registros de sua existência em cativeiro, (ii) *Anodorhynchus hyacinthinus* (Latham 1790), arara-azul-grande, considerada ameaçada de extinção e (iii) *Anodorhynchus leari* (Bonaparte 1856), arara-azul-de-lear, em perigo de extinção (BIRDLIFE, 2014; SICK, GONGAZAGA; TEIXEIRA, 1987; YAMASHITA e VALLE, 1993; MMA, 2003, MACHADO et al., 2008; IUCN, 2014).

Figura 1 - Espécies de arara-azul pertencentes ao gênero *Anodorhynchus*.



*Anodorhynchus glaucus*



*Anodorhynchus hyacinthinus*



*Anodorhynchus leari*

As araras desse gênero possuem cabeça grande e bicos poderosos, com uma pele amarela em forma de anel no entorno dos olhos. A plumagem apresenta variações em tons de azul e seus indivíduos não apresentam dimorfismo sexual. São altamente especialistas, alimentando-se principalmente de frutos de palmeiras encontrados nas regiões de ocorrência (YAMASHITA e VALLE, 1993), o que as torna extremamente dependentes da conservação do seu habitat (GUEDES, 1995, 2004).



A espécie *A. hyacinthinus*, conhecida popularmente como arara-azul-grande, arara-azul, arara-preta e araraúna, enfatizada neste projeto de pesquisa, pode medir mais de um metro da ponta do bico à cauda e pesar cerca de 1,3 kg, sendo considerada o maior psitacídeo do mundo (GUEDES, 2002; SICK, 1997). Sua plumagem é azul cobalto com a superfície inferior enegrecida, com o anel perioftálmico e uma faixa em torno da base da mandíbula em amarelo (ABRAMSON; SPEER; THOMSEN, 1995; GUEDES, 1993; SICK, 1997).

A arara-azul-grande ocorre na região do Pantanal brasileiro (nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), boliviano e paraguaio; na região norte do Brasil no Estado do Pará (leste da região amazônica e oeste de Altamira), na região de "Gerais" que inclui os Estados de Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Goiás e Minas Gerais (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014; GUEDES, BIANCHI e BARROS, 2008;). As populações do Pantanal são monitoradas desde a década de 1990 pelo Projeto Arara-azul, o qual despense grandes esforços para na proteção e recuperação da espécie. Já as demais populações ainda estão mais vulneráveis ao tráfico e sofrem com descaracterização do seu habitat para a pecuária e agricultura (BIANCHI, 2003 apud GUEDES, 2004; SCHERER-NETO, 2004 apud GUEDES, 2004).

As araras-azuis-grande são consideradas aves sociais, com fidelidade aos seus locais de alimentação e de reprodução e ao seu parceiro, se reúnem em grupos para comer pela manhã ou no final da tarde e em locais chamados de "dormitórios" onde passam a noite (GUEDES, 1993; GUEDES, 1995; YAMASHITA, 1992). No Pantanal, os frutos das palmeiras acurí (*Scheelea phalerata*) e macaúva/bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) são sua fonte de alimentação, já na região nordeste as araras-azuis se alimentam de coco de piaçava (*Atelea funifera*) e catolé (*Syagrus cearencis*) e na região norte de injá (*Maximiliana maripa*), babaçu (*Orbignya phalerata*), tucum (*Astocarym sp.*), gueroba (*Syagrus oleracea*) e dos poucos frutos de acurí e macaúva disponíveis (COLLAR et al., 1992; GUEDES, 1993, SICK, 1984; SICK et. al., 1987). Em cativeiro a arara-azul-grande não tem um gasto energético tão alto quanto na natureza e, deste modo, a dieta de cocos e as sementes oleaginosas que são consumidos livremente em vida livre podem gerar obesidade, problemas reprodutivos e deficiência nutricional (CARCIOFI e SAAD, 2001; CARCIOFI; PRADA; MORI, 2003). A utilização de rações específicas para psitacídeos é uma alternativa eficaz e econômica que garante à ave todos os nutrientes, vitaminas e minerais necessários em todas as fases do desenvolvimento (FRANCISCO, 2012). Intercalado à ração, é comum o oferecimento de cocos e nozes, além de frutas e verduras uma ou duas vezes por semana (FERREIRA, 2010).



A espécie é monogâmica (GUEDES, 1993; MIYAKI et al, 1995; PRESTI, 2006), como a maioria dos psitacídeos (SICK, 1997), com o casal permanecendo junto mesmo fora da estação reprodutiva, dividindo as tarefas de seleção, reforma e cuidado do ninho e filhotes (GUEDES, 1993; GUEDES e HARPER, 1995). No Pantanal e na região norte a formação dos ninhos ocorre pela expansão de cavidades de árvores feitas por outras espécies de aves, como o pica-pau, ou provocadas por quebra de galhos. Sendo que uma única espécie de árvore, o manduvi (*Sterculia apetala*), concentra até 90% dos ninhos no Pantanal (GUEDES, 2004; PINHO e NOGUEIRA 2003). Já na região nordeste as araras-azuis nidificam em fendas ou buracos naturais de paredões rochosos de arenito (COLLAR, 1997).

O período de reprodução se estende de julho a janeiro, e a fêmea de *A. hyacinthinus* coloca, em média, dois ovos de coloração branca (GUEDES, 1993). A incubação leva de 28 a 30 dias e o macho fica responsável pela defesa do ninho e grande parte da alimentação da sua parceira, já que a fêmea passa 70% do seu tempo no ninho incubando os ovos (GUEDES, 1993, 2002). O peso dos filhotes ao nascer é de aproximadamente 30 gramas, variando entre 18 a 27 gramas e medem de 8 a 10 cm de comprimento (GUEDES, 1993, 2002; FERREIRA, 2010). Apesar da alta taxa de eclosão, há também uma alta taxa de mortalidade dos ninhos e geralmente só um dos filhotes sobrevive (GUEDES, 2004). Em cativeiro, a espécie geralmente se reproduz no mesmo período da natureza, com o segundo ovo colocado dois dias após o primeiro e os filhotes nascem com dois dias de diferença também (FERREIRA, 2010). E para se obter maior sucesso de eclosão e sobrevivência de filhotes os ovos são incubados artificialmente e os filhotes são criados sem os pais (FERREIRA, 2010).

O filhote é totalmente dependente dos seus pais e recebe alimento por regurgitação. Com aproximadamente 100 dias ele deixa o ninho, mas ainda está ligado aos seus pais pela dependência na alimentação, a separação completa ocorre entre 12 a 18 meses (GUEDES; BIANCHI e BARROS, 2008). O tempo de separação do filhote determina se o casal de *A. hyacinthinus* se reproduz todos os anos ou em anos alternados (GUEDES, 2004). De acordo com Presti (2006) o tempo de separação está relacionado à experiência e maturidade do casal, dessa forma, casais experientes reproduzem-se todos os anos, enquanto casais jovens e inexperientes se reproduzem a cada dois anos. A arara-azul-grande pode viver 30 anos, essa grande longevidade pode compensar a baixa taxa reprodutiva anual da espécie (GUEDES, 2002, 2004).

A população de arara-azul-grande no Pantanal chegou a níveis críticos na década de 1980, estima-se que mais de 10 mil aves foram capturadas e comercializadas ilegalmente (MITTERMEIER et al. 1990; MUNN; THOMSEN e YAMASHITA, 1987). Na década de



1990, a situação da espécie se agravou ainda mais com a perda de seu habitat pelo desmatamento e queimadas, com o número de aves chegando a cerca de 1.500. Nos exemplares em cativeiro, no mesmo período de 1980 a 1990, também ocorreu um declínio no número de indivíduos de arara-azul-grande, causado pela falta de conhecimento da biologia da espécie e seu manejo, com perda de muitos indivíduos selvagens que foram vendidos como “pet”, por falta de cuidados básicos, principalmente relacionados com a dieta da ave e a dificuldade em domesticar os exemplares silvestres. E assim, instituições como zoológicos e criadouros na intenção de ajudar a espécie em sua reprodução e preservação, aumentaram a pressão sobre as populações selvagens (FERREIRA, 2010).

A espécie *A. hyacinthinus* é considerada ameaçada de extinção, devido aos rápidos declínios populacionais do passado, causados pela ameaça de captura para o comércio ilegal e a perda de habitat permanente (BIRDLIFE, 2014; COLLAR et al. 1992; IUCN, 2013; MMA, 2003; MACHADO et al., 2008; Apêndices I e II da Conservação sobre o Comércio das Espécies da Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção).

O número de aves em vida livre no Brasil está estimado em 6.500 indivíduos (GUEDES; BIANCHI e BARROS, 2008; MACHADO et al., 2008), com cerca de 5.000 aves no Pantanal e de 1.000 a 1.500 araras-azuis na região norte e no “Gerais”. Segundo Presti (2010) as populações de arara-azuis-grande apresentam moderada diferenciação genética correspondente a suas distribuições geográficas (Figura 2): (i) Pantanal Sul, (ii) Pantanal norte, (iii) região norte e (iv) região nordeste.

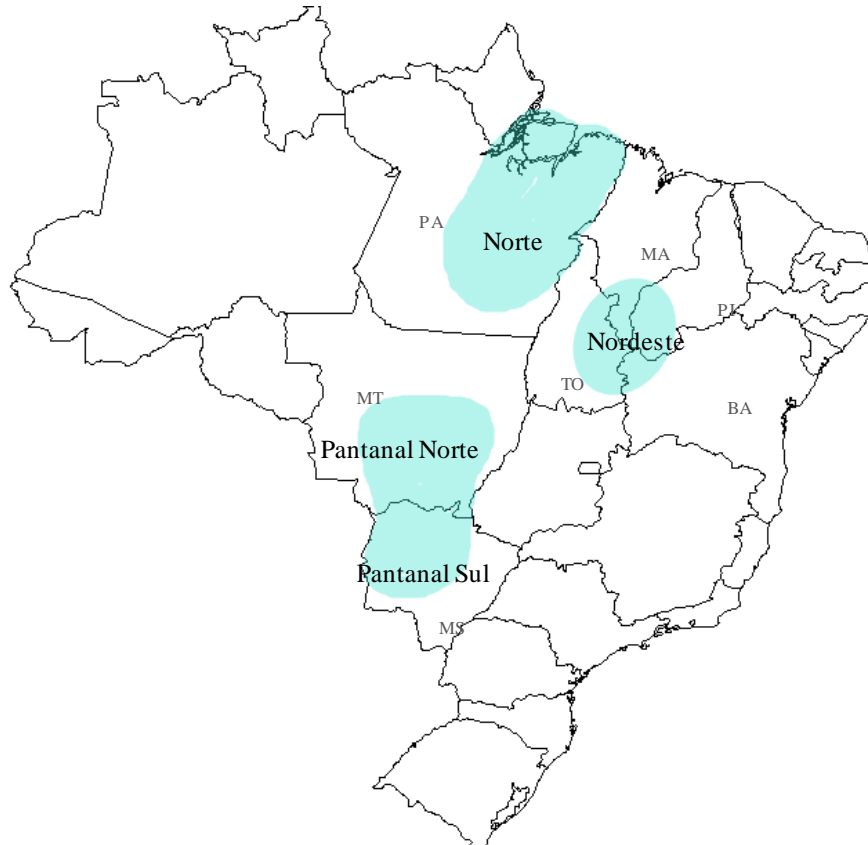
Uma espécie listada como ameaçada de extinção merece atenção visando sua conservação e de seus habitats e se necessário, o desenvolvimento de práticas de manejo voltadas para a recuperação de suas populações até níveis seguros (TOMAS; SOUZA; TUBELIS, 2004). Dessa forma, estratégias de conservação *in-situ* e/ou *ex-situ* devem ser empregadas na tentativa de evitar que espécies desapareçam. A conservação *in situ* visa à recuperação da espécie em seu ambiente natural. Já a conservação *ex-situ* mantém populações, principalmente de espécies ameaçadas de extinção ou já extintas na natureza, em cativeiro para a reprodução (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

No contexto da conservação *ex-situ* as instituições como zoológicos e criadouros científicos podem desempenhar um papel importante na conservação de espécies, principalmente aquelas ameaçadas de extinção, contribuindo com programas de reprodução, manejo e reintrodução de espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; TROMBULAK et al., 2004). Os zoológicos ainda realizam pesquisas científicas que geram dados sobre a biologia das espécies cativas, muitas vezes em parceria com instituições de pesquisas. Além de



atuarem como educadores da população, aumentando o interesse, a afeição, o conhecimento e a conscientização da sociedade sobre a fauna e a flora (DIEGUES; PAGANI, 2007).

Figura 2 – Localidades geográficas da espécie *Anodorhynchus hyacinthinus* amostradas e analisadas por Presti (2010) e suas populações genéticas correspondentes: Pantanal Sul, Pantanal Norte e região Norte e Nordeste.



Fonte: adaptado de Presti (2010).

A conservação *ex-situ* visa manter em cativeiro um conjunto de indivíduos viáveis e auto sustentáveis, capazes de representar e manter a diversidade genética encontrada nas populações naturais (EBENHARD, 1995; RUDNICK; LACY, 2008). A maioria dos zoológicos e criadouros reconhece a importância de manter as espécies como unidades evolutivas (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Para que isso ocorra é necessário que os pareamentos reprodutivos e trocas de exemplares entre as instituições sejam planejados, considerando o parentesco entre os indivíduos e as eventuais consequências do endocruzamento, os possíveis efeitos da exogamia, a identificação correta do sexo dos indivíduos nas espécies que não apresentam dimorfismo sexual e a perda da diversidade genética encontrada nas populações naturais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; TEMPLETON, 2011).



A endogamia pode colocar em evidência alelos recessivos deletérios diminuindo a capacidade reprodutiva e sobrevivência da espécie (RALLS; BALLOU, 1983; FRANKHAM, 2008; PEREIRA, 2004). Estudos mostram que mesmo no ambiente controlado e pouco variável do cativeiro, que exerce menor pressão seletiva sobre as espécies, as características de aptidão estão sob influência da depressão endogâmica (BRYANT; REED 1999; FRANKHAM, 1995). Além disso, o manejo de uma espécie *in-situ* e/ou *ex-situ* de espécies com estruturação genética sem considerar a origem geográfica dos indivíduos para reprodução pode acarretar vários problemas biológicos para espécie com a perda da capacidade adaptativa dos indivíduos ao ambiente (ALACS; JANZEN; SCRIBNER, 2007; FRANKHAM, 2008; LYNCH, 1996; TEMPLETON, 2011). Segundo Frankham, Ballou e Briscoe (2008) o cruzamento entre duas linhagens de orangotangos geneticamente diferenciadas gerou problemas reprodutivos que não havia nas populações originais.

A metade das espécies de aves do mundo não apresenta dimorfismo sexual dificultando o pareamento correto dos espécimes cativos. A falta de identificação do sexo dos indivíduos pode atrasar ou até mesmo prejudicar programas de reprodução (RASO; WERTHER, 2004). Além disso, em grupos de indivíduos cativos pode ocorrer perda da diversidade genética com conseqüente diminuição da habilidade em responder às mudanças ambientais (ANDRABI; MAXWELL, 2007; FRANKHAM, 2008). Assim, as análises genéticas e a sexagem molecular são de extrema importância para o manejo de espécies cativas, pois permitem eleger os melhores casais para reprodução, principalmente quando os indivíduos não possuem registro genealógico.

Nesse sentido, a Genética da Conservação, que emprega teoria e técnicas genéticas na tentativa de assegurar a diversidade genética das espécies ameaçadas e, dessa forma, garantir o potencial evolutivo da espécie (ALLENDORF; LUIKART, 2007; FRANKHAM, BALLOU; BRISCOE, 2008), pode e deve ser usada para planejar o manejo das espécies em cativeiro. Isto porque, a genética permite identificar e apontar possíveis soluções para os problemas citados acima (DESALLE; AMATTO, 2004; FRANKHAM, BALLOU; BRISCOE, 2008).

As metodologias que utilizam marcadores genéticos são amplamente empregadas em estudos populacionais, evolutivos e de conservação (EIZIRIK, 1996; MATIOLI, 2001). Os marcadores genéticos são características de DNA que diferenciam indivíduos, apresentam herança Mendeliana simples e servem para identificar um local ou uma região nos cromossomos (HILLIS, MORITZ; MABLE, 1996; MATIOLI, 2001). Os microssatélites, também conhecidos como *simple sequence repeats* (SSRs) ou *short tandem repeats* (STR),





são considerados um dos marcadores genéticos mais populares para estudos genéticos populacionais e das relações entre os indivíduos (JONES et al., 2010). São sequências simples de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, possuem alto polimorfismo decorrente das altas taxas de mutação nestes locos, são amplamente distribuídos pelo genoma, apresentam herança Mendeliana e codominância e, são flanqueados por sequências únicas podendo ser facilmente amplificados utilizando *primers* específicos por meio de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) (CHISTIYAKOV et al., 2006; TAUTZ; RENS, 1984).

O uso dessa ferramenta, no entanto, é limitado pela demora e custo elevado para isolamento de locos espécie-específicos (MEDEIROS; CARDOSO; FERREIRA, 2006). Adicionalmente, o genoma das aves apresenta menos locos de microssatélites do que outros organismos, tornando ainda mais difícil a prospecção de locos para esse grupo (PRIMMER et al., 1997). A solução para este inconveniente está no uso de *primers* heterólogos desenvolvidos para espécies filogeneticamente relacionadas à espécie estudada (PRIMMER et al., 2005; SOUZA et al., 2012).

Em Psitacídeos, Hughes et al. (1998) descreveram oito pares de *primers* polimórficos de microssatélites para tuim (*Forpus passerinus*). Os mesmos *primers* foram testados em outras cinco espécies de psitacídeos (*Brotogeris jugularis*, *Aratinga pertinax*, *Aratinga canicularis*, *Aratinga albifrons* e *Amazona auropalliata*), mas todos se mostraram monomórficos. Para o papagaio *Amazona guildingii* Russello et al. (2001) desenvolveram *primers* para nove locos de microssatélites que se mostraram altamente variáveis em outras oito espécies pertencentes aos gêneros *Amazona*, *Ara*, *Aratinga* e *Pionus*. Caparroz, Miyaki e Baker (2003) desenvolveram *primers* para sete locos de microssatélites de *Ara ararauna*, desses, cinco se mostraram polimórficos para a espécie. Presti et al. (2011) testou e avaliou o nível de polimorfismo de 19 pares de *primers* disponíveis na literatura (CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, 2003; GEBHARDT; WAITS, 2008; RUSSELLO et al., 2001; RUSSELLO et al., 2005; SCOTT K. DAVIS *apud* PRESTI et al 2011; TAYLOR; PARKIN, 2007) em cinco espécies de arara, *A. hyacinthinus*, *A. Leari*, *Ara macao*, *Ara chloropterus* e *Cyanopsitta spixii*.

Os SSRs podem fornecer informações valiosas sobre relações de parentesco, paternidade, estimativa de diversidade e origem populacional de indivíduos, dados essenciais para adoção de medidas de conservação *in situ* e *ex situ*, principalmente para espécies ameaçadas de extinção (OLIVEIRA et al., 2006; PRESTI et al, 2011). Por todas as características dos microssatélites, a utilização desse tipo de marcador torna-se adequada para



---

a caracterização genética dos exemplares cativos de arara-azul-grande proposta nesse trabalho.





## 2. Justificativa

A maioria das espécies com representantes em cativeiro são mantidas em pequeno número em zoológicos e criadouros comerciais ou científicos, devido a limitações físicas e/ou financeiras das instituições (BALLOU; LACY, 1995). Adicionalmente, há uma carência de informações genéticas, quanto às relações de parentesco e estimativas de diversidade genética das espécies cativas, com exceção daquelas que possuem um *studbook* - livro de registro de registro genealógico das espécies. A falta desses dados pode prejudicar a execução de um plano de manejo interno e entre instituições quanto aos pareamentos e as trocas de indivíduos. O pequeno número de indivíduos disponíveis para a reprodução contribui para que os exemplares cativos tornem-se similares geneticamente, consequentemente endogâmicos e potencialmente inviáveis (FRANKHAM, 2008; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004).

Quando as populações naturais de uma espécie apresentam diferenças genéticas de acordo com a sua distribuição geográfica, o manejo dos indivíduos cativos da espécie deve considerar a origem geográfica dos mesmos. Pois a reprodução entre espécimes provenientes de linhagens distintas pode acarretar vários problemas biológicos para espécie, com a mistura de conjuntos gênicos adaptados a condições ecológicas locais, além de obscurecer a história evolutiva recente das populações (FRANKHAM, 2008; LYNCH, 1996; TEMPLETON, 2011).

As informações genéticas geradas nesse estudo permitiram responder a provável origem populacional de cada espécime de arara-azul-grande cativo no Estado de São Paulo e quais as relações de parentesco entre eles. Contribuindo para o manejo interno e entre instituições dos espécimes cativos, evitando o pareamento reprodutivo entre indivíduos provenientes das diferentes populações e/ou muito similares geneticamente. Possibilitando a manutenção da diversidade genética e a preservação da história evolutiva das populações naturais de *A. hyacinthinus* em cativeiro.



### 3. Hipóteses

Considerando a existência de populações naturais de arara-azul-grande geneticamente diferenciadas, correspondentes a sua distribuição geográfica, e a falta de informações sobre a procedência dos indivíduos em cativeiro decorrentes de apreensão, esse trabalho teve como hipótese que as todas as populações naturais de *A. hyacinthinus* estão representadas em cativeiro.

Adicionalmente, como o número de exemplares da espécie em cativeiro não representa toda a diversidade genética encontrada nas populações naturais e os pareamentos dos indivíduos para reprodução são realizados, na maioria das vezes, sem considerar o parentesco entre esses, temos como segunda hipótese que os exemplares de arara-azul-grande cativos são relacionados e com alta similaridade genética.



#### 4. Objetivos

Considerando a necessidade em se determinar a provável origem populacional e as relações de parentesco dos espécimes de arara-azul-grande em cativeiro, esse estudo teve como objetivo geral caracterizar geneticamente os indivíduos de *A. hyacinthinus* cativos nos parques zoológicos do Estado de São Paulo, utilizando-se microssatélites.

Com isso, tem-se como objetivos específicos:

1. realizar a sexagem molecular dos espécimes;
2. obter o perfil genético dos indivíduos de arara-azul-grande;
3. determinar a provável origem populacional de cada espécime;
4. estimar o parentesco entre os espécimes cativos e
5. sugerir os melhores casais para o pareamento reprodutivo.



## 5. Material e Métodos

### 5. 1. Amostras

Os espécimes de *A. hyacinthinus* cativos nos parques zoológicos do Estado de São Paulo (Tabela 1) foram amostrados de abril de 2012 a dezembro de 2013. A coleta de material biológico foi realizada com a licença do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). As penas em crescimento cheias de conteúdo celular foram retiradas da parte axial ou peitoral das aves, armazenadas em tubos tipo *ependorf* ou *falcon* com etanol 100% ou em envelopes até a chegada ao laboratório, onde foram acondicionadas em freezer a -20°C até o momento da extração. O sangue foi aspirado com uma seringa lavada com EDTA 0,5M e pH 8 e colocado em tubo tipo *ependorf* acrescido de etanol 100%, armazenado em freezer a -20°C após a chegada ao laboratório.

No total foram amostradas 50 araras-azuis-grande sendo, 29 amostras de sangue (0,3 ml), 20 amostras de pena em crescimento (pena canhão) e uma pena caída no recinto. Os indivíduos de *A. hyacinthinus* receberam um número de registro no laboratório de 1 a 50, de acordo com a ordem de coleta, com intuito de facilitar o processamento das amostras (Apêndice A).

Tabela 1 - Parques zoológicos do Estado São Paulo que abrigam os indivíduos de arara-azul-grande amostrados nesse estudo. Com a sigla e número de indivíduos amostrados em cada instituição.

Instituições	Sigla	Número de indivíduos
Parque Ecológico de São Carlos	PESC	5
Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	10
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	18
Zoológico Municipal de Bauru	ZMB	1
Zoológico Municipal de Piracicaba	ZMP	2
Parque Ecológico Municipal de Leme	PEML	1
Zoológico de Taboão da Serra	ZTB	2
Zoológico Municipal de Sorocaba	ZMSQB	5
Zoológico e Orquidário de Santos	PZOMS	1
Zoológico Municipal de Ribeirão Preto	ZMRP	3
Parque Zoológico Eugênio Walter de Boituva	PZEWB	2
	Total	<b>50</b>



A parte prática desse trabalho foi realizada no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação - LabBMC, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos.

## 5.2. Extração de DNA total

A extração de DNA total seguiu o protocolo baseado em fenol:clorofórmio:álcool isoamílico modificado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (2001). O primeiro passo consistiu em incubar o conteúdo celular das penas ou 40µl de sangue total de cada ave juntamente com 300µl de tampão de lise TNE (Tris-HCl 50mM, pH 8,5 25°C, NaCl 100mM, EDTA 6,3mM pH 7,5 25°C), 15µl de Proteinase K (10mg/µl) e 20µl de SDS 25%. As amostras de penas em crescimento e a pena caída no recito, foram incubadas em banho-maria a 37°C por três e sete dias, respectivamente, com adição diária de 10µl de Proteinase K (10mg/µl) (MIÑO e DEL LAMA, 2009). Já as amostras de sangue, foram incubadas em termobloco a 55°C por 12 a 16 horas.

Após esse passo inicial, aos tubos retirados do termobloco e/ou banho-maria adicionou-se 300µl de Fenol seguido da agitação manual suave por 10 min e centrifugação por 10 min a 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos acrescidos de 300µl da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e os passos de agitação e centrifugação anteriores foram repetidos. Em seguida os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos acrescidos de 300µl da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com a repetição da etapa de agitação e centrifugação. Os sobrenadantes resultantes desse último passo foram transferidos para tubos novos e adicionado Acetato de Sódio 3M (10% do volume final) e Etanol Absoluto gelado (250% do volume final). A mistura foi deixada em freezer a -20°C por uma noite para a precipitação do DNA.

Os precipitados após centrifugação, 20 min a 12.000 rpm, foram lavados duas vezes com 700µl de etanol 70% gelado e centrifugados por 15 min a 12.000 rpm. Após a última lavagem o etanol foi descartado e os tubos deixados à temperatura ambiente para evaporação do mesmo. O DNA foi suspenso em 100µl TE (tris-borato-EDTA) e armazenado em freezer a -20°C.

A quantidade e a integridade do DNA extraído foram verificadas em biofotômetro utilizando 2µl de DNA para 98µl de água MiliQ e em eletroforese com gel de agarose a 1% corado com Gel Red™. Em seguida dois tipos de alíquotas foram feitas, uma solução estoque de DNA (sem diluir) e uma solução com DNA diluído em água MiliQ a 20ng/µl. A solução



com DNA diluído foi utilizada na amplificação dos locos de microsatélites e na sexagem molecular por meio da PCR. As duas alíquotas foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3. Sexagem Molecular

A sexagem das araras-azuis-grande foi realizada pela amplificação do gene CHD-1 (*chromo-helicase-DNA-binding*) presente nos cromossomos sexuais Z e W, método descrito por Griffiths et al. (1998). O gene CHD-Z está presente em ambos os sexos enquanto o gene CHD-W ocorre somente nas fêmeas, que são o sexo heterogamético do sistema ZW. A técnica baseia-se no tamanho dos íntrons presentes em cada gene CHD. Por se tratar de uma região não-codificante, os íntrons são menos conservados apresentando quantidades de pares de base (pb) diferentes entre os sexos. Essa diferença gera tamanhos de fragmentos distintos quando o produto da PCR é visualizado em gel de agarose (Z 300-400pb e W 400-700pb), revelando dois fragmentos do mesmo tamanho para os indivíduos machos e dois fragmentos de tamanhos diferentes para as fêmeas (FRIDOLFSSON; ELLEGREN, 2000; GRIFFITHS, 2000; GRIFFITHS et al., 1998).

A amplificação do DNA foi realizada com os *primers* P2 (5' TCTGCATCGCTAAAT CCTTT 3') e P8 (5' CTCCCAAGGATGAGRAAYTG 3') conforme o protocolo adaptado de Griffiths (1998) em um volume total de 12 $\mu\text{l}$ . Cada reação continha:

- 5 $\mu\text{l}$  de GoTaq (Promega) (mix pronto 1x com 0,20 mM de cada dNTP, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1U Taq DNA),
- 1 $\mu\text{l}$  de cada *primer* (10 mM),
- 0,3 mg/mL de BSA,
- 3,7 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O deionizada e
- 1 $\mu\text{l}$  de DNA (20ng/ $\mu\text{l}$ ).

As condições da PCR foram: desnaturação à  $95^{\circ}\text{C}$  (5 min); seguido de 40 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  (1 min), anelamento a  $43^{\circ}\text{C}$  (30 seg), extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  (30 seg) e extensão final à  $72^{\circ}\text{C}$  (7 min).

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 3% corado com Gel Red™, submetido a corrida durante três horas sob voltagem constante de 110 V, com um controle positivo e um negativo e visualizados em transiluminador de luz UV. As fêmeas, sexo heterogamético, apresentando duas bandas e os machos apenas uma.



#### 5.4. Amplificação dos locos de microssatélites

Além, de um marcador de microssatélites específico para a espécie (HYA1172) (DAVIS *apud* PRESTI, 2011) foram utilizados mais nove locos heterólogos (UnaCT21, UnaCT32, UnaCT43, UnaCT74, UnaGT55, UnaCT41int, AgGT19, Peeμ11, Peeμ 16) (Tabela 2), descritos para outras espécies de psitacídeos, testados na espécie foco por Presti et al. (2011). O método de Schuelke (2000) foi utilizado em todos os pares de *primers*. Nessa metodologia os *primers* não são marcados com fluorescência, mas um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) é acrescido de uma cauda com 18pb M13 (3' TGTAACGACGGCCAGT 5'). Durante a PCR é adicionado um terceiro *primer*, complementar à cauda M13 e marcado com um fluoróforo (FAM, TET ou HEX) (Figura 2).

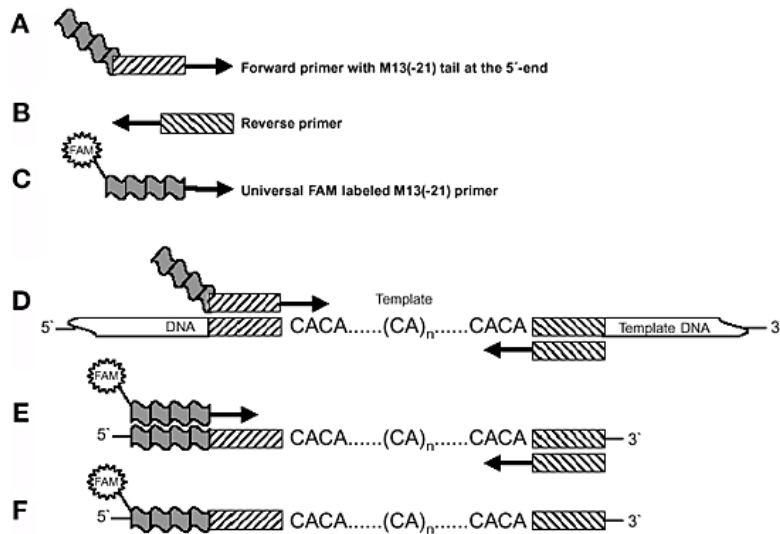
Tabela 2. Locos de microssatélites amplificados para os espécimes cativos de arara-azul-grande. Suas respectivas sequências *forward* (F) e *reverse* (R), repetição, temperatura de anelamento (Ta) e referência.

Loco	Sequência dos <i>primers</i> (5' →3')	Repetição	Ta°C	Referência
<b>UnaCT21</b> (CT21)	F: CTTTCCCATACTTAGCCATA* R: AGACATTTCAAGACCGTGCC	(GT) <sub>n</sub> (CTT)(GT) <sub>n</sub>	58	Caparroz et al., 2003
<b>UnaCT32</b> (CT32)	F: TCTTGCTTATTCTTCCCCAG* R: ACCACCACCAGGAA GCACGG	(GT) <sub>n</sub>	58	Caparroz et al., 2003
<b>UnaCT43</b> (CT43)	F: TCATCCTATCACCA GAA GGG* R: CTTGAGGACA GTGCA GA GGG	(GT) <sub>n</sub>	55	Caparroz et al., 2003
<b>UnaCT74</b> (CT74)	F: CTGGACTGCTGCTCTTAACA* R: AGCCTGAA GTGAA CTGCATG	(GT) <sub>n</sub>	56	Caparroz et al., 2003
<b>UnaGT55</b> (GT55)	F: TCTGCCCTCTGTCTTATGCC* R: ACTTTGGTTTGTCCCTGC	(GT) <sub>n</sub> (AT) <sub>n</sub>	56	Caparroz et al., 2003
<b>UnaCT41int</b> (CT41)	F:CGAACAGCTAACATAAAAAATATTGC* R: CAGAAGCACATGATCTTCATCC	(GT) <sub>n</sub> (ATGTT) (GT) <sub>n</sub>	54	Gebhardt e Waits, 2008
<b>Peeμ11</b>	F: AGATGCAAGGAATGTAAACAC* R: CTCTGCTGCTAGGATAGTTC	(CCAT) <sub>14</sub>	54	Taylor e Parkin, 2007
<b>Peeμ16</b>	F: AGGAGAAAGAAAAGA GATGA C* R: CGTTTGAAGCCTGTGA GAAG	(CCAT) <sub>11</sub>	54	Taylor e Parkin, 2007
<b>AgGT19</b> (GT19)	F: CCTGCCTCCCAAAAAGAACT* R: ATGTATATCAACATTGACTCCTGG	(CA) <sub>22</sub>	54	Russello et al., 2005
<b>HYA 1172</b> (HYA)	F: GATCCTTTGCTTAA GACA GATGTC* R: GAGTGAAATACACATTCA GCTTCTG		56	Davis, não publicado

\*Cauda M13



Figura 3 - Esquema de amplificação com uso da cauda M13.



A) Iniciador *forward* contendo a cauda de 18 pb na extremidade 5'; B) Iniciador *reverse* não alterado. C) Iniciador M13 marcado com o fluoróforo FAM; D) Primeira etapa da PCR: o iniciador *forward* com a cauda M13 é incorporado ao DNA a ser amplificado; E) Segunda etapa a PCR: o iniciador M13 marcado com FAM anela-se a cauda M13 dos fragmentos; F) Os fragmentos finais com o fluoróforo FAM. Fonte: Schuelke (2000).

Os protocolos das reações de PCR e as condições de amplificação foram otimizadas para cada um dos *primers*, variando as concentrações dos componentes (MgCl<sub>2</sub>, DNA, dNTP, *primers* e Taq polimerase) e a temperatura de anelamento, quando necessário. Cada reação continha um volume total de 10µl com os seguintes reagentes:

- 4µl de GoTaq (Promega) (mix pronto 1x com 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq DNA),
- 1µl de cada *primer* (*reverse* e M13 marcado com fluorescência (8mM) e *forward* (2mM)),
- 0,3 mg/mL de BSA,
- 1,7µl de H<sub>2</sub>O deionizada e
- 1µl de DNA (20ng/µl).

As condições de amplificação utilizadas por Presti et al. (2011) foram otimizadas: desnaturação inicial a 95°C (5 min), seguida de 30 ciclos a 95°C (40 seg), anelamento a temperatura específica do par de *primers* (40 seg) e extensão a 72°C (1 min). A seguir, iniciaram-se ciclos com a temperatura ideal de anelamento da sequência da cauda M13 para aumentar a eficácia de sua hibridação aos produtos da PCR, sendo 10 ciclos de desnaturação a 95°C (30 seg), anelamento a 53°C (45 seg), extensão a 72°C (45 seg), extensão final a 72°C (8 min), mantida a 4°C até armazenamento em freezer -20°C.





O rendimento dos produtos da amplificação foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Gel Red™. E posteriormente enviados para genotipagem em sequenciador automático MegaBACE ET-550R Size Standard (*Amersham Biosciences*) pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil). Os eletroferogramas foram analisados com o programa *MegaBace™ Fragment Profiler* (GE Healthcare Life Science). E os genótipos de locos polimórficos obtidos foram utilizados para a realização das análises estatísticas.

Vale informar que o DNA disponível do espécime 3 não foi suficiente para amplificação de todos os locos de microssatélites empregados nesse trabalho, exceto para a sexagem molecular todas as análises genéticas foram realizadas com 49 espécimes de *A. hyacinthinus*.

## **5.5. Análise Estatística dos Dados**

### **5.5.1. Identificação de erros de genotipagem**

O programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi utilizado para identificar possíveis erros de leitura dos eletroferogramas, além de verificar a presença de amplificação alelo-diferencial e alelos nulos. O programa faz a reamostragem dos alelos presentes em cada loco, gerando um intervalo de confiança da frequência esperada de homozigotos e heterozigotos para cada classe de alelo. Após, gera a probabilidade combinada baseada no teste exato de Fisher. Por último, são identificadas as proporções de desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e a sua relação com a presença de falsos alelos, amplificação alelo-diferencial e alelos nulos. No método desenvolvido por Van Oosterhout et al. (2004), e utilizado aqui, a presença de falsos alelos é evidenciada pela baixa frequência de heterozigotos diferindo em uma unidade repetitiva em relação ao tamanho esperado e, quando há um excesso de homozigotos de tamanho elevado. A ocorrência de falsos alelos é maior para alelos de tamanho maiores. A amplificação alelo-diferencial é caracterizada pelo excesso de homozigotos em um dos extremos da distribuição das classes de alelos ou quando há uma generalidade de homozigotos com amplitude de amplificação alélica ultrapassando 150pb. A detecção de um excesso significativo de homozigotos, com distribuição uniforme entre as classes de alelos indica a presença de alelos nulos. A ferramenta também considera outros tipos de erros que podem levar a um excesso de homozigotos, como a possível presença de endogamia, Efeito Wahlund e desvios do Equilíbrio Hardy-Weinberg (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Os outros dois métodos disponíveis no programa, Chakraborty (CHAKRABORTY et al., 1992) e Brookfield (1 e 2)



(BROOKFIELD, 1996), correlacionam o déficit de heterozigotos à presença alelos nulos, sem considerar erros de genotipagem ou características biológicas do conjunto amostral.

### **5.5.2. Caracterização dos locos de microssatélites**

O número de alelos ( $N_a$ ) e o número efetivo de alelos ( $A_e$ ) em cada loco foram estimados pelo programa GenAlex 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). O programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995) foi utilizado na obtenção da diversidade gênica (NEI, 1987) e da riqueza alélica (PETIT et al., 1998). Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e de equilíbrio de ligação entre os pares de locos foram estimado pelo programa Genepop 4.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A correção de Bonferroni (RICE, 1989) foi utilizada para confirmar as significâncias dos resultados encontrados em todos os testes realizados, corrigindo os intervalos de confiança.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), que indica a qualidade do marcador genético para estudos, como de identificação de populações e controle de paternidade, foi calculado no programa Cervus v.3.0 (MARSHALL et al., 1998). Os marcadores genéticos são classificados de acordo com seus valores de PIC em: (i) muito informativos ( $PIC > 0,5$ ), (ii) razoavelmente informativos ( $0,5 > PIC > 0,25$ ) e (iii) pouco informativos ( $PIC < 0,25$ ) (BOTSTEIN et al., 1980).

### **5.5.3. Atribuição populacional**

Os dados das populações naturais de arara-azul-grande foram gentilmente cedidos pela Dra. Flávia Torres Presti e pela professora Dra. Cristina Yumi Miyaki.

Os genótipos de 103 indivíduos de arara-azul-grande, das populações naturais de diferentes localidades geográficas (Pantanal Norte (PN), Pantanal Sul (PS), região Norte (N) e região Nordeste (NE)) (PRESTI, 2006, 2010) para os mesmos 10 locos de microssatélites empregados neste trabalho foi utilizada para os testes de atribuição populacional dos espécimes de arara-azul-grande cativos nos parques zoológicos do Estado de São Paulo. Para isso, foi necessária a padronização do tamanho dos picos dos alelos de cada loco de microssatélite, já que os eletroferogramas foram obtidos em sequenciadores automáticos diferentes. O DNA de nove indivíduos das populações naturais foi amplificado para os 10 locos de microssatélites, seguindo as mesmas reações de PCR e condições de amplificação as quais foi submetido o DNA dos indivíduos foco desse estudo. Após a verificação do rendimento dos produtos da PCR em gel de agarose 1,5%, estes foram enviados à empresa



DNA Consult (São Carlos, SP) para serem genotipados em sequenciador automático MegaBACE ET-550R Size Standard (Amersham Biosciences). Os eletroferogramas originários foram analisados com o programa *MegaBace TM Fragment Profiler* (GE Healthcare Life Science).

A matriz contendo os genótipos de 152 indivíduos de arara-azul-grande (49 espécimes cativos (EC), 24 do Pantanal Norte (PN), 42 do Pantanal Sul (PS), 19 da região Norte (N) e 18 da região Nordeste (NE)) foi submetida ao programa Structure 2.3.4 (PRITCHARD, 2000) a fim de visualizar a quais populações naturais os indivíduos cativos se agrupam. A análise é realizada por meio do método bayesiano de agrupamento, com reamostragens pelo algoritmo Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). O programa assume a existência de conjuntos gênicos/populações (K) com diferentes frequências alélicas em cada loco em um conjunto de genótipos multilocos. O número de conjuntos gênicos é inferido minimizando possíveis desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação (LD). Cada indivíduo amostrado é então atribuído, probabilisticamente, para uma ou mais populações, caso seu genótipo indique uma mistura de conjuntos gênicos.

Os parâmetros utilizados na análise foram: 500.000 passos de *burn-in* e 1.000.000 MCMC, com 10 réplicas de cada simulação, com k variando de 1 a 6 para inferir sobre o número de conjuntos gênicos presentes no conjunto amostral. Utilizamos também os mesmos parâmetros citados acima com k=4 (PN, PS, N e NE) e depois k=3 (PN, PS, N+NE) de acordo com o número de populações de arara-azul-grande conhecido na natureza (PRESTI, 2006, 2010). Os modelos adotados foram: (i) modelo *admixture* onde o genoma de cada indivíduo pode ter frações variáveis de cada uma das populações e (ii) o modelo de frequências alélicas correlacionados, que pressupõe as frequências alélicas das populações podem ser parecidas porque divergiram recentemente de um ancestral comum (PRITCHARD, 2000). Após, programa Structure Harvester (EARL, VONHOLDT, 2012) foi utilizado para a visualização do número de K contido no conjunto amostral pelo método de Pritchard (2000), onde o maior valor de  $\ln(P(X|K))$  (probabilidade de observar os dados (X) condicionada ao número de populações (K)) equivale ao número de populações, e Evanno et al.(2005), por meio de uma estatística fundamentada no delta K, que se baseia na taxa de mudança no  $\ln(P(X|K))$  entre sucessivos valores de K.

A análise fatorial de correspondência (AFC), presente no programa GENETIX 4.05.2 (BELKHIR et al, 2004), foi utilizada para visualização, em gráfico 3D, das relações populacionais entre indivíduos com base nas frequências alélicas de todos os locos de microssatélite.



Os programas GeneClass 2 (PIRY et al., 2004) e Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) foram utilizados para realizar a atribuição genética ou exclusão dos indivíduos cativos estudados às populações de referência (populações naturais), com base em genótipos multilocos.

O programa GeneClass pode realizar a atribuição de cada indivíduo a sua população de referência por meio de três métodos: (i) distância genética, no qual se calcula a distância genética entre o indivíduo ou grupo de indivíduos a ser atribuído e cada população de referência (CORNUET et al., 1999 ); (ii) bayesianos, onde os genótipos multilocus são utilizados para o cálculo, por derivação, da probabilidade da densidade da frequência alélica da população a partir das frequências da amostra populacional (RANNALA; MOUNTAIN, 1997) e (iii) frequências alélicas, onde é realizado o cálculo da frequência esperada do genótipo de cada indivíduo em cada uma das populações de referência, com posterior atribuição de cada indivíduo para a população, onde a frequência esperada do seu genótipo foi maior (PAETKAU et al., 1995). As distribuições das frequências alélicas para cada população são modificadas antes da atribuição, com adição dos alelos de cada indivíduo que não foi incluído nessas populações, alelos encontrados em indivíduos a serem atribuídos, mas não no conjunto de dados de referência, têm suas frequências ajustadas para um valor ajustável padrão (por exemplo, 0,01). Essas modificações eliminam a tendência de inclusão do genótipo de cada indivíduo na distribuição de alelos para a sua população e frequências genotípicas iguais a zero, quando um indivíduo tem um alelo raro que não está presente na distribuição dos alelos de uma determinada população (PAETKAU et al., 2004).

Os métodos de alocação por frequências alélicas e bayesiano foram escolhidos para realizar a atribuição populacional dos espécimes cativos de arara-azul-grande, por serem considerados mais eficientes do que o método baseado nas distâncias (CORNUET et al., 1999). Foi utilizado um limite de atribuição de 0,05, com reamostragens pelo algoritmo MCMC (PAETKAU et al. 2004), com 10.000 indivíduos simulados e erro do tipo I igual 0,01.

Já o programa Arlequin realiza a atribuição dos indivíduos pelo *assignment test*. O método consiste na determinação da verossimilhança de cada um dos genótipos multilocus de um indivíduo em cada população, assumindo que o indivíduo pertence a essa população. A probabilidade é calculada de acordo com as frequências alélicas estimadas em cada população a partir da constituição original das amostras, assumindo que todos os locos são independentes. Cada indivíduo é atribuído à população para a qual o logaritmo da probabilidade de sua frequência genotípica esperada foi maior (PAETKAU et al., 1995, 1997;



WASER; STROBECK, 1998). Os genótipos dos 152 indivíduos de arara-azul-grande (populações naturais e espécimes cativos) foram inseridos no programa e agrupados de acordo com o agrupamento dos indivíduos mostrado pelo programa Structure, para depois serem alocados.

A provável população natural de cada espécime cativo de arara-azul-grande só foi determinada quando os resultados dos três métodos de atribuição populacional e da análise bayesiana de agrupamento foram concordantes.

O programa Genalex 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado para visualizar em gráficos de -log-verossimilhança a alocação dos indivíduos cativos às populações de referência. A atribuição dos indivíduos nesse caso é realizada pelo método baseado nas frequências alélicas segundo Paetkau et al. (1995, 1997).

#### **5.5.4. Parentesco e sugestão dos melhores casais para reprodução**

A fim de conhecer o poder de discriminação dos locos de microssatélites utilizados nesse estudo, foram estimadas as probabilidades combinadas de identidade (PI) e de exclusão (PE) pelo programa GenAlex 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Sendo PI a probabilidade média de que dois indivíduos não relacionados retirados ao acaso da mesma população compartilhem o mesmo genótipo multiloco (PAETKAU et al., 1995) e PE para as três situações encontradas no conjunto amostral estudado: (i) PE1 a probabilidade de exclusão quando ambos os pais são conhecidos, (ii) PE2 probabilidade de exclusão conhecendo um dos pais e (iii) PE3 a probabilidade de exclusão não conhecendo nenhum dos pais.

A maioria dos métodos disponíveis para as estimativas de parentesco baseia-se na identidade-por-descendência (IBD - *Identity by Descent*), onde dois alelos são idênticos quando descendem recentemente de um mesmo alelo ancestral (QUELLER; GOODNIGHT, 1989). Dessa forma, temos o coeficiente de parentesco ( $r$ ) entre dois indivíduos (X e Y) como a probabilidade de que um alelo, tomado ao acaso do indivíduo X seja idêntico-por-descendência ao alelo do indivíduo Y (FALCONER; MACKAY, 1996; LYNCH; WALSH, 1998). O parentesco entre dois indivíduos pode ser inferido por meio de duas categorias de estimadores: (i) o método “momentum”, uma quantidade contínua definida em termos de probabilidade por IBD (LYNCH; RITLAND, 1999; QUELLER; GOODNIGHT, 1989; RITLAND, 1996;) e (ii) o método de verossimilhança, que determina a probabilidade de um determinado relacionamento (pai e filho, irmãos completos, meio irmãos e etc.) entre dois



indivíduos (MARSHALL et al., 1998; QUELLER; GOODNIGHT, 1999; THOMAS; HILL, 2000).

Considerando que na literatura não há um consenso quanto ao melhor estimador de parentesco e que estimadores diferentes se encaixam melhor a uma dada composição do conjunto amostral (como por exemplo, dados faltantes, endogamia, tipo de relacionamento presente entre os indivíduos, falta de conhecimento sobre a espécie estudada e etc.) e à capacidade informativa do marcador utilizado (números de locos e variabilidade desses) (CSILLERY et al., 2006; WANG, 2007; WANG, 2011) o programa Coancestry 1.0.1.2 (WANG, 2011) foi utilizado para comparar o desempenho dos estimadores de parentesco e determinar qual o mais adequado para o conjunto amostral estudado.

As frequências alélicas dos espécimes cativos de arara-azul-grande foram utilizadas na simulação de genótipos para a comparação dos estimadores de parentesco. O programa compara o desempenho de sete estimadores disponíveis na literatura, sendo cinco estimadores “momentum”: (1) Li, Weeks e Chakravarti (1993) e Lynch (1998), (2) Lynch e Ritland (1999), (3) Queller e Goodnight (1989), (4) Ritland (1996) e (5) Wang (2002); e dois de verossimilhança: (6) verossimilhança triádico (TML) (WANG, 2007) e (7) método diádico (MILLIGAN, 2003). Depois de identificado qual o estimador que melhor se adequa aos dados estudados, os genótipos e frequências alélicas do grupo de indivíduos cativos de *A. hyacinthinus* foram submetidos ao programa que gerou o valor de  $r$  para cada par de indivíduos.

O suposto relacionamento, pai e filho (*Parent/Offspring-PO*), irmão completo (*Full Sibs-FS*), meio-irmão (*Half Sibs-HS*) e não relacionado (*Unrelated-UN*), entre os pares de indivíduos foi estimado por meio de simulações e uma abordagem de máxima verossimilhança pelo programa ML-Relate (KALINOWSKI; WAGNER; TAPER, 2006), que possibilita a correção das frequências dos locos que apresentam alelos nulos. Testes de hipóteses foram realizados para os pares de indivíduos em que o suposto relacionamento detectado pela verossimilhança (programa ML-Relate), considerado a hipótese putativa, não era coincidente com as informações prévias de parentesco ou com os valores de  $r$  encontrados pelos estimadores (programa Coancestry), considerados a hipótese nula. A hipótese putativa é considerada mais concordante com os dados genéticos quando o valor de  $p$  é pequeno ( $p < 0,5$ ) e um valor de  $p$  maior não permite a rejeição da hipótese nula. Todas as provas foram realizadas com 10.000 permutações de genótipos/relacionamento.

Os valores de corte para se distinguir entre categorias de relacionamento foi de 0,5 para parentes em primeiro-grau (FS e PO), 0,25 para parentes em segundo-grau (HS) e 0 para



não relacionados (UN) (RUSSELLO; AMATO, 2004). A classificação final do provável relacionamento entre os espécimes estudados só foi estabelecida quando o valor de  $r$  e o tipo de relacionamento encontrado para cada par de indivíduos foram coincidentes.

A similaridade entre os genótipos multiloco de dois indivíduos foi calculada por meio da proporção ( $P_S$ ) de alelos que eles compartilham em média por locos (BOWCOCK et al. 1994, RAMIREZ et al., 2006): A proporção de alelos partilhados foi calculada segundo a fórmula:

$$P_S = \frac{\sum_u S}{2u}$$

em que  $S$  é o número de alelos compartilhados em todos os locos e  $u$  corresponde aos locos comparados. Os valores de  $P_S$  para os pares de indivíduos foram classificados em baixo, intermediário e alto, por meio da divisão do intervalo encontrado para  $P_S$  em categorias.

Os melhores casais para reprodução foram sugeridos considerando a parentesco mais provável entre os espécimes, a similaridade genética entre os pares de indivíduos e a provável origem geográfica de cada espécime.





## 6. Resultados

### 6. 1. Amostras e extração do DNA total

Durante o desenvolvimento desse estudo o espécime 3 cativo no PESC (Apêndice A) veio a óbito. O DNA disponível do espécime não foi suficiente para amplificação de todos os locos de microssatélites empregados nesse trabalho. O DNA desse indivíduo foi obtido de uma única pena caída no recinto da ave, gerando uma quantidade de DNA menor do que dos outros materiais biológicos amostrados. Assim, um total de 49 araras-azuis-grande tiveram seu DNA amplificado para os 10 locos de microssatélites.

O protocolo utilizado para extração de DNA total resultou na obtenção de DNA íntegro e em alta quantidade, exceto para o espécime citado acima. Não houve diferenças significativas no rendimento do DNA obtido do tecido das penas em crescimento e do obtido das amostras de sangue. A quantificação de DNA das amostras de pena em crescimento variou de 80 a 3482 ng/ $\mu$ l e das amostras de sangue de 70 a 3000 ng/ $\mu$ l.

### 6. 2. Sexagem molecular

A sexagem molecular apresentou 100% de sucesso e foi possível determinar o sexo de todas as aves (Figura 4), inclusive do espécime 3. O resultado da sexagem molecular indicou um total de 29 fêmeas e 21 machos (Tabela 3). Antes da realização desse estudo o sexo de quatro das cinco araras-azuis do ZMSQB e de uma das três aves do ZMRP não era conhecido. E duas aves, cativas no PESC e no PZOMS, tinham o sexo determinado erroneamente (Tabela 3).

Figura 4 - Foto do gel de agarose 3% com o resultado da amplificação da sexagem molecular. Com fêmeas (♀) apresentando duas bandas (300 e 400pb) e machos (♂) uma única banda (300pb).

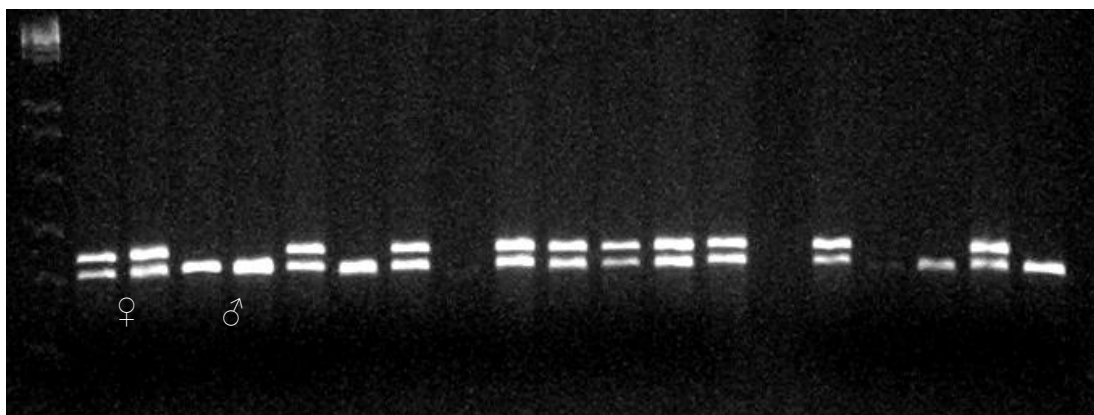






Tabela 3 - Resultado da sexagem molecular das 50 araras-azuis-grande amostradas nesse estudo. Número de registro de coleta de cada espécime, sigla da instituição a qual o espécime pertence, sexo informado pela instituição (fêmea (F), macho (M) e indeterminado (I)) e sexo de acordo com a sexagem molecular realizada pela técnica descrita por Griffiths et al. (1998).

ID dos espécimes	Sigla da Instituição	Sexo informado	Sexagem molecular
1	PESC	F	F
2	PESC	F	F
3 <sup>#</sup>	PESC	-	M
4	PEMA	F	F
5	PEMA	M	M
6	PEMA	F	F
7	PEMA	F	F
8	PEMA	F	F
9	PEMA	M	M
10	FPZSP	F	F
11	FPZSP	F	F
12	FPZSP	M	M
13	FPZSP	F	F
14	FPZSP	F	F
15	FPZSP	F	F
16	FPZSP	M	M
17	FPZSP	F	F
18	FPZSP	M	M
19	PEML	M	M
20	ZMB	M	M
21	PEMA	M	M
22	PEMA	F	F
23	PEMA	M	M
24	PEMA	F	F
25	ZMPira	M	M
26	ZMPira	F	F
27	FPZSP	F	F
28	FPZSP	F	F
29	FPZSP	M	M
30	FPZSP	F	F
31	FPZSP	F	F
32	FPZSP	F	F
33	FPZSP	F	F
34	FPZSP	M	M
35	FPZSP	M	M
36**	PESC	M	F
37	PESC	M	M
38*	ZMSQB	I	F
39*	ZMSQB	I	M
40	ZMSQB	M	M
41*	ZMSQB	I	F
42*	ZMSQB	I	F
43	ZMTS	M	M



44	ZMTS	F	F
45**	PZOMS	M	F
46	PZMB	M	M
47	PZMB	F	F
48	ZMRP	F	F
49*	ZMRP	I	F
50	ZMRP	M	M

# indivíduo veio a óbito durante o desenvolvimento do estudo; \* indivíduos sem determinação do sexo e \*\* indivíduos com determinação do sexo errada

### 6.3. Caracterização dos locos de microssatélite e identificação de erros de genotipagem

Os 10 locos de microssatélites (HYA, CT21, CT32, CT43, CT74, GT55, CT41, GT19, Pee11 e Pee16) apresentaram sucesso na amplificação por meio da PCR. Os locos apresentaram de dois a sete alelos (Tabela 4) e somente o loco HYA apresentou evidência de alelos nulos. A heterozigosidade observada em cada loco variou de 0,146 (CT43) a 0,837 (CT21), com média entre todos os locos de 0,508. E a heterozigosidade esperada em cada loco variou de 0,174 (CT43) a 0,644 (CT21), com média entre todos os locos de 0,492 (Tabela 4). A diversidade gênica variou de 0,176 (CT43) a 0,648 (CT21 e Pee11), com média em todos os locos de 0,497 e a riqueza alélica variou de 2 (CT32, Pee16 e HYA) a 6,896 (CT74), com média de 3,5761 (Tabela 4). Nove locos foram considerados muito informativos ( $PIC > 0,5$ ) e somente o loco CT43 razoavelmente informativo ( $0,5 > PIC > 0,25$ ) (Tabela 4). Todos os locos estão em equilíbrio de ligação e nenhum apresenta desvios do EHW, podendo assim ser considerados marcadores independentes.

Tabela 4 - Estimativas de diversidade genética dos indivíduos cativos de arara-azul-grande baseada em 10 locos de microssatélites. Loco, número de indivíduos analisados em cada loco (N), número de alelos (Na), número efetivo de alelos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), diversidade gênica (DG) de acordo com Nei (1987), riqueza alélica (Ra), conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Loco	N	Na	Ne	Ho	He	DG	Ra	PIC
CT21	49	5	2,807	0,837	0,644	0,648	4,878	0,723
CT32	43	2	1,757	0,442	0,431	0,436	2,000	0,607
CT43	48	3	1,210	0,146	0,174	0,176	2,999	0,497
GT19	49	3	2,264	0,653	0,558	0,563	3,000	0,641
CT74	48	7	2,711	0,646	0,631	0,638	6,896	0,744
Pee11	48	6	2,786	0,625	0,641	0,648	5,988	0,748
Pee16	49	2	1,534	0,367	0,348	0,352	2,000	0,573
CT41	49	3	2,305	0,592	0,566	0,572	3,000	0,714
GT55	49	3	2,196	0,592	0,545	0,550	3,000	0,652
HYA	49	2	1,613	0,184	0,380	0,386	2,000	0,633
<b>Média</b>		<b>3,6</b>	<b>2,118</b>	<b>0,508</b>	<b>0,492</b>	<b>0,497</b>	<b>3,576</b>	<b>0,653</b>



## 6.5. Atribuição populacional

A análise bayesiana realizada pelo Structure revela que a maioria dos espécimes cativos de *A. hyacinthinus* desse estudo agrupam-se às populações naturais N e NE e o restante dos indivíduos podem ter vindo das populações PN e PS, ou ainda serem filhos de indivíduos de regiões diferentes, já que apresentam proporções de cores de mais de uma população (Figuras 5 e 6). A estimativa do número de populações, pelo método de Pritchard (2000) e de Evanno et al.(2005), indica a presença de três conjuntos gênicos  $k=3$  (Figura 7 e 8) correspondentes as populações PN, PS, N+NE+EC (Figura 6).

Figura 5 - Gráfico gerado pelo programa Structure com  $k=4$  (Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), região Norte (N) e região Nordeste (NE)) e os espécimes cativos de arara-azul-grande estudados (EC). Cada indivíduo é representado por uma barra com diferentes proporções das quatro cores que representam os quatro conjuntos gênicos naturais de arara-azul-grande.

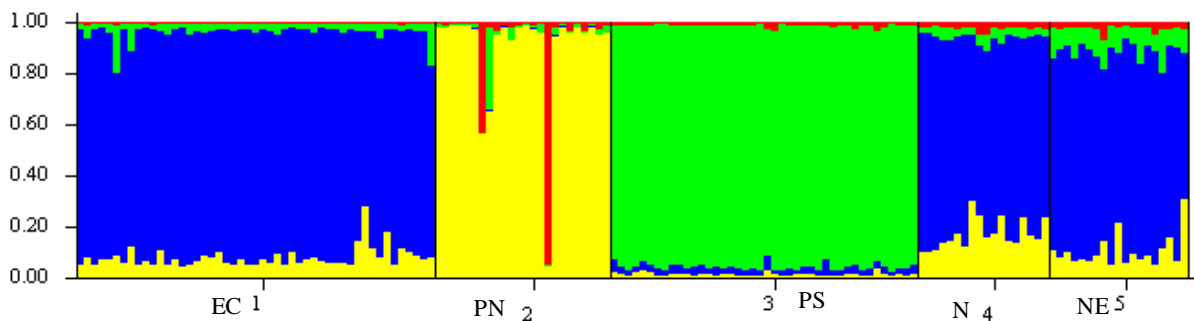


Figura 6 - Gráfico gerado pelo programa Structure com  $k=3$  (Pantanal norte (PN), Pantanal sul (PS), Norte e Nordeste (N+NE)) e os espécimes cativos de arara-azul-grande estudados (EC). Cada indivíduo é representado por uma barra com diferentes proporções das três cores que representam os três conjuntos gênicos naturais de arara-azul-grande.

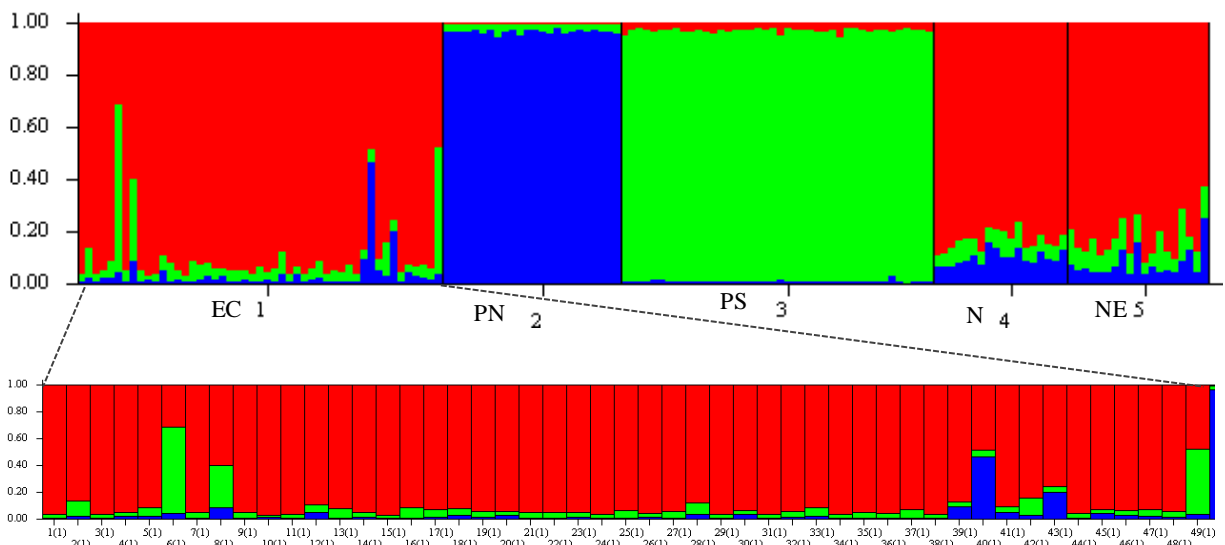




Figura 7 - Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Pritchard (2000).

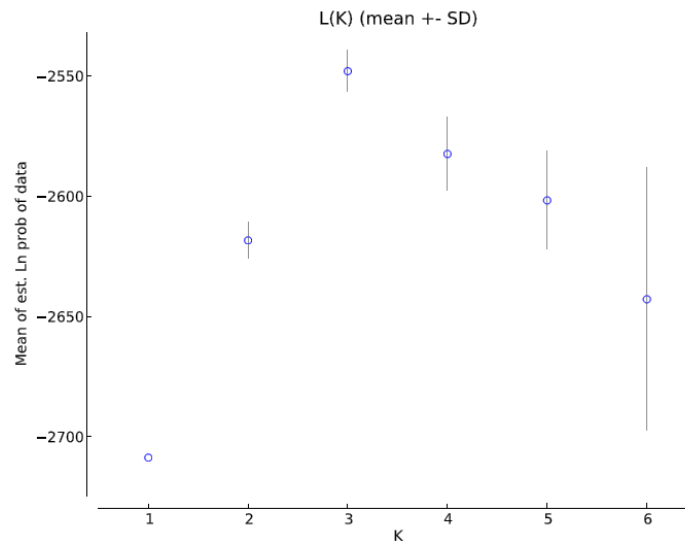
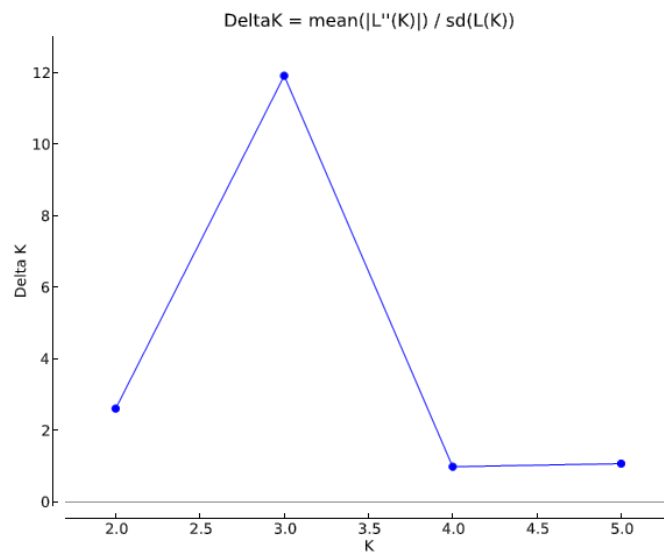


Figura 8 - Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Evano (2005).



Análise fatorial de correspondência (AFC) corrobora os resultados encontrados pela análise bayesiana acima, com a maioria dos indivíduos cativos de arara-azul-grande e as populações naturais N e NE na região central da distribuição e marginalmente as populações PN e PS (Figuras 9 e 10). Com o gráfico com três conjuntos gênicos (PN, PS, N+NE) explicando melhor a distribuição dos indivíduos cativos entre as populações naturais (Figura 9). Em ambos os gráficos gerados pelo programa, três ou quatro conjuntos gênicos juntamente com os espécimes cativos, quatro fatores explicam 100% da diversidade genética encontrada no conjunto amostral.



Figura 9 - Análise fatorial de correspondência demonstrando o padrão de distribuição espacial das populações naturais de arara-azul-grande (PN, PS, N e NE) e dos espécimes cativos (EC) da espécie. Cada indivíduo das populações naturais e os desse estudo são representados por cores: azul população PN, branco população PS, cinza população N, rosa população NE e amarelo EC.

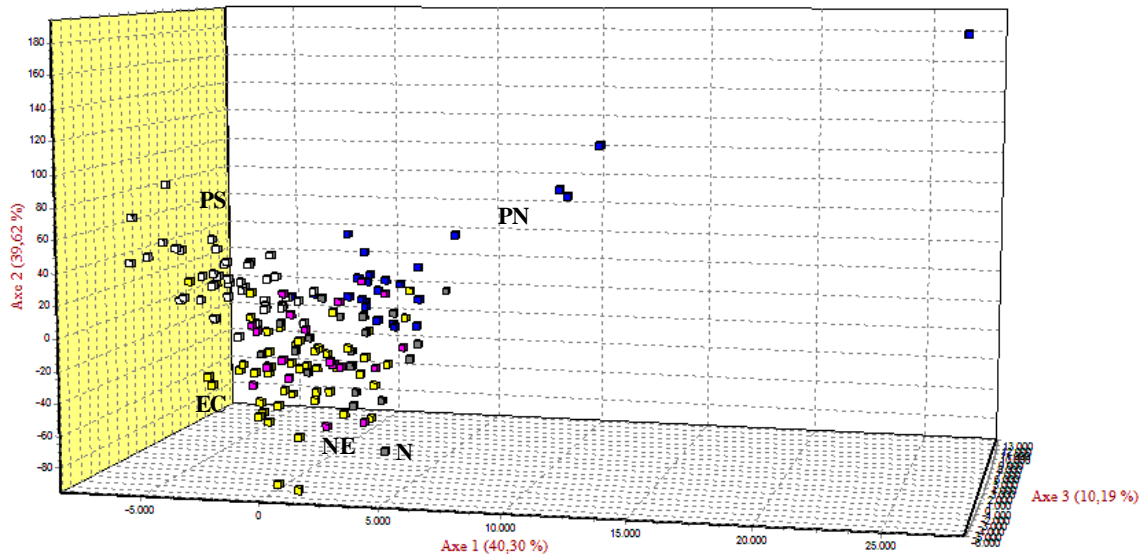
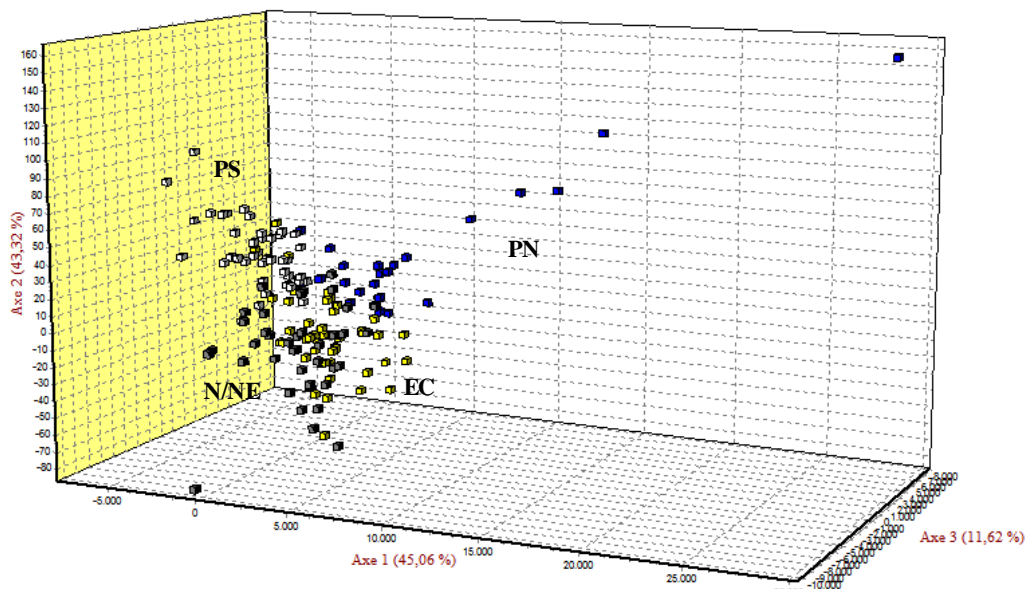


Figura 10 - Análise fatorial de correspondência demonstrando o padrão de distribuição espacial das populações naturais de arara-azul-grande (PN, PS, N+NE) e dos espécimes cativos (EC) da espécie. Cada indivíduo das populações naturais e os desse estudo são representados por cores: branco população PN, cinza população PS, azul população N+NE e amarelo EC.



Os resultados da atribuição populacional realizada pelos métodos de frequências alélicas (PAETKAU et al., 1995, 2004), bayesiano (RANNALA; MOUNTAIN, 1997) e verossimilhança (PAETKAU et al., 1995, 1997; WASER; STROBECK, 1998) considerando



três e quatro populações naturais estão expressos em tabelas (Tabelas 5 e 6). Os resultados da análise bayesiana de agrupamento com  $k=3$  (Figura 6) também foram inseridos na tabela 3, com intuito de melhorar a interpretação de resultados discordantes entre os métodos utilizados na atribuição, já que o gráfico da análise mostra quando os indivíduos apresentam proporções dos diferentes conjuntos gênicos. A atribuição populacional considerando três conjuntos gênicos naturais permitiu indicar a possível origem populacional de 87,75% dos espécimes cativos de *A. hyacinthinus*, contra 55,10% na atribuição com quatro conjuntos gênicos.

Tabela 5 - Resultado da atribuição populacional de cada espécime cativo de arara-azul-grande (EC). Realizada pelos métodos de verossimilhança, frequências alélicas e bayesiano, considerando três conjuntos gênicos naturais: Pantanal Norte (PN), Pantanal Sul (PS) e Norte+Nordeste (N+NE), resultado da análise bayesiana de agrupamento com  $k=3$  e provável origem populacional de cada espécime cativo.

EC	Verossimilhança (Arlequin)			Frequências alélicas (GeneClass2)			Bayesiano (GeneClass2)			Análise de agrupamento	Provável pop
	PN	PS	N+NE	PN	PS	N+NE	PN	PS	N+NE		
1	-38,359	-23,728	<b><u>-19,884</u></b>	0,002	0,003	<b><u>0,156</u></b>	0,022	0,004	<b><u>0,193</u></b>	N+NE	N+NE
2	-24,507	-21,283	<b><u>-19,518</u></b>	0,033	0,020	<b><u>0,052</u></b>	0,104	0,024	<b><u>0,187</u></b>	N+NE	N+NE
4	-40,665	-27,586	<b><u>-17,154</u></b>	0,002	0,001	<b><u>0,161</u></b>	0,010	0,001	<b><u>0,346</u></b>	N+NE	N+NE
5	-17,648	-20,442	<b><u>-10,267</u></b>	0,246	0,033	<b><u>0,937</u></b>	0,522	0,032	<b><u>0,971</u></b>	N+NE	N+NE
6	-17,772	-16,511	<b><u>-13,874</u></b>	0,261	0,267	<b><u>0,513</u></b>	0,412	0,162	<b><u>0,669</u></b>	N+NE	N+NE
7	-25,461	<b><u>-14,499</u></b>	-22,727	0,049	<b><u>0,189</u></b>	0,008	0,135	<b><u>0,265</u></b>	0,085	PS	PS
8	-41,441	-38,521	<b><u>-25,034</u></b>	0,046	0,012	<b><u>0,237</u></b>	0,072	0,005	<b><u>0,247</u></b>	N+NE	N+NE
9	-30,121	-26,129	<b><u>-21,828</u></b>	0,379	<b><u>0,432</u></b>	0,292	<b><u>0,589</u></b>	0,476	0,465	PN/PS/N+NE	PN/PS/N+NE
10	-24,494	-13,549	<b><u>-10,988</u></b>	0,060	0,286	<b><u>0,880</u></b>	0,186	0,335	<b><u>0,934</u></b>	N+NE	N+NE
11	-24,024	-20,348	<b><u>-13,185</u></b>	0,071	0,035	<b><u>0,604</u></b>	0,208	0,027	<b><u>0,742</u></b>	N+NE	N+NE
12	-40,618	-38,944	<b><u>-17,776</u></b>	0,002	0,000	<b><u>0,122</u></b>	0,012	0,000	<b><u>0,299</u></b>	N+NE	N+NE
13	-16,974	-16,427	<b><u>-11,951</u></b>	0,327	0,276	<b><u>0,776</u></b>	0,616	0,153	<b><u>0,862</u></b>	N+NE	N+NE
14	-24,690	<b><u>-13,926</u></b>	-15,581	0,057	0,243	<b><u>0,298</u></b>	0,150	0,300	<b><u>0,500</u></b>	N+NE	N+NE
15	-17,661	-13,732	<b><u>-10,575</u></b>	0,268	0,265	<b><u>0,916</u></b>	0,556	0,316	<b><u>0,959</u></b>	N+NE	N+NE
16	-31,550	-25,582	<b><u>-14,344</u></b>	0,012	0,001	<b><u>0,447</u></b>	0,073	0,001	<b><u>0,614</u></b>	N+NE	N+NE
17	-30,838	<b><u>-13,668</u></b>	-15,458	0,017	0,272	<b><u>0,313</u></b>	0,061	0,325	<b><u>0,510</u></b>	N+NE	N+NE
18	-16,205	-11,701	<b><u>-9,429</u></b>	0,367	0,538	<b><u>0,974</u></b>	0,652	0,584	<b><u>0,992</u></b>	N+NE	N+NE
19	-27,160	-26,665	<b><u>-20,396</u></b>	0,027	0,003	0,032	0,075	0,001	<b><u>0,143</u></b>	N+NE	N+NE
20	-32,325	-24,308	<b><u>-19,607</u></b>	0,010	0,002	0,049	0,039	0,003	<b><u>0,183</u></b>	N+NE	N+NE
21	-28,721	-28,070	<b><u>-18,007</u></b>	0,032	0,001	<b><u>0,110</u></b>	0,082	0,001	<b><u>0,273</u></b>	N+NE	N+NE
22	-30,895	-22,132	<b><u>-15,853</u></b>	0,017	0,012	<b><u>0,271</u></b>	0,053	0,013	<b><u>0,463</u></b>	N+NE	N+NE
23	-28,577	-15,607	<b><u>-13,299</u></b>	0,017	0,110	<b><u>0,587</u></b>	0,070	0,169	<b><u>0,724</u></b>	N+NE	N+NE
24	-18,734	-17,019	<b><u>-12,046</u></b>	0,179	0,049	<b><u>0,764</u></b>	0,414	0,098	<b><u>0,855</u></b>	N+NE	N+NE
25	-35,696	-25,727	<b><u>-21,830</u></b>	0,003	0,001	<b><u>0,064</u></b>	0,027	0,001	<b><u>0,106</u></b>	N+NE	N+NE
26	-38,634	-20,120	<b><u>-19,782</u></b>	0,002	0,005	<b><u>0,164</u></b>	0,021	0,028	<b><u>0,210</u></b>	N+NE	N+NE
27	-17,998	-16,384	<b><u>-10,221</u></b>	0,225	0,073	<b><u>0,939</u></b>	0,488	0,130	<b><u>0,974</u></b>	N+NE	N+NE
28	-34,750	-23,672	<b><u>-15,674</u></b>	0,010	0,024	<b><u>0,288</u></b>	0,038	0,009	<b><u>0,489</u></b>	N+NE	N+NE
29	-18,799	-13,936	<b><u>-13,883</u></b>	0,175	0,242	<b><u>0,512</u></b>	0,414	0,299	<b><u>0,669</u></b>	N+NE	N+NE
30	-47,837	-43,819	<b><u>-27,108</u></b>	0,001	0,000	0,001	0,003	0,000	0,017	N+NE	N+NE
31	-16,807	-20,544	<b><u>-12,004</u></b>	0,309	0,030	<b><u>0,770</u></b>	0,603	0,025	<b><u>0,860</u></b>	N+NE	N+NE
32	-44,106	-43,478	<b><u>-28,131</u></b>	0,009	0,000	<b><u>0,054</u></b>	0,042	0,001	<b><u>0,085</u></b>	N+NE	N+NE
33	-16,568	-12,820	<b><u>-9,409</u></b>	0,334	0,371	<b><u>0,975</u></b>	0,615	0,423	<b><u>0,992</u></b>	N+NE	N+NE
34	-17,400	-13,997	<b><u>-12,783</u></b>	0,263	0,235	<b><u>0,662</u></b>	0,550	0,297	<b><u>0,797</u></b>	N+NE	N+NE
35	-31,559	-21,477	<b><u>-14,449</u></b>	0,013	0,018	<b><u>0,433</u></b>	0,074	0,017	<b><u>0,603</u></b>	N+NE	N+NE
36	-22,553	-13,507	<b><u>-10,214</u></b>	0,114	0,290	<b><u>0,940</u></b>	0,297	0,346	<b><u>0,973</u></b>	N+NE	N+NE
37	-22,024	-12,085	<b><u>-8,593</u></b>	0,131	0,480	<b><u>0,992</u></b>	0,326	0,525	<b><u>0,999</u></b>	N+NE	N+NE



38	-21,053	-16,330	<b>-15,908</b>	0,101	0,076	<b>0,265</b>	0,283	0,145	<b>0,486</b>	N+NE	N+NE
39	-35,107	-24,033	<b>-13,220</b>	0,007	0,003	<b>0,599</b>	0,045	0,006	<b>0,746</b>	N+NE	N+NE
40	-34,166	-37,772	<b>-30,321</b>	0,082	0,005	<b>0,186</b>	0,257	0,006	<b>0,370</b>	N+NE	N+NE
41	<b>-17,180</b>	-19,281	-17,648	<b>0,160</b>	0,012	0,130	<b>0,415</b>	0,043	0,329	PN/ N+NE	PN
42	-22,414	-28,775	<b>-17,495</b>	0,057	0,000	<b>0,139</b>	0,185	0,000	<b>0,315</b>	N+NE	N+NE
43	-39,185	-37,735	<b>-31,813</b>	0,370	<b>0,698</b>	0,653	0,702	0,725	<b>0,787</b>	PS/ N+NE	PS/ N+NE
44	-26,303	-33,850	<b>-19,975</b>	<b>0,558</b>	0,041	0,524	<b>0,810</b>	0,047	0,684	PN/ N+NE	PN/N+NE
45	-28,609	-19,295	<b>-11,944</b>	0,033	0,068	<b>0,777</b>	0,083	0,052	<b>0,865</b>	N+NE	N+NE
46	-44,575	-42,349	<b>-23,727</b>	0,001	0,000	0,005	0,004	0,000	0,046	N+NE	N+NE
47	-44,581	-51,290	<b>-24,310</b>	0,184	0,014	<b>0,417</b>	0,326	0,003	<b>0,515</b>	N+NE	N+NE
48	-22,339	-15,013	<b>-11,753</b>	0,120	0,147	<b>0,800</b>	0,308	0,210	<b>0,877</b>	N+NE	N+NE
49	-20,456	-21,922	<b>-16,969</b>	0,058	0,013	<b>0,173</b>	0,204	0,019	<b>0,363</b>	N+NE	N+NE
50	-16,180	<b>-9,907</b>	-14,877	0,220	<b>0,797</b>	0,380	0,506	<b>0,834</b>	0,564	PS	PS

Na atribuição dos espécimes cativos de arara-azul-grande a três populações naturais a maior parcela dos indivíduos (87,75%) foi atribuída às populações da região N+NE. Dois espécimes (4,09%) foram atribuídos à população PS e somente um indivíduo (2,04%) foi atribuído à população PN em todos os métodos empregados. Os outros cinco espécimes (6,12%) foram atribuídos a mais de uma população nas diferentes análises, sendo os espécimes 43 atribuídos às populações naturais PS e N+NE e o espécime 44 às populações PS e N+NE. Não foi possível determinar a provável origem geográfica do espécime 9, que foi atribuído à populações naturais diferentes em cada um dos métodos.

Tabela 6 - Resultado da atribuição populacional de cada espécime cativo de arara-azul-grande (EC). Realizada pelos métodos de verossimilhança, frequências alélicas e bayesiano, considerando quatro conjuntos gênicos naturais: Pantanal Norte (PN), Pantanal Sul (PS), Norte (N) e Nordeste (NE) e provável origem populacional de cada espécime cativo.

EC	Verossimilhança (Arlequin)				Frequências alélicas (GeneClass2)				Bayesiano (GeneClass2)				Provável Pop
	PN	PS	N	NE	PN	PS	N	NE	PN	PS	N	NE	
1	-38,359	-23,728	-21,351	<b>-18,838</b>	0,002	0,004	<b>0,155</b>	0,133	0,023	0,007	<b>0,188</b>	0,126	N/NE
2	-24,507	<b>-21,283</b>	-22,377	-22,967	0,037	0,019	0,035	0,022	0,106	0,026	<b>0,140</b>	0,043	PS/N
4	-40,665	-27,586	-19,527	<b>-19,221</b>	0,002	0,002	<b>0,155</b>	0,115	0,011	0,001	<b>0,321</b>	0,124	N/NE
5	-17,648	-20,442	-11,305	<b>-9,939</b>	0,252	0,033	<b>0,895</b>	0,872	0,526	0,034	<b>0,969</b>	0,893	N/NE
6	-17,772	-16,511	<b>-14,123</b>	-14,516	0,267	0,267	<b>0,552</b>	0,303	0,421	0,161	<b>0,758</b>	0,393	N/NE
7	-25,461	<b>-14,499</b>	-21,175	-28,747	0,051	<b>0,187</b>	0,024	0,003	0,142	<b>0,273</b>	0,165	0,012	PS
8	-41,441	-38,521	<b>-23,034</b>	-32,036	0,042	0,012	<b>0,251</b>	0,188	0,073	0,005	<b>0,323</b>	0,137	N
9	-30,121	<b>-26,129</b>	-27,062	-27,735	0,382	<b>0,439</b>	0,090	0,209	<b>0,598</b>	0,470	0,131	0,311	PS/PN
10	-24,494	-13,549	-11,720	<b>-10,538</b>	0,062	0,284	<b>0,861</b>	0,811	0,192	0,347	<b>0,950</b>	0,835	N/NE
11	-24,024	-20,348	<b>-13,329</b>	-13,371	0,072	0,035	<b>0,663</b>	0,440	0,214	0,029	<b>0,833</b>	0,509	N
12	-40,618	-38,944	-20,627	<b>-17,451</b>	0,002	0,000	0,084	<b>0,104</b>	0,013	0,000	<b>0,206</b>	0,186	N/NE
13	-16,974	-16,427	-12,168	<b>-12,163</b>	0,328	0,276	<b>0,811</b>	0,604	0,621	0,152	<b>0,926</b>	0,651	NE
14	-24,690	<b>-13,926</b>	-19,690	-14,598	0,058	0,246	0,144	<b>0,295</b>	0,156	0,309	0,320	<b>0,410</b>	PS/NE
15	-17,661	-13,732	<b>-10,275</b>	-11,100	0,274	0,265	<b>0,957</b>	0,744	0,560	0,327	<b>0,992</b>	0,786	N
16	-31,550	-25,582	<b>-14,359</b>	-14,706	0,011	0,001	<b>0,520</b>	0,284	0,072	0,003	<b>0,732</b>	0,368	N
17	-30,838	<b>-13,668</b>	-19,353	-14,679	0,017	0,271	0,168	<b>0,287</b>	0,059	0,336	0,349	<b>0,400</b>	PS/NE
18	-16,205	-11,701	-11,303	<b>-8,181</b>	0,374	0,542	0,895	<b>0,983</b>	0,657	0,592	0,968	<b>0,990</b>	NE
19	-27,160	-26,665	-20,817	<b>-22,542</b>	0,029	0,004	0,028	0,027	0,076	0,002	<b>0,154</b>	0,041	N+NE
20	-32,325	-24,308	-22,363	<b>-22,211</b>	0,010	0,002	0,035	0,030	0,039	0,005	<b>0,113</b>	0,050	N/NE
21	-28,721	-28,070	-23,896	<b>-17,477</b>	0,036	0,001	0,041	<b>0,103</b>	0,083	0,001	0,081	<b>0,167</b>	NE
22	-30,895	-22,132	<b>-14,593</b>	-17,877	0,017	0,010	<b>0,484</b>	0,088	0,052	0,014	<b>0,712</b>	0,159	N





23	-28,577	-15,607	-14,306	<b>-12,921</b>	0,018	0,108	<b>0,527</b>	0,498	0,067	0,170	<b>0,725</b>	0,552	N/NE
24	-18,734	-17,019	-12,364	<b>-12,107</b>	0,181	0,047	<b>0,789</b>	0,612	0,423	0,103	<b>0,917</b>	0,662	N/NE
25	-35,696	-25,727	<b>-20,602</b>	-22,269	0,003	0,001	<b>0,091</b>	0,029	0,026	0,003	<b>0,186</b>	0,041	N
26	-38,634	-20,120	-21,493	<b>-17,557</b>	0,002	0,006	0,057	<b>0,212</b>	0,021	0,030	0,158	<b>0,213</b>	NE
27	-17,998	-16,384	-11,508	<b>-9,505</b>	0,228	0,071	<b>0,880</b>	0,913	0,496	0,132	<b>0,963</b>	0,931	N/NE
28	-34,750	-23,672	<b>-15,268</b>	-18,257	0,010	0,026	<b>0,391</b>	0,165	0,038	0,010	<b>0,644</b>	0,183	N
29	-18,799	-13,936	-19,253	<b>-12,243</b>	0,178	0,245	0,175	<b>0,592</b>	0,423	0,309	0,295	<b>0,642</b>	NE
30	-47,837	-43,819	<b>-23,916</b>	-35,787	0,001	0,000	0,005	0,000	0,002	0,000	<b>0,058</b>	0,000	N
31	-16,807	-20,544	-12,730	<b>-11,653</b>	0,314	0,031	<b>0,744</b>	0,672	0,604	0,027	<b>0,891</b>	0,721	N/NE
32	-44,106	-43,478	<b>-25,267</b>	-34,762	0,009	0,000	<b>0,088</b>	0,025	0,043	0,000	<b>0,140</b>	0,042	N
33	-16,568	-12,820	-10,253	<b>-8,923</b>	0,334	0,379	<b>0,959</b>	0,954	0,620	0,434	<b>0,991</b>	0,958	N/NE
34	-17,400	-13,997	<b>-12,740</b>	-13,337	0,268	0,238	<b>0,741</b>	0,444	0,553	0,307	<b>0,902</b>	0,552	N
35	-31,559	-21,477	<b>-14,379</b>	-14,838	0,013	0,016	<b>0,517</b>	0,273	0,074	0,018	<b>0,730</b>	0,361	N
36	-22,553	-13,507	-11,222	<b>-9,561</b>	0,111	0,289	0,901	<b>0,908</b>	0,299	0,354	<b>0,971</b>	0,923	N/NE
37	-22,024	-12,085	-9,916	<b>-7,904</b>	0,128	0,483	0,970	<b>0,990</b>	0,327	0,535	<b>0,995</b>	0,994	N/NE
38	-21,053	-16,330	<b>-15,438</b>	-17,043	0,099	0,074	<b>0,371</b>	0,124	0,286	0,145	<b>0,655</b>	0,251	N
39	-35,107	-24,033	<b>-13,156</b>	-13,597	0,007	0,003	<b>0,686</b>	0,408	0,044	0,008	<b>0,860</b>	0,496	N
40	-34,166	-37,772	-29,790	<b>-28,896</b>	0,081	0,006	<b>0,118</b>	0,162	0,257	0,006	<b>0,321</b>	0,265	N/NE
41	<b>-17,180</b>	-19,281	-17,753	-19,021	<b>0,162</b>	0,011	0,143	0,053	<b>0,424</b>	0,044	0,407	0,140	PN
42	-22,414	-28,775	<b>-17,375</b>	-18,501	0,058	0,000	<b>0,170</b>	0,068	0,192	0,000	<b>0,396</b>	0,127	N
43	-39,185	-37,735	<b>-29,622</b>	-35,975	0,360	<b>0,695</b>	0,596	0,575	0,696	0,742	<b>0,809</b>	0,697	PS/N
44	-26,303	-33,850	<b>-17,210</b>	-30,843	0,552	0,041	<b>0,773</b>	0,137	0,793	0,042	<b>0,902</b>	0,193	N
45	-28,609	-19,295	-12,452	<b>-12,296</b>	0,037	0,066	<b>0,777</b>	0,584	0,084	0,053	<b>0,910</b>	0,643	N/NE
46	-44,575	-42,349	-28,924	<b>-24,450</b>	0,001	0,000	0,002	0,003	0,003	0,000	0,008	0,015	NE
47	-44,581	-51,290	<b>-20,919</b>	-38,791	0,189	0,013	<b>0,499</b>	0,192	0,327	0,003	<b>0,589</b>	0,291	N
48	-22,339	-15,013	-16,085	<b>-11,111</b>	0,117	0,148	0,550	<b>0,744</b>	0,310	0,214	0,613	<b>0,774</b>	NE
49	-20,456	-21,922	<b>-17,036</b>	-20,509	0,060	0,012	<b>0,198</b>	0,068	0,210	0,020	<b>0,444</b>	0,097	N
50	-16,180	<b>-9,907</b>	-16,610	-14,734	0,223	<b>0,799</b>	0,236	0,281	0,511	<b>0,828</b>	0,495	0,383	PS

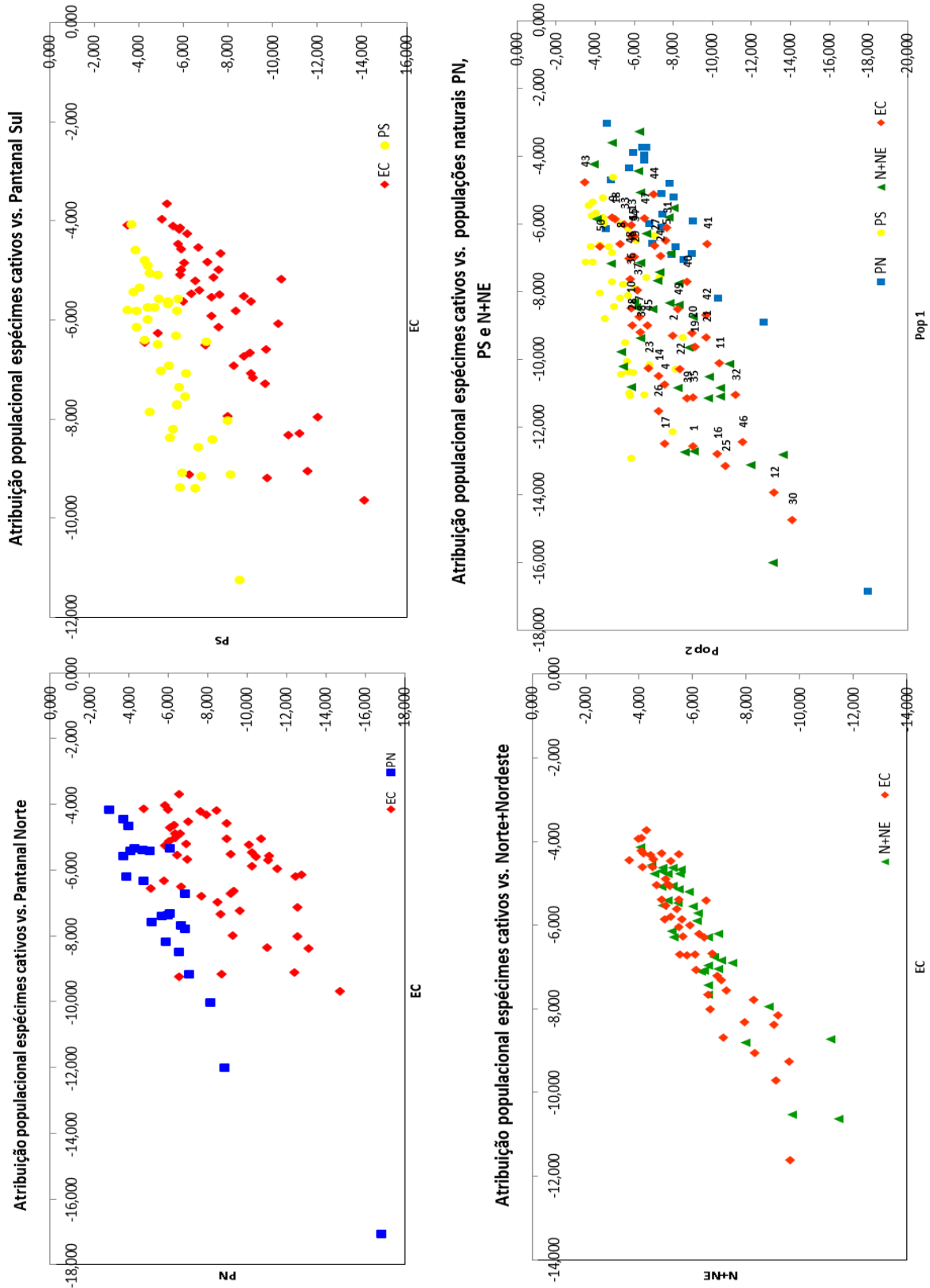
Já na atribuição dos espécimes cativos a quatro populações naturais de arara-azul-grande 17 espécimes (34,7%) foram atribuídos à população N, sete espécimes (14, 28%) à população NE, dois espécimes (4,08%) à população PS e um espécime (2,04%) foi atribuído à população PN. Como já evidenciada a mistura entre as populações N e NE aqui 17 espécimes (34,7%) foram atribuídos a ambas as populações naturais pelos métodos empregados. Dois espécimes (4,08%) foram atribuídos às populações PS e N, dois espécimes (4,08%) às populações PS e NE e um espécime (2,04%) às populações PN e PS.

Os gráficos de atribuição populacional gerados pelo programa Genalex corroboram e ilustram os resultados encontrados nos testes de atribuição realizados, permitindo uma visualização da distribuição dos espécimes cativos de arara-azul-grande em cada um dos conjuntos gênicos naturais e aos três conjuntos gênicos simultaneamente (Figura 9).





Figura 11 - Gráficos -log-verossimilhança para a atribuição populacional dos espécimes cativos de arara-azul-grande (EC) a cada um dos conjuntos gênicos naturais da espécie, Pantanal Norte (PN), Pantanal Sul (PS) e Norte e Nordeste (N+NE), e aos três conjuntos gênicos simultaneamente. Cada símbolo representa um indivíduo de uma das populações e do grupo de indivíduos cativos e os números correspondem ao número de registro dado nesse estudo a cada de cada espécime cativo.





## 6.6. Parentesco e sugestão dos melhores casais para reprodução

A probabilidade média de identidade (PI) foi 0,004 e a probabilidade combinada de exclusão para todos os locos PE1 (conhecendo ambos os progenitores) foi 0,996 PE2 (não conhecendo um dos pais) foi 0,966 e PE3 (não conhecendo nenhum dos progenitores) foi 0,999.

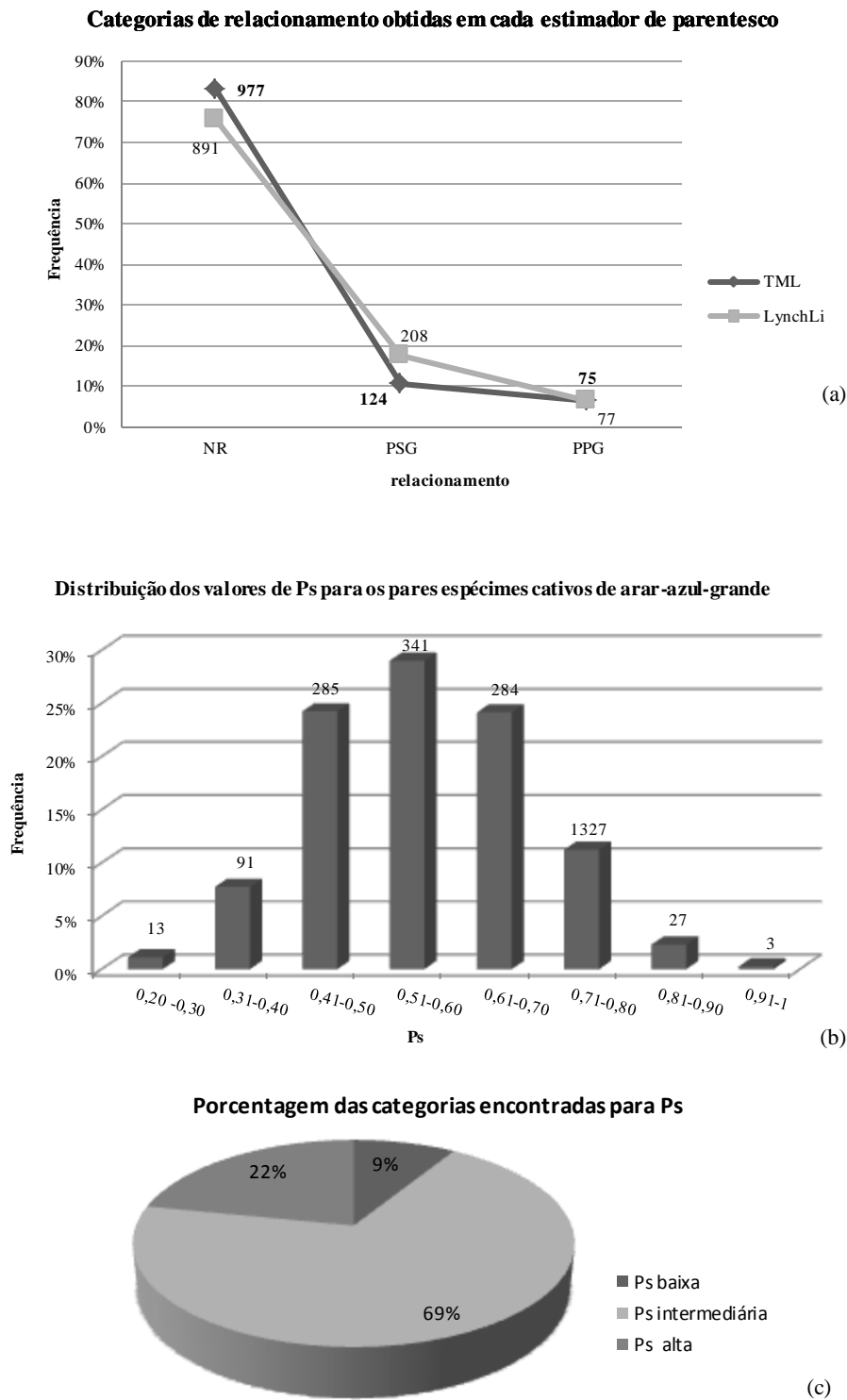
Dos sete estimadores de parentesco comparados pelo programa Coancestry (WANG, 2011) o estimador de verossimilhança triádico (TML) (WANG, 2007) e o estimador “momentum” LynchLi (LI; WEEKS; CHAKRAVARTI, 1993; LYNCH, 1998) mostraram-se os mais adequados para o conjunto amostral estudado. A porcentagem de pares de indivíduos para cada uma das categorias de relacionamento de acordo com os valores de  $r$ , a distribuição dos valores encontrados para  $P_S$  e a porcentagem de cada categoria encontrada para  $P_S$  estão expressos em gráficos, figura 10 (a) (b) (c), respectivamente. Em ambos os estimadores de  $r$  mais de 70% das combinações par a par resultaram em valores para indivíduos não relacionados, 12% ou mais em valores para parentes de segundo-grau e menos de 10% em valores para parentes de primeiro-grau. Os valores encontrados para  $P_S$  variaram de 0,22 a 0,95, com a maior frequência (29%) entre 0,51 a 0,60 e a menor entre 0,91 a 1 (0,25%). A divisão desse intervalo gerou três categorias de  $P_S$ : baixa ( $P_S \leq 0,40$ ), intermediária ( $0,70 > P_S > 0,40$ ) e alta ( $P_S \geq 0,70$ ), com 69% das combinações par a par com valores para  $P_S$  intermediária.

A tabela com os valores de  $r$  calculados pelos dois estimadores, o suposto relacionamento indicado pela verossimilhança e a similaridade genética ( $P_S$ ) para cada par de indivíduos encontra-se em anexo (Apêndice B). Para o estimador LynchLi os pares de indivíduos 11-35 e 14-17 apresentaram o maior valor de  $r$  (0,916) e para o estimador TML o par 11-35 apresentou o maior valor de  $r$  (0,815), os dois pares de indivíduos apresentaram o maior valor de similaridade genética ( $P_S=0,95$ ). O estimador TML gerou 584 combinações par a par com valor igual a zero, os espécimes 25-40 (ZMP e ZMSQB) apresentaram o menor valor de  $r$  para LynchLi (-1,156) e a menor similaridade genética ( $P_S=0,22$ ).

O parentesco (valor de  $r$  e o suposto relacionamento) e a similaridade genética dos espécimes cativos nas mesmas instituições são explorados abaixo, pois muitos desses encontram-se pareados para reprodução e até mesmo com prole. Adicionalmente, a provável origem geográfica de cada espécime foi considerada para a sugestão dos melhores casais para reprodução.



Figura 12 - Categorias de relacionamento para cada estimador, distribuição dos valores encontrados para similaridade genética e porcentagem de categorias para similaridade genética. (a) gráfico com a porcentagem de pares de indivíduos das 1176 combinações par a par para as categorias de relacionamento: não relacionado (UN), parente de segundo-grau (PSG) e parente de primeiro-grau (PPG), para os estimadores de parentesco verossimilhança triádico (TML) (WANG, 2007) e LynchLi (LI; WEEKS; CHAKRAVARTI, 1993; LYNCH, 1998). (b) histograma da frequência dos valores encontrados para  $P_s$ . (c) porcentagem de cada categoria de  $P_s$ , baixa, intermediária e alta, para as 1176 combinações para a par de indivíduos de arara-azul-grande em cativeiro.





a) *Parque Ecológico de São Carlos*

Dos quatro espécimes cativos no PESC, três fêmeas (1, 2 e 36) e um macho (37), atribuídos à população natural N+NE, os indivíduos 36 e 37 apresenta valor de  $r$  para parentes de primeiro, suposto relacionamento de PO e alta  $P_S$ . O teste de hipótese para HS ( $p=0,3175$ ) indica o relacionamento também é possível. O par de indivíduos 1-37 apresentam valores de  $r$  para parentes de segundo-grau, suposto relacionamento de FS e  $P_S$  alta. O teste de hipótese para HS ( $p=0,3073$ ) mostra que relacionamento de segundo-grau não pode ser descartado. Como os espécimes 36-37 são provenientes de um criadouro científico fechado recentemente o suposto relacionamento indicado pela verossimilhança pode ser verdadeiro. Já o relacionamento entre os espécimes 1-37 não pode ser confirmado por informações prévias. Assim, considerando as estimativas de parentesco e a atribuição populacional o par 2-37 ( $UN$  e  $P_S=0,60$ ) é a melhor opção para reprodução, os indivíduos considerados não relacionados e com  $P_S$  intermediária.

b) *Zoológico Municipal de Sorocaba Quinzinho de Barros*

Dos cinco espécimes cativos no ZMSQB, três fêmeas (38, 41 e 42) e dois machos (39 e 40), um espécime (41) foi atribuído à população natural PN (a análise de agrupamento mostra uma mistura das populações PN e N+NE para o espécime) e os outros quatro a população N+NE. A paternidade dos espécimes 41 e 42 foi atribuída ao espécime 40, até então desconhecida, com os pares apresentando valores de  $r$  para parentes de primeiro e segundo grau e valores intermediários e altos de  $P_S$ . Os teste de hipóteses para parente em segundo grau para os pares 40-41 ( $p=0,0345$ ) e 40-42 ( $p=0,0039$ ) indicam que o relacionamento não é possível. O par 41-42 apresentou valores de  $r$  (0,288 e 0,248) para parentes em segundo-grau, relacionamento FS e similaridade alta. O teste de hipótese para FS ( $p=0,2151$ ) indica que os dois relacionamentos são possíveis. Os espécimes 38 e 39 não são relacionados com nenhum indivíduo da instituição e em todas as combinações par a par apresentaram valores intermediários de similaridade genética. Com base nas análises de parentesco, de similaridade genética e de atribuição populacional é o possível a sugestão de três casais diferentes: 38-40 ( $UN$  e  $P_S=0,44$ ), 39-42 ( $UN$  e  $P_S=0,50$ ) e 38-39 ( $UN$  e  $P_S=0,55$ )

c) *Parque Ecológico Municipal de Americana*

No PEMA duas fêmeas (22 e 24) e dois machos (21 e 23) formam casais reprodutores. Eles são provenientes do mesmo criadouro e foram atribuídos a mesma população natural (N+NE). Os espécimes 23 e 24 apresentam um suposto relacionamento de FS e alta  $P_S$ , com os valores de  $r$  abaixo do esperado para a relação indicada pela verossimilhança. Mas o teste



de hipótese para HS corrobora a hipótese putativa ( $p=0,0402$ ). Os pares 21-22 e 21-24 foram considerados não relacionados com  $P_S$  intermediária.

Os outros seis espécimes, quatro fêmeas (4, 6, 7 e 8) e dois machos (5 e 9) compartilham o mesmo recinto. Mas vale ressaltar que o espécime 9 foi atribuído a mais de uma população natural (PN e PS e N+NE) não sendo indicado para a reprodução e que uma das fêmeas (7) foi atribuída a população natural PS, enquanto os outros quatro espécimes à população natural N+NE. Os pares 5-6 e 5-8 apresentam  $P_S$  alta, valores de  $r$  para LynchLi de parentes em segundo e primeiro-grau, respectivamente, embora a verossimilhança (TML e ML-Relate) os considere não-relacionados. Os testes de hipóteses para cada um dos pares indicam que as hipóteses nula de HS ( $p=0,2028$ ) e FS ( $p=0,0973$ ), respectivamente, não podem ser rejeitadas. O parentesco entre os pares de indivíduos acima não pode ser comprovado por falta de informações genealógicas e pelos espécimes serem provenientes de cativeiros diferentes antes do PEMA.

As combinações par a par entre os casais reprodutores e os outros espécimes, mostram o par de indivíduos 6-22 como PO e  $P_S$  alta. Testes de hipóteses para a provável paternidade do espécime 6 foram realizados para os dois machos reprodutores, mas os valores de  $p=0$  e  $p=0,0188$  corroboram a hipótese putativa (UN). Os indivíduos 8-23 apresentam  $P_S$  alta e suposto relacionamento de FS, com os valores de  $r$  um para um parentesco de primeiro e segundo-grau. O teste de hipótese para HS ( $p=0,1086$ ) mostra que ambos os relacionamentos são possíveis. Os relacionamentos indicados para os pares acima devem ser considerados já que os espécimes 6 e 8 são provenientes do mesmo criadouro dos casais reprodutores. Os pares 5-22 e 5-24 ( $P_S$  alta) apresentam valores de  $r$  para parentes em segundo-grau e suposto relacionamento de FS e HS, respectivamente. No entanto, como os espécimes são provenientes de criadouros diferentes o relacionamento entre eles não pode ser confirmado.

Diante de um provável relacionamento de primeiro grau e uma alta similaridade genética não é aconselhável a reprodução entre espécimes 23-24. Os pares 4-23, 5-6 e 5-8 apontados como UN apresentam alta  $P_S$ , não sendo indicados como a melhor opção para a reprodução. Assim, considerando o parentesco, a similaridade genética e a provável origem geográfica de cada espécime entre os espécimes do PEMA, os casais mais indicados para a reprodução estão organizados na tabela abaixo (Tabela 7). Foi possível sugerir um total de nove casais, indicados como UN por todos os métodos empregados nas estimativas de parentesco e com  $P_S$  intermediária.



Tabela 7 - Melhores combinações par a par dos espécimes de arara-azul-grande cativos no PEMA para reprodução. Considerando o relacionamento indicado pelos dados genéticos/genealógicos (R) e a similaridade genética ( $P_S$ ) entre os espécimes.

Nº	Casal	R	$P_S$
1	4-21	UN	0,60
2	6-21	UN	0,60
3	22-23	UN	0,60
4	22-24	UN	0,60
5	8-21	UN	0,61
6	4-23	UN	0,65
7	4-5	UN	0,65
8	6-23	UN	0,65
9	21-22	UN	0,65

d) *Zoológico Municipal de Ribeirão Preto*

Dos três espécimes cativos no ZMRP as duas fêmeas (48 e 49) foram atribuídas à população natural N+NE e o macho (50) à população PS, tornando desaconselhável a reprodução entre os mesmos.

Considerando que somente os espécimes 7 (F) (PEMA) e 50 foram atribuídos à população PS o pareamento reprodutivo seria desejável. Porém o par apresenta  $P_S$  alta, suposto relacionamento de FS e valores de  $r$  para parentes em segundo-grau. O teste de hipótese para HS ( $p=0,2602$ ) indica o relacionamento em segundo-grau como possível, já a hipótese nula de UN foi rejeitada ( $p=0,0156$ ). A rejeição da hipótese nula de UN e a similaridade genética entre os dois espécimes não favorecem o pareamento reprodutivo do par, apesar de não ser possível comprovar o relacionamento entre os espécimes.

e) *Zoológico Municipal de Piracicaba*

O casal de arara-azul-grande cativo no ZMP (25 e 26) foi considerado não relacionados, com  $P_S$  baixa, com os espécimes e atribuídos a mesma população natural (N+NE), sendo assim uma ótima opção para reprodução.

f) *Zoológico Municipal de Taboão da Serra*

Os espécimes cativos no ZMTS (43 e 44) com  $P_S$  intermediária foram atribuídos a populações diferentes e a mais de uma população (PS e N+NE e PN e N+NE), dessa forma a reprodução dos mesmos não é aconselhável.

g) *Parque Zoológico Eugênio Walter de Boituva*

O casal do PZEWB (46 e 47) indicado como FS e  $P_S$  intermediária apresentam valores de  $r$  para parentes de segundo-grau e para indivíduos não relacionados. A hipótese nula de HS ( $p=0,1485$ ) não pode ser rejeitada, mas o mesmo não acontece para a hipótese de UN com



$p=0,016$ . Os dois espécimes foram atribuídos a mesma população natural (N+Ne) e como o parentesco de primeiro grau não é corroborado pelos valores de  $r$  e não pode ser comprovado por informações de origem e genealogia o casal poderia ser considerado uma opção para reprodução, caso não seja possível uma troca ou empréstimo de espécimes entre as instituições.

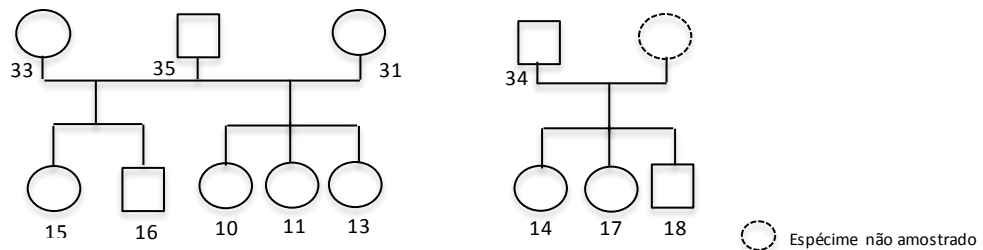
h) *Parque Ecológico Mourão de Leme e Zoológico Municipal de Bauru*

Para os espécimes cativos no PEML (19) e no ZMB (20) as instituições podem consultar as análises de parentesco, similaridade genética e atribuição populacional a fim de encontrar o melhores indivíduos de arara-azul-grande em outras instituições para pareamento reprodutivo dos mesmos.

i) *Fundação Parque Zoológico de São Paulo*

Os 18 espécimes cativos na FPZSP, 12 fêmeas (10, 11, 13, 14, 15, 17, 27, 28, 30, 31, 32 e 33) e seis machos (12, 16, 18, 29, 34 e 35) foram atribuídos à mesma população natural (N+NE). As informações genealógicas combinadas com os dados genéticos indicam os relacionamentos ilustrados no heredograma abaixo (Figura 11).

Figura 13 - Heredograma de uma parcela dos espécimes de arara-azul-grande cativos na FPZSP. Construído com base em dados genealógicos e genéticos, onde os números correspondem ao número de registro dado a cada espécime no laboratório.



O espécime 11 segundo as informações da instituição seria filho do casal 33-35, irmão dos espécimes 15 e 16 e, conseqüentemente meio-irmão dos espécimes 10 e 13. No entanto, as estimativas de parentescos apontam o casal 31-35 como progenitores do espécime com  $P_s$  alta entre os pares. O par 11-33 ( $r=0,127$  e  $0,499$  e  $P_s=0,75$ ) foi indicado como não relacionado pela verossimilhança e a hipótese nula para PO foi rejeitada ( $p=0,024$ ).

Os pares 10-11, 10-13 e 11-13 são considerados parentes em primeiro-grau, com  $P_s$  alta e suposto relacionamento de FS, PO e PO, respectivamente. Já os pares 11-15 ( $r=0,422$  e  $0,666$ ) e 11-16 ( $r=0,594$  e  $0,833$ ) apresentam  $P_s$  alta e são indicados como PO e FS pela verossimilhança. O relacionamento indicado pelos dados genealógicos para os pares 15-16,



14-17, 14-18 e 17-18 foi corroborado pelos resultados das estimativas de parentesco e todos os pares apresentaram  $P_S$  alta.

O casal 31-35 apresenta valores de  $r$  para parentes de segundo-grau, similaridade genética alta e seriam FS de acordo com a verossimilhança. Já o casal 33-35, não relacionados apresentam  $P_S$  alta. Os espécimes 33 e 34 foram apontados como FS com  $P_S$  alta, mas os valores de  $r$  indicam um relacionamento de segundo-grau. E o par 31-34 como parentes em segundo-grau com  $P_S$  alta, a hipótese nula para parentes em primeiro-grau não pode ser rejeitada ( $p=0,5076$ ). A fêmea progenitora dos espécimes 14, 17 e 18 não pertence à FPZSP e por isso não foi amostrada.

Os pares 27-31 e 27-33 são apontados como parentes em primeiro-grau (PO) e os pares 18-27 e 27-34 como parentes em segundo-grau (HS), porém o espécime 27 não se mostra relacionado com mais nenhum dos espécimes para os quais o relacionamento foi confirmado por dados genealógicos e genéticos (Figura 11). O espécime 12 não é relacionado com nenhum outro espécime da FPZSP de acordo com os valores de  $r$ , mas a verossimilhança indica um suposto relacionamento de segundo-grau com os espécimes 30 e 32 com  $P_S$  intermediária para ambos os pares. A hipótese nula de UN foi rejeitada para o par 12-30 ( $p=0,0464$ ), mas pode ser rejeitada para o par 12-32 ( $p=0,104$ ). Como o espécime 12 nasceu na natureza o relacionamento não pode ser confirmado.

O pareamento reprodutivo entre os espécimes 10, 11, 13, 15, 16 e 14, 17, 18 não é aconselhável devido às relações que eles apresentam. E apesar de não ser possível comprovar o relacionamento entre o par reprodutor 31-35, o mesmo e o casal 33-35 já se reproduziram mais de uma vez e apresentam uma alta similaridade genética não sendo interessante uma nova reprodução. O espécime 12, apesar de não relacionado com a maior parte dos indivíduos, apresenta vários problemas de saúde e idade avançada deixando de ser uma opção para reprodução.

Assim, considerando o relacionamento de acordo com os dados genéticos e genealógicos, quando disponíveis, e a similaridade genética apresentada entre os indivíduos de arara-azul-grande foram feitas as melhores combinações entre os espécimes para o pareamento reprodutivo. Os melhores casais estão organizados seguindo do par com a menor similaridade genética para o par com a maior (Tabela 8). Um total de 27 casais, indicados como UN por todos os métodos empregados nas estimativas de parentesco e com  $P_S$  baixa e intermediária, foram sugeridos.





Tabela 8 - Melhores combinações par a par dos espécimes de arara-azul-grande cativos na FPZSP para reprodução. Considerando o relacionamento indicado pelos dados genéticos/genealógicos (R) e a similaridade genética ( $P_S$ ) entre os espécimes.

Nº	Casal	R	$P_S$
1	16-30	UN	0,25
2	30-35	UN	0,3
3	16-32	UN	0,39
4	18-30	UN	0,4
5	16-28	UN	0,45
6	18-32	UN	0,5
7	17-29	UN	0,5
8	28-29	UN	0,5
9	30-29	UN	0,5
10	32-29	UN	0,5
11	28-34	UN	0,5
12	27-35	UN	0,5
13	32-35	UN	0,5
14	14-16	UN	0,55
15	16-27	UN	0,55
16	15-29	UN	0,55
17	14-29	UN	0,55
18	16-17	UN	0,55
19	14-35	UN	0,56
20	18-28	UN	0,56
21	13-18	UN	0,6
23	27-29	UN	0,6
24	17-35	UN	0,6
25	35-34	UN	0,6
26	32-34	UN	0,61
27	11-34	UN	0,65

## 7. Discussão

### 7.1. Sexagem molecular

A sexagem molecular em aves se tornou uma ferramenta importante para a diferenciação de indivíduos, considerando a ausência de dimorfismo sexual em muitas espécies (RASO; WERTHER, 2004), como os psitacídeos. A falta dessa informação pode dificultar o pareamento correto de indivíduos e até mesmo prejudicar programas de reprodução em cativeiro (RUSSELO; AMATO, 2004). A técnica utilizada nesse estudo foi rápida e fácil, apresentando 100% de sucesso na identificação e confirmação do sexo dos espécimes cativos de arara-azul-grande.



Dois espécimes (36 e 45) informados previamente como machos na realidade são fêmeas e cinco espécimes (38, 39, 41, 42 e 49) tiveram o sexo determinado. A informação foi importante no estabelecimento das relações de parentesco e na sugestão dos melhores casais para reprodução da espécie em cativeiro. As instituições foram devidamente informadas sobre a correção, identificação e confirmação do sexo dos seus espécimes de *A. hyacinthinus*.

## 7.2. Caracterização dos locos de microssatélite e erros de genotipagem.

O número de alelos por loco encontrado para o grupo cativo de arara-azul-grande variou de dois a sete alelos, o mesmo encontrado por Presti et al. (2011) para uma amostra de 30 indivíduos da população Pantanal Sul. Já o número de alelos por loco encontrado para as populações naturais de arara-azul-grande variou de dois a nove (PRESTI, 2010). O maior número de alelos para as populações naturais é esperado, já que o grupo cativo é uma pequena amostra da diversidade da espécie. Os valores médios de diversidade genética para o grupo de indivíduos cativos de *A. hyacinthinus* ( $He=0,492$ ,  $Na=3,6$  e  $Ra=3,576$ ) e os valores médios encontrados para as populações naturais ( $He=0,447$  e  $Na=4,8$ ) (PRESTI, 2010) não diferiram significativamente. Resultados similares já foram reportados para outras espécies (CRONIN; RENECKER; PATTON, 2009; HAUSKNECHT et al., 2013)

A diversidade genética encontrada para as populações naturais de arara-azul-grande foi menor do que a diversidade observada para arara-canidé (*Ara ararauna*), espécie para qual foram desenvolvidos seis dos 10 locos de microssatélites utilizados nesse estudo e por Presti (2010) e Presti et al. (2011). A diversidade genética menor encontrada para *A. hyacinthinus* pode estar relacionada com a utilização de locos heterólogos ou ser uma característica da espécie (PRESTI, 2010). Segundo Avise (1994) nem sempre níveis baixos de variabilidade genética refletem uma ameaça à sobrevivência das populações.

A análise do programa Microchecker apontou evidência de alelo nulo para o loco HYA. Revisamos cuidadosamente os eletroferogramas para o loco e mesmo assim o número de heterozigotos é menor do que o esperado, mas isso não necessariamente implica que o alelo nulo esteja presente (MARSHALL et al., 1998). Carlsson (2008) mostra que os efeitos de alelos nulos em testes de atribuição são de baixa intensidade, não havendo necessidade de descartar os locos de microssatélites. E Pérez-Espona et al. (2012) encontraram os mesmos resultados para as análise bayesianana de agrupamento com ou sem a presença de alelos nulos. Segundo, Wagner et al. (2006) estimativas de parentesco com locos com alelos nulos são mais



robustas e, adicionalmente o programa ML-Relate é capaz de corrigir a frequência de alelo nulo. Assim, loco HYA não foi descartado de nenhuma análise.

### 7.3. Atribuição populacional

Os espécimes de arara-azul-grande foco desse estudo são provenientes dos parques zoológicos do Estado de São Paulo e assim como grande parte dos indivíduos cativos, representantes das diversas espécies da nossa fauna, a maioria chegou a essas instituições por apreensões do tráfico de animais silvestres, sem informação exata e/ou confiável da sua procedência. Para espécies em que as populações naturais apresentam diferenciação genética conhecer a procedência dos espécimes cativos é relevante para os programas de reprodução (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004).

Assim, considerando a estruturação genética das populações naturais de *A. hyacinthinus* correspondente a sua distribuição geográfica (PRESTI, 2010) e a falta de informações sobre a procedência dos indivíduos cativos realizamos testes de atribuição populacional por meio de vários métodos: análise bayesiana de agrupamento, AFC e testes de atribuição, amplamente empregados na literatura (CARRERAS et al., 2011; FRANKHAM G.J. et al., 2013; HAUSKNECHT et al., 2014; MANEL et al. 2002; MAUDET; LUIKART; TABERLET, 2002; PRESTI, 2010; RUSSELLO et al, 2007; SUNNY et al., 2014; VÁSQUEZ-CARRILLO et al., 2013)

A análise bayesiana de agrupamento, a AFC e os testes de atribuição mostram a maior parcela dos indivíduos cativos distribuídos pelas populações naturais N e NE. A análise de agrupamento ainda revelou a mistura genética de alguns indivíduos cativos, corroborada pelos testes de atribuição realizados nesse estudo.

O teste atribuição populacional considerando três populações naturais (87,75%) obteve um desempenho melhor do que a atribuição dos espécimes cativos a quatro populações (55,10%) naturais. Na atribuição populacional dos indivíduos de arara-azul-grande realizada por Presti (2010) 86,7% dos indivíduos foram atribuídos corretamente ao seu grupo de origem considerando quatro populações naturais contra 89,8% para a atribuição a três populações. O teste de atribuição realizado por Russelo et al. (2007) para tartarugas de Galápagos (*Geochelone nigra*), em cativeiro e amostras de museus, com a mesma quantidade de locos de microsatélites utilizados nesse trabalho resultou na atribuição consistente de 87,8% dos indivíduos à suas prováveis localidades de origem. Ainda, Frankham G.J. et al. (2013) obtiveram 95% dos indivíduos de rato canguru (*Potorous tridactylus*) atribuídos a sua localidade amostral, evidenciando a eficácia métodos empregados.



Os resultados encontrados para a provável origem populacional dos espécimes cativos de arara-azul-grande corroboram a hipótese de que todos os conjuntos gênicos naturais descritos para *A. hyacinthinus* representadas em cativeiro, em maior proporção as populações N e NE. O pareamento de espécimes com origens populacionais distintas também foi confirmado. Apesar das análises terem indicado alguns espécimes com uma constituição genética de mais de uma população natural, os prováveis progenitores desses não foram amostrados. Porém, como esses indivíduos têm origem anterior em outros cativeiros a reprodução de espécimes de arara-azul-grande de diferentes conjuntos gênicos pode ser inferida, com ressalvas. Pois para dois espécimes retidos pelo IBAMA, não se tem informação se os mesmo nasceram na natureza e foram retirados para o comércio ilegal ou se nasceram em cativeiro.

Os resultados de todos os métodos empregados nesse estudo para a atribuição populacional dos espécimes cativos de *A. hyacinthinus* às populações naturais da espécie foram coincidentes, na maioria das vezes, e complementares, permitindo a inferência da origem populacional dos indivíduos com maior segurança e confiabilidade. A atribuição populacional realizada nesse estudo preenche uma lacuna e permite um avanço no manejo dos espécimes cativos contribuindo para a manutenção da diversidade genética encontrada na natureza e preservando a história evolutiva da espécie em cativeiro.

#### **7.4. Parentesco e sugestões dos melhores casais para reprodução**

Os marcadores moleculares microssatélites são amplamente empregados nas estimativas de parentesco entre indivíduos, principalmente quando não se tem informações genealógicas ou quando essas estão incompletas (RUSSELO; AMATO, 2004; MITCHELL et al., 2011; WANG, 2011; WITZENBERGER; HOCHKIRCH, 2013). O conhecimento da diversidade genética e das relações dos indivíduos em cativeiro é uma ferramenta valiosa no manejo, especialmente de espécies ameaçadas de extinção, assegurando que a diversidade genética dos espécimes cativos será mantida em longo prazo (FRANKHAM 1995; O'BRIEN, 2006).

Os valores encontrados para PI e PE combinados com a alta capacidade informativa do painel de locos de microssatélites utilizados mostram que a individualização das amostras e as análises de parentesco foram conduzidas de maneira confiável.

Na literatura é amplamente aceito que não existe um coeficiente de parentesco que seja universalmente superior aos outros e que várias características do conjunto amostral e do



marcador molecular utilizado podem afetar os comportamentos absolutos e relativos dos estimadores (CSILLERY et al., 2006; VAN DE CASTEELE et al., 2001; WANG, 2002; WANG, 2011). No entanto, vários trabalhos apontam que as estimativas de máxima verossimilhança são mais precisas quando comparadas com outros estimadores (MILLIGAN, 2003; WAGNER et al., 2006; WANG, 2007, WANG, 2011). Os estimadores de parentesco utilizados nesse estudo tiveram seu desempenho comparado com outros e se mostraram os mais adequados para o conjunto amostral estudado e os marcadores utilizados. Além disso, o resultado final das relações entre os indivíduos de arara-azul-grande se deu por meio da combinação de duas abordagens de verossimilhança e um estimador momentum, o que nos permitiu realizar inferências com maior robustez e segurança.

Os valores de  $r$  gerados pelos dois estimadores de parentesco (TML e LynchLi) empregados nesse estudo foram coincidentes para maioria dos pares de indivíduos, com mais de 75% das combinações par a par resultando em valores para indivíduos não relacionados. Para alguns relacionamentos conhecidos os valores de  $r$  foram menores do que o valor esperado para a relação informada ou indicada pela verossimilhança. No entanto, como utilizamos valores de cortes teóricos isso era esperado. Os valores de  $r$  reais exibem variações dos valores teóricos, devido às características biológicas do conjunto amostral, como as várias categorias de relacionamento presentes, do número de locos e grau de polimorfismos desses (LYNCH; RITLAND, 1999; RITLAND, 1996; RUSSELO; AMATO, 2004). Cronin et al. (2009) analisando os valores de  $r$  entre indivíduos de urso polar (*Ursus maritimus*) com o parentesco conhecido encontraram variações grandes para as categorias de relacionamento em primeiro-grau, para mães e filhotes o  $r$  variou de 0,303-0,738, já para pais e potenciais filhotes de 0,2066-0,6306 e para irmãos-gêmeos a variação foi ainda maior de 0,1267-0,8080.

Nesse estudo, como utilizamos uma abordagem de verossimilhança para inferir a categoria de relacionamento entre os indivíduos e realizar testes de hipóteses, quando os valores de  $r$ , a categoria de relacionamento informada e/ou as informações genealógicas não eram concordantes, diminuimos a possibilidade de apontar espécimes aparentados como não relacionados devido a valores de  $r$  menores do que o esperado. Por outro lado, como as relações de PO e FS, parentes em primeiro-grau, são muito próximas elas nem sempre são diferenciadas (KALINOWSKI; WAGNER; TAPER, 2006), por isso alguns pares de FS (parentesco conhecido) foram indicados como PO e vice-versa; em todos esses casos realizamos teste de hipótese para a relação previamente informada. Assim, pudemos identificar informações genealógicas inconsistentes e determinar a paternidade correta com segurança, como o caso do espécime 11 da FPZSP.



A distribuição do número de alelos compartilhados entre indivíduos é um bom indicador do grau de proximidade existente entre eles (JIN; CHAKRABORTY, 1994). Os indivíduos aparentados geralmente apresentam maior similaridade genética do que indivíduos não relacionados (SCHWARTZ; ARMITAGE, 1993). Presti (2010) encontrou uma média de similaridade genética maior entre filhotes de arara-azul-grande do mesmo ninho, em estações reprodutivas consecutivas e alternadas, do que entre filhotes de ninhos diferentes. Os pares de espécimes de *A. hyacinthinus* desse estudo com relacionamento em primeiro-grau (PO e FS) apresentaram valores altos de similaridade genética. Já os pares de indivíduos com baixa similaridade genética apresentaram valores de  $r$  negativos (LynchLi) e iguais a zero (TML).

Dessa forma, na ausência de um pedigree completo e confiável para espécies em cativeiro a similaridade genética é uma opção para a escolha de casais para reprodução, podendo evitar endocruzamentos, que impactam negativamente a sobrevivência e adaptabilidade da espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). Spottiswoode e Møller (2004) mostraram que altos níveis de similaridade genética estão associados com a redução do sucesso de eclosão em uma ampla gama de espécies de aves, mesmo quando a reprodução não ocorre entre parentes próximos.

Os resultados encontrados para os espécimes cativos de arara-azul-grande indicam uma confirmação da hipótese de que indivíduos possivelmente relacionados e com alta similaridade genética se reproduziram ou estão pareados para esse fim. Porém, quando o foco é todo o conjunto amostral analisado percebemos que a maior parcela das combinações par a par entre os espécimes cativos de *A. hyacinthinus* apresentaram similaridade genética intermediária e valores de  $r$  para indivíduos não relacionados.

A combinação dos resultados das relações de parentesco, da similaridade genética e da atribuição populacional dos espécimes cativos de arara-azul-grande permitiu sugerir os melhores casais para reprodução dentro de cada instituição, na tentativa de garantir a preservação da história evolutiva, a saúde e sustentabilidade da espécie em cativeiro. Adicionalmente, outros casais são possíveis com espécimes de instituições diferentes, uma consulta aos dados genéticos gerados aqui (Apêndice B) permite que as próprias instituições visualizem as possibilidades.

### **7.5. Rota de tráfico e repatriação das aves**

O tráfico de animais silvestres é a terceira atividade ilícita mais praticada no mundo, perdendo somente para o tráfico de armas e de drogas (WEBB, 2001). Sendo o Brasil um dos



principais países do mundo a comercializar e exportar espécies da fauna e flora silvestres de forma ilegal (MMA, 2012).

As aves correspondem a cerca de 80% das espécies associadas ao tráfico ilegal de animais silvestres e os psitacídeos o grupo mais comumente apreendido pelos órgãos ambientais como o IBAMA (ARAÚJO et al., 2010; MMA, 2012). A maior parte das araras-azuis-grande em cativeiro no Estado de São Paulo, assim como grande parte dos outros animais vítimas do tráfico (GIOVANINI, 2000; RENCTAS, 2002; SOUZA, 2007), são provenientes das regiões Norte e Nordeste do país, como mostrado nesse estudo. A rota de tráfico de animais silvestre Norte/Nordeste com destino ao Sudeste é uma das principais vias do comércio ilegal da fauna, os animais que chegam até São Paulo e Rio de Janeiro abastecem o mercado interno e externo (RENCTAS, 2002).

O fato da maior parcela dos indivíduos cativos de arara-azul-grande no Estado de São Paulo ser provenientes das populações naturais das regiões Norte e Nordeste, como mostrado nesse estudo, deve ser considerado no planejamento de possíveis solturas e repatriação das aves para a natureza. Para tais ações a atribuição populacional por meio da genética é aconselhada, na tentativa de devolver a ave à região mais provável de sua retirada. Adicionalmente, destacamos que as populações das regiões Norte e Nordeste necessitam de maior atenção e proteção, por parte dos órgãos ambientais, para impedir a retirada das aves da natureza. Essas medidas podem ajudar na preservação da espécie *A. hyacinthinus* e de sua história natural.



## 8. Conclusões

Os resultados obtidos pela a sexagem molecular e a análise de microssatélites para os espécimes cativos de *A. hyacinthinus* nos parques zoológicos do Estado de São Paulo permitiram:

- determinar o sexo de alguns espécimes e identificar a determinação errônea do sexo de dois espécimes;
- identificar a provável origem populacional da maior parte dos espécimes cativos de arara-azul-grande. Corroborando a hipótese de que todos os conjuntos gênicos naturais, descritos para a espécie, estão representados em cativeiro, com as populações da região Norte e Nordeste representadas em maior proporção;
- apontar que indivíduos de origens populacionais distintas encontram-se pareados para reprodução.
- estabelecer as relações de parentesco e a similaridade genética entre os espécimes de *A. hyacinthinus*, com foco nos indivíduos cativos na mesma instituição. Evidenciando que indivíduos possivelmente relacionados e com alta similaridade genética se reproduziram ou encontram-se pareados.
- identificar que maior parcela das combinações par a par entre os espécimes cativos em todas as instituições apresentaram valores de parentesco para indivíduos não relacionados e similaridade genética intermediária;
- sugerir os melhores casais para a reprodução em cada instituição, considerando a origem populacional, o parentesco e a similaridade genética de cada espécime de *A. hyacinthinus*;
- gerar informações genéticas para todos os espécimes cativos amostrados, permitindo que as próprias instituições visualizem as possibilidades de casais para a reprodução;
- demonstrar que o uso de ferramentas genéticas é capaz de recuperar informações valiosas para o manejo de espécies em cativeiro, como as relações de parentesco, grau de similaridade genética e origem populacional dos espécimes. Evitando a perda da diversidade genética da história evolutiva das populações da espécie em cativeiro.





## 9. Referências Bibliográficas

- ABRAMSON, J.; SPEER, B.L.; THOMSEN, J.B. *The Large Macaws: Their Care, Breeding, and Conservation*. Fort Bragg, California: Raintree Publications, 1995. 534 p.
- ALACS, E.A.; FREDRICJ, F.J.; SCRIBNER, K.T. Genetic Issues in Freshwater Turtle and Tortoise Conservation. *Chelonian Research Monographs*, n.4, p.107-123, 2007.
- ALLENDORF, F.R.; LUIKART, G. *Conservation and the genetics of populations*. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 642p.
- ANDRABI, S.M.H; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v.99, p.223-243, 2007.
- ARAÚJO, A.C.B. et al. Diagnóstico sobre a avifauna apreendida e entregue espontaneamente na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Brazilian Journal of Biology*, v.8, p. 279-84, 2010.
- AVISE, J.C. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 511.
- BALLOU, J.D.; LACY, R.C. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. In: BALLOU, J.D.; GILPIN, M.; FOOSE, T.J. (eds.). *Population Management for Survival & Recovery*. Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation. New York: Columbia University Press, 1995. p. 76-111.
- BELKHIR K. et al. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier. 1996-2004.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2013a. *Birds are found almost everywhere in the world, from the poles to the equator*. Presented as part of the BirdLife State of the world's birds website. 2013. Disponível em: <<http://www.birdlife.org/datazone/sowb/casestudy/60>>. Acesso em: 01 de mar. de 2014.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2013b. *One in eight of all bird species is threatened with global extinction*. Presented as part of the BirdLife State of the world's birds website. 2013. Disponível em: <<http://www.birdlife.org/datazone/sowb/casestudy/106>>. Acesso em: 27 de fev. de 2014.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. *IUCN Red List for birds*. 2014. Disponível em: <<http://www.birdlife.org>>. Acesso em 02/03/2014.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Threatened birds of the world 2008*. Cambridge: BirdLife International, 2008. CD-ROM
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. *We have lost over 150 bird species since 1500*. Presented as part of the BirdLife State of the world's birds website. 2011. Disponível em: <<http://www.birdlife.org/datazone/sowb/casestudy/102>>. Acesso em: 04 de mar. de 2013.



- 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, 1980.
- BOWCOCK, A.M. et al. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, v. 368, p. 455-457, 1994.
- BRASIL. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos CBRO. *Listas das aves do Brasil*. 10<sup>a</sup> ed., 2011, 37p. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/CBRO/pdf/AvesBrasil2011.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2013.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Convenção sobre a diversidade biológica: Panorama da Biodiversidade Global*. 3.ed. Brasília: MMA/SBF, 2010. 94 p.
- BROOKFIELD, J. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 453-455, 1996.
- BRYANT, E.H; REED, D.H. Fitness decline under relaxed selection in captive populations. *Conservation Biology*, v. 13, p. 665–669, 1999.
- CAPARROZ, R.; MIYAKI, C.Y.; BAKER, A.J. Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes*, v. 10, p. 1046-1048, 2003.
- CARCIOFI, A.C; PRADA, C.S; MORI, C.S. Evaluation of fruit-seed based diets for parrots (*Amazona sp*): Determination of food selection and nutritional composition. *Ars Veterinária*, v.19, p.13-20, 2003.
- CARCIOFI, A.C; SAAD, C.E.P. Nutrition and nutritional problems in wild animal In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. (Eds). *Biology, medicine, and surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press: Ames, 2001. p. 425-434.
- CARLSSON, J. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity*, v. 99, p. 616-623, 2008.
- CARRERAS, C. et al. Living Together but Remaining Apart: Atlantic and Mediterranean Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) in Shared Feeding Grounds. *Journal of Heredity*, v. 102, p. 666-677, 2011.
- CHAKRABORTY, R. et al. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, v. 56, p. 45-57, 1992.
- CHISTIAKOV, D.A.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review special reference to fish genetics. *Science Direct*, v. 225, p. 1-29, 2006.
- COLLAR, N.J. et al. *Threatened birds of the Americas: the ICBP/IUCN Red Data Book*. Cambridge: International Council for Bird Preservation, 1992. 1150p.



- COLLAR, N.J. Family Psittacidae (Parrots). In: DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.E.; SARGATAL, J. (Eds.). *Handbook of the Birds of the World*. v. 4, Barcelona: Lynx Edicions, 1997. p. 280-477.
- COMISSÃO TÉCNICA DA ABRASE. Arara azul *Anodorhynchus hyacinthinus* “A rainha das aves brasileiras. FERREIRA, V.R. (Sup). ABRASE, 2010. Disponível em: <<http://www.abrase.com.br/arquivos/comissao%20tecnica/ARARA%20AZUL%20GRANDE%20%20CRIACAO%20E%20OBSERVACOES.pdf>>. Acesso em: 20 mar. De 2012.
- CORNUET, J-M et al. New Methods Employing Multilocus Genotypes to Select or Exclude Populations as Origins of Individuals. *Genetics Society of America*, v. 153, p. 1989-2000, 1999.
- CRONIN, M.A.; RENECKER, L.A.; PATTON, J.C. Genetic variation in domestic and wild elk (*Cervus elaphus*). *Journal of Animal Science*, v. 87, p. 829-834, 2009.
- CSILLERY K. et al. Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics*, v.173, p. 2091-2101, 2006.
- DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL J. *Handbook of the birds of the World*. v. 5. Barcelona: Lynx Edicions, 1999. 759 p.
- DESALLE, R.; AMATTO, G. The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 702-712, 2004.
- DIEGUES, S.; PAGANI, M.I. O papel dos zoológicos paulistas na conservação *ex situ* da diversidade biológica. In: *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu, 2007.
- EBENHARD, T. Conservation breeding as a tool for saving animal species from extinction. *Trends in Ecology & Evolution*. v.10, p. 438-43, 1995.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19, p. 23-29, 1996.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 564-567, 2010.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4<sup>ed</sup>. Longmans. Green: Harlow, Essex, UK. 1996. 464p.
- FORSHAW, J.M; KNIGHT, F. *Parrots of the world: an identification guide*. Princeton: Princeton University Press, 2006, 400p.
- FRANCISCO, L.R. *Resposta reprodutiva de psitacídeos neotropicais em cativeiro à retirada de ovos e filhotes*. 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Zoologia). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.



FRANKHAM, G.J. et al. Molecular detection of intra-population structure in a threatened potoroid, *Potorous tridactylus*: conservation management and sampling implications. *Conservation Genetics*, v. 15, 2013.

FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, v. 17, p. 325-333, 2008.

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

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., BRISCOE, D.A. *A Primer of Conservation Genetics*. New York : Cambridge University Press, 2004. 236p.

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

FRIDOLFSSON, A.K; ELLEGREN, H. Molecular evolution of the avian CDH1 genes on the Z and W Sex chromosomes. *Genetics*, v.155, p.1903-1912, 2000.

GALETTI, M.; GUIMARÃES Jr, P.; MARSDEN, S. Padrões de Riqueza, Risco de Extinção nos Psitacídeos. In: GALETTI, M.; PIZO, M.A. (Orgs.). *Ecologia e Conservação de Psitacídeos no Brasil*. 1º ed. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas, 2002, p. 17-26.

GEBHARDT, K.J; WAITS, L.P. Cross-species amplification and optimization of microsatellite markers for use in six neotropical parrots. *Molecular Ecology Resources*, v. 4, p. 835-839, 2008.

GIOVANINI, D. "Diagnóstico del comercio ilegal de la fauna brasileña". In: MONTOYA, F. N.; CRANE, R. (Ed.) *Actitudes hacia la fauna en Latinoamérica*. Washington: Humane Society Press, 2000. p. 13-26.

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

GRIFFITHS, R. et al. A DNA test to sex most birds: Short communication. *Molecular Ecology*, v.7, p.1071-1075, 1998.

GRIFFITHS, R. Sex identification in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v.9, p.14-26, 2000.

GUEDES, N.M.R. Alguns aspectos sobre o comportamento reprodutivo da araraazul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) e a necessidade de manejo para a conservação da espécie. In *Anais de Etologia*, Pirassununga, 274-292, 1995.

GUEDES, N.M.R. *Biologia reprodutiva da Arara Azul (Anodorhynchus hyacinthinus) no Pantanal-MS. Brasil*. 1993. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.



GUEDES, N.M.R. Management and conservation of the large macaws in the wild. *Ornitologia Neotropical*, v. 14, p. 279-283, 2004.

GUEDES, N.M.R. The Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) Project in the Pantanal South, Brazil. In: *Congresso Mundial sobre Papagaios. Conservando Los Loros y Sus Habitats*, V ed. Loro Parque, Tenerife, Espanha, p.163-174, 2002.

GUEDES, N.M.R.; BIANCHI, C.A.; BARROS, Y. *Anodorhynchus hyacinthinus*. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. (Eds.): *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, II*. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 467-468.

GUEDES, N.M.R; HARPER, L.H. 1995. Hyacinth Macaw in the Pantanal. In: ABRAMSON, J; SPEER; B.L; THOMSEN, J.B (Eds.), *The large macaws: their care, breeding and conservation*. Fort Bragg: Raintree Publications, 1995. p. 394-421.

HAUSKNECHT, R. et al. Phylogeographic analysis and genetic cluster recognition for the conservation of Ural Owls (*Strix uralensis*) in Europe. *Journal of Ornithology*, v. 155, p. 121-134, 2014.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Eds). *Molecular Systematics*. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 655 p.

HUGHES, C.R.; MELAND, R.R.; BEISSINGER, S.R. Polymorphic trinucleotide microsatellite loci for neotropical parrot, the green-rumped parrotlet, *Forpus passerinus*. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 1247-1248, 1998.

IUCN. *IUCN Red List Categories and Criteria: Versão 3.1*. 2. ed. Gland, Switzerland and Cambridge: IUCN Species Survival Commission, 2012. 32 p.

IUCN. *IUCN Red List of Threatened Species*. Versão 2013.2. 2013. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 30 de jan. de 2014.

JIN, L.; CHAKRABORTY, R. Estimation of Genetic Distance and Coefficient of Gene Diversity from Single-Probe Multilocus DNA Fingerprinting Data. *Molecular Biology and Evolution*, v. 11, p. 120-127, 1994

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

JUNIPER, T.; PARR, M. *Parrots: A Guide to Parrots of the World*. New Haven: Yale University Press, 1998. 389p.

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.

LEWINSOHN, T.M. (Coord.). *Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira*. Brasília: MMA, v.2, 2006. CD-ROM.



- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade*, v. 1, p. 36-42, 2005.
- LI, C. C.; WEEKS, D. E.; CHAKRAVARTI, A. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Human Heredity*, v. 43, p. 45-52, 1993.
- LYNCH, M. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, v. 5, p. 584-599, 1998.
- LYNCH, M. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In: AVISE, J.; HAMRICK, J. (eds.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New York: Chapman and Hall, 1996, p. 471-501.
- LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, v. 152, p. 1753-1766, 1999.
- LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, v. 152, p. 1753-1766, 1999.
- LYNCH, M.; WALSH, B. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits* Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA, 1998. 980p.
- MANEL, S.; BERTHIER, P.; LUIKART, G. Detecting Wildlife Poaching: Identifying the Origin of Individuals with Bayesian Assignment Tests and Multilocus Genotypes. *Conservation Biology*, v. 16, p. 650-659, 2002.
- MARSHALL, T. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 639, 1998.
- MATIOLI, S.R. *Biologia Molecular e Evolução*. 12. ed., Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. 202 p.
- MAUDET, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science*, v. 80, p. 942-950, 2002.
- 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, p. 25-36, 2006.
- MILLIGAN, B.G. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*, v.163, p.1153-1167, 2003.
- MIÑO, C.I.; DEL LAMA, S.N. Molted Feathers as a source of DNA for genetic studies in Waterbird Populations. *Waterbirds*, v. 32, p. 322-329, 2009.
- MITCHELL, A.A. et al. Using microsatellite diversity in wild Anegada iguanas (*Cyclura pinguis*) to establish relatedness in a captive breeding group of this critically endangered species. *Conservation Genetics*, v. 12, p.771-781, 2011.





MIYAKI, C.Y. et al. Estudo da variabilidade genética e da razão sexual de uma população silvestre de arara azul do Pantanal. In: Congresso Nacional de Genética, 410, *Revista brasileira de Genética/Brazilian Journal of genetics*, v. 18, p.314, 1995.

MMA. MINISTÉRIO DE MEIO AMBIENTE 2003. *Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Instrução Normativa do Ministério do Meio Ambiente nº 03/2003, Diário Oficial da União nº 101, Seção 1, p. 88-97, dia 28.05.2003.

MMA. MINISTÉRIO DE MEIO AMBIENTE. MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P. (Eds.). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. 1. ed., Brasília: MMA, 2008. 1420p

MMA. MINISTÉRIO DE MEIO AMBIENTE. Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF). *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da mata atlântica e campos sulinos*. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2012. 45 p.

MUNN, C.A.; THOMSEN, J.B.; YAMASHITA, C. *The distribution and status of the Hyacinth Macaw (Anodorhynchus hyacinthinus) in Brazil, Bolívia and Paraguay*. Report to the Secretaria of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. New York: Conservation International, 1987. 50p.

NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Nova York: Columbia University Press, 1987. 512p.

O'BRIEN, S.J. Animal conservation genetics - an overview with relevance to captive breeding programmes. *EAZA News*, v. 57, p. 26-35, 2006.

OLIVEIRA, E.J. et. al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 94-307, 2006.

PAETKAU, D. et al. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics*, v. 147, p. 1943-1947, 1997.

PAETKAU, D. et al. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol. Ecol.* v. 13, p. 55-65, 2004.

PAETKAU, D. et al. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, v. 4, p. 347-354, 1995.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, v.28, p. 2537-2539, 2012.

PEREIRA, J.C.C. *Melhoramento genético aplicado à produção animal: Aplicação da biotecnologia reprodutiva no melhoramento animal*. 4. ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004. p.195-221.

PÉREZ-ESPONA, S. et al. The impact of past introductions on an iconic and economically important species, the Red Deer of Scotland. *Journal of Heredity* v. 104, p. 14-22, 2013.



PINHO, J.B.; NOGUEIRA, F.M.B. Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) reproduction in the northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Ornitologia Neotropical*, v. 14, p. 29-38, 2003.

PIRY, S; et al. GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection' *Journal of Heredity*, v. 95, p. 536-539, 2004.

PRESTI, F.T. *Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de arara-azul-grande-grande-grande (Anodorhynchus hyacinthinus) por meio da análise do genoma nuclear e mitocondrial*. 2010. 87p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Evolutiva). Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2010.

PRESTI, F.T. *Caracterização da variabilidade genética em espécies de psitacídeos ameaçados*. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Evolutiva). Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2006.

PRESTI, F.T. et al. Comparative analysis of microsatellite variability in five macaw species (Psittaciformes, Psittacidae): application for conservation. *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, p. 348–352, 2011.

PRIMACK, R.B., RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Londrina: Vida, 2001. 328 p.

PRIMMER C.R., PAINTER J.N., KOSKINEN MT, PALO JU, MERILÄ J (2005) Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36:348-360.

PRIMMER, C.R et al. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, v. 7, p. 471-482, 1997.

PRITCHARD, J.K.; MATTHEW, S.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, p. 945-959, 2000.

QUELLER, D.C.; GOODNIGHT, K.F. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, v. 43, p. 258-275, 1989.

RALLS, K.; BALLOU, J. Extinction: lessons from zoos. In: *Genetic and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. SCHONEWALD-COX, C.; CHAMBERS, S.; MACBRYDE, B.; THOMAS, L. (eds.). Benjamin and Cummings, Menlo Park, CA, 1983. p. 164-184.

RAMIREZ, O. et al. Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics*, v. 7, p. 861-878, 2006.

RANNALA, B.; MOUNTAIN, J.L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, p. 9197-9201, 1997.

RASO, T.F.; WERTHER, K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, p.187-192, 2004.





RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop: Population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 248-249, 1995.

RENTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. *1º Relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre*. Brasília: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres; 2002. 30p.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v. 43, p. 223-225, 1989.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and inbreeding coefficients. *Genetics Research*, v. 67, p. 175-186, 1996.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research*, v. 67, p. 175-185, 1999.

RUDNICK, J.A.; LACY, R.C. The impact of assumptions about founder relationships on the effectiveness of captive breeding strategies. *Conservation Genetics*, v 9, p. 439-450, 2008.

RUSSELLO, M. et al. Characterization of microsatellite loci in the endangered St.Vicent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes*, v. 1, p.13-15, 2001.

RUSSELLO, M.A. et al. Additional microsatellite loci for endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Conservation Genetics*, v. 6, p. 643-645, 2005.

RUSSELLO, M.A. et al. Lineage identification of Galápagos tortoises in captivity worldwide. *Animal Conservation*, v. 10, p. 304-311, 2007.

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

SAMBROOK J.; FRITSCH E.; MANIATIS T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3 ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2344 p.

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

SCHWARTZ, O.A.; ARMITAGE, K B. Problems in the use of genetic similarity to show relatedness. *Evolution*, v. 37, p. 417-420, 1983.

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997, 862 p.

SICK, H.; GONGAZAGA, L.P.; TEIXEIRA, D.M. A arara-azul-grande-grande-de-Lear, *Anodorhynchus leari* Bonaparte. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.3, p. 441-463, 1987.

SOUZA, A.S.M.C.; MIÑO, C.I.; DEL LAMA, S.N. Polymorphic heterologous microsatellite loci for population genetics studies of the white-faced ibis *Plegadis chihi* (Vieillot, 1817) (Pelecaniformes, Threskiornithidae). *Genetics and Molecular Biology*, v.35, p.74-80, 2012.



SOUZA, L.C. *Diagnóstico do atual status do tráfico de animais silvestres no Brasil*. 2007. 51 f. Monografia (Bacharel em Engenharia Florestal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SPOTTISWOODE, C.; MØLLER, A.P. Genetic similarity and hatching success in birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 271, p. 267–272, 2004.

SUNNY, A. et al. Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in Mexico. *Conservation Genetics*, v. 15, p. 49–59, 2014.

SYNDER, N.F.R. et al. *Parrots: status survey and conservation action plan 2000-2004*. Cambridge: IUCN, Glanz, 2000. 180p.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 12, p. 4126-4138, 1984.

TAYLOR, T.D.; PARKIN, D.T. Characterization of 12 microsatellite primers pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across the Psittaciformes. *Molecular Ecology Notes*, v.7, p. 163-167, 2007.

TEMPLETON, A.R. *Genética de Populações e Teoria Microevolutiva*. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2011, 705p.

THOMAS, S.C.; HILL, W.G. Estimating quantitative genetic parameters using sibships reconstructed from marker data. *Genetics*, v. 155, p. 1961-72, 2000.

TOMAS, W.M.; SOUZA, L.L.; TUBELIS, D.P. Espécies de aves ameaçadas que ocorrem no Pantanal. In: *IV Simpósio sobre Recursos naturais e Sócio-econômicos do Pantanal*. 2004, Corumbá, Brasil. p. 1-10. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/>>. Acesso em 05 de mar. de 2012.

TROMBULAK, S.C et al. Principles of conservation biology: recommended guidelines for conservation literacy from the education committee of the Society for Conservation Biology. *Conservation Biology*, v. 18, p. 1180-1190, 2004.

VAN DE CASTEELE, T.; GALBUSERA, P.; MATTHYSEN, E. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, v. 10, p.1539 –1549, 2001.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 535-538, 2004.

VÁSQUEZ-CARRILLO, C. et al. Integrating population and genetic monitoring to understand changes in the abundance of a threatened seabird. *Biological Conservation*, v. 167 p. 173–178, 2013.

WAGNER, A.P; CREEL, S.; KALINOWSKI, S.T. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity*, v. 97, p. 336-345, 2006.



- WANG, J. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, v. 160, 1203-1215, 2002.
- WANG, J. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, v.11, p. 141-145, 2011.
- WANG, J. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetics Research*, v. 89, p. 135-153, 2007.
- WASER, P.M.; STROBECK, C. Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 13, p. 43-44, 1998.
- WEBB, J. Prosecuting wildlife traffickers: important cases, many tools, good results. *Journal of Environmental Law*, v. 2, p.1-12, 2000-2001.
- WITZENBERGER, K.A.; HOCHKIRCH, A. Evaluating ex situ conservation projects: Genetic structure of the captive population of the Arabian sand cat. *Mammalian Biology*, v. 78, p. 379-382, 2013.
- YAMASHITA, C. Comportamento de araraúna (*Anodorhynchus hyacinthinus*) Psittacidae, Aves. *Anais de Etologia*, Jaboticabal, v.10, p.158-162, 1992.
- YAMASHITA, C. Field observations and comments on the Indigo Macaw *Anodorhynchus leari*, a highly endangered species from northeastern Brazil. *Wilson Bulletin*, v. 99, p. 280-282. 1987.
- YAMASHITA, C.; VALLE, M.P. On linkage between *Anodorhynchus* macaws and palm nuts, and the extinction of the Glaucous Macaw. *Bull. Oxford: Blackwell Publishing*, v. 113, p.53-60, 1993.



## APÊNDICES



## APÊNDICE A

Tabela A - Dados dos espécimes cativos de arara-azul-grande analisados. Registro do laboratório (RL), número de registro da instituição (NRI) (microchip(M)/anilha(A)/registro interno(RI)), instituição, sigla da instituição, sexo informado (SI), origem do espécime, data de coleta (DC), material biológico amostrado (MBA) e outras informações relevantes (InfoR).

RL	NRI	Instituição	Sigla	SI	Origem	DC	MBA	InfoR
1	150596(A)	Parque Ecológico de São Carlos	PESC	F	Apreensão (casa em SP)	25/04/2012	sangue	
2	161054(A)	Parque Ecológico de São Carlos	PESC	F		10/10/2013	sangue	
3	-	Parque Ecológico de São Carlos	PESC	M		01/05/2012	pena do recinto	
4	3052 (RI) 963000000190575(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	F	CC Alcides Ventemati	03/10/2012	pena canhão	
5	21B6 (RI)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	M	Fazenda Veneza	03/10/2012	pena canhão	
6	3675(RI) 963008000001105(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	F	Mantedouro A, Anargyro	03/10/2012	pena canhão	
7	3482(RI) 963000000271704(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	F	CRAS/MS	03/10/2012	pena canhão	
8	963008000000944(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	F	Mantedouro A, Anargyro	03/10/2012	pena da asa	
9	3046(RI) 963002000001078(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	M	Zoo São Bernardo do Campo	03/10/2012	pena canhão	
10	26517(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F	Cativeiro - FPZSP	30/10/2012	sangue	
11	28751(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		30/10/2012	sangue	pais: 33 e 35
12	27064(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	M	Rondônia	30/10/2012	sangue	20/30 anos
13	27066(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		30/10/2012	sangue	
14	28533(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		30/10/2012	sangue	progenitor 34
15	28370(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		30/10/2012	sangue	pais: 33 e 35
16	28374(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	M		30/10/2012	sangue	pais: 33 e 35
17	28532(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		30/10/2012	sangue	progenitor 34
18	28706(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	M		30/10/2012	sangue	progenitor 34
19	1058(RI)	Parque Ecológico Mourão de Leme	PEML	M	FPZSP	31/10/2012	pena canhão	
20	66618(RI) 963000000066618(M)	Zoológico Municipal de Bauru	ZMB	M	Fundação Zoo Rio	08/05/2013	sangue	pode ter sido trocado
21	3865(RI) 963008000003865(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	M	Mantedouro A, Anargyro	04/06/2012	pena canhão	
22	924(RI) 96300800000924(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	F	Mantedouro A, Anargyro	04/06/2012	pena canhão	
23	1063(RI) 96300800001063(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	M	Mantedouro A, Anargyro	04/06/2012	pena canhão	



24	1692(RI) 96300800001692(M)	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	F	Mantenedouro A, Anargyro	04/06/2012	pena canhão
25	5037AB(RI)	Zoológico Municipal de Piracicaba	ZMPira	M		05/07/2013	pena
26	5016(RI)	Zoológico Municipal de Piracicaba	ZMPira	F		05/07/2013	pena
27	26871(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		11/07/2013	sangue
28	27298(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		11/07/2013	sangue
29	26870(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	M		11/07/2013	sangue
30	27654(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		11/07/2013	sangue
31	26868(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		11/07/2013	sangue
32	24165(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		11/07/2013	sangue
33	27160(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	F		11/07/2013	sangue
34	26869(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	M		11/07/2013	sangue
35	23407(RI)	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	M		11/07/2013	sangue
36	50895 (A)	Parque Ecológico de São Carlos	PESC	M	Criadouro SP fechado	10/10/2013	sangue
37	50286(A)	Parque Ecológico de São Carlos	PESC	M	Criadouro SP fechado	10/10/2013	sangue
38	086(A)	Zoológico Municipal de Sorocaba	ZMSQB	I	Natureza	29/10/2013	sangue
39	109 (A) 0061C3322F(M)	Quinzinho de Barros Zoológico Municipal de Sorocaba	ZMSQB	M	Natureza - Zoo Guarulhos	29/10/2013	sangue
40	033(A) 963000000004127(M)	Quinzinho de Barros Zoológico Municipal de Sorocaba	ZMSQB	M	Natureza - Flona de Ipanema	29/10/2013	sangue
41	39672(RI) 963007000039672(M)	Quinzinho de Barros Zoológico Municipal de Sorocaba	ZMSQB	F	Zoo Sorocaba - Cativeiro	29/10/2013	sangue
42	963007000039753(M)	Quinzinho de Barros Zoológico Municipal de Sorocaba	ZMSQB	I	Zoo Sorocaba - Cativeiro	29/10/2013	sangue/pena canhão
43	ibama 691(A)	Zoológico Municipal de Taboão da Serra	ZMTS	M	retenção 19 anos	28/10/2013	pena canhão
44	ibama 232(A)	Zoológico Municipal de Taboão da Serra	ZMTS	F	retenção 24 anos	28/10/2013	pena canhão
45	132/2003(RI)468 (d)	Parque Zoológico Municipal de Santos	PZOMS	M	Zoo São Bernardo do Campo	12/11/2013	sangue
46	5181/AB(RI)	Parque Zoológico Municipal de Boituva	PZMB	M		08/11/2013	pena canhão
47	045 e 5009(RI)	Parque Zoológico Municipal de Boituva	PZMB	F		08/11/2013	pena canhão
48	ZRAO 438(RI)	Zoológico Municipal de Ribeirão Preto	ZMRP	F		21/11/2013	pena
49	ZRAO439(RI)	Zoológico Municipal de Ribeirão Preto	ZMRP	I		21/11/2013	pena
50	ZRAO437(RI)	Zoológico Municipal de Ribeirão Preto	ZMRP	M		21/11/2013	pena



## APÊNDICE B

Tabela B – Estimativas de parentesco e similaridade genética entre os 49 espécimes de arara-azul-grande em cativeiro. Valores de parentesco ( $r$ ) segundo Wang (2007) (TML) e Lynch e Li (1999) (LynchLi), suposto relacionamento por estimativas de verossimilhança: irmão-completo (FS), pai e filho (PO), meio-irmão (HS) e não relacionado (U) e similaridade genética entre os espécimes cativos de arara-azul-grande.

Nº	Par	TML	LynchLi	ML	P <sub>s</sub>							
1	1 2	0,000	-0,671	U	0,40	48	1 50	0,000	-0,504	U	0,45	
2	1 4	0,117	0,248	U	0,70	49	2 4	0,057	-0,170	U	0,45	
3	1 5	0,205	0,332	U	0,75	50	2 5	0,000	-0,253	U	0,55	
4	1 6	0,000	-0,170	U	0,50	51	2 6	0,136	0,081	U	0,65	
5	1 7	0,000	-0,588	U	0,40	52	2 7	0,155	0,081	U	0,65	
6	1 8	0,318	0,550	FS	0,83	53	2 8	0,000	-0,261	U	0,44	
7	1 9	0,000	-0,081	U	0,44	54	2 9	0,139	0,010	HS	0,50	
8	1 10	0,147	0,415	HS	0,75	55	2 10	0,000	-0,003	U	0,50	
9	1 11	0,124	0,415	HS	0,75	56	2 11	0,000	-0,253	U	0,45	
10	1 12	0,098	-0,253	U	0,50	57	2 12	0,000	-0,421	U	0,45	
11	1 13	0,252	0,415	FS	0,75	58	2 13	0,000	-0,003	U	0,55	
12	1 14	0,000	-0,337	U	0,50	59	2 14	0,374	0,582	FS	0,75	
13	1 15	0,423	0,415	PO	0,70	60	2 15	0,109	-0,003	U	0,60	
14	1 16	0,446	0,415	PO	0,75	61	2 16	0,000	-0,421	U	0,45	
15	1 17	0,000	-0,086	U	0,55	62	2 17	0,251	0,499	PO	0,70	
16	1 18	0,000	0,081	U	0,60	63	2 18	0,000	0,164	U	0,60	
17	1 19	0,000	-0,504	U	0,45	64	2 19	0,028	-0,337	U	0,40	
18	1 20	0,000	-0,253	U	0,45	65	2 20	0,043	-0,421	U	0,35	
19	1 21	0,073	0,164	HS	0,60	66	2 21	0,000	-0,337	U	0,35	
20	1 22	0,000	0,081	U	0,65	67	2 22	0,115	-0,003	U	0,60	
21	1 23	0,054	0,164	U	0,70	68	2 23	0,000	-0,253	U	0,50	
22	1 24	0,000	-0,086	U	0,60	69	2 24	0,000	-0,253	U	0,50	
23	1 25	0,224	-0,003	HS	0,55	70	2 25	0,000	-0,421	U	0,40	
24	1 26	0,000	-0,170	U	0,50	71	2 26	0,000	-0,588	U	0,35	
25	1 27	0,000	0,164	U	0,60	72	2 27	0,000	-0,337	U	0,50	
26	1 28	0,081	0,081	U	0,60	73	2 28	0,034	-0,421	U	0,45	
27	1 29	0,000	-0,170	U	0,60	74	2 29	0,039	-0,253	U	0,50	
28	1 30	0,000	-0,671	U	0,30	75	2 30	0,068	-0,588	U	0,40	
29	1 31	0,094	0,248	U	0,70	76	2 31	0,000	-0,421	U	0,40	
30	1 32	0,133	0,010	HS	0,56	77	2 32	0,000	-0,261	U	0,44	
31	1 33	0,448	0,415	FS	0,80	78	2 33	0,000	-0,003	U	0,55	
32	1 34	0,000	-0,003	U	0,60	79	2 34	0,091	0,081	U	0,60	
33	1 35	0,318	0,499	FS	0,80	80	2 35	0,000	-0,504	U	0,40	
34	1 36	0,054	0,248	U	0,70	81	2 36	0,089	0,081	U	0,60	
35	1 37	0,231	0,499	FS	0,75	82	2 37	0,000	0,081	U	0,60	
36	1 38	0,000	-0,086	U	0,55	83	2 38	0,040	-0,671	U	0,30	
37	1 39	0,047	0,248	U	0,60	84	2 39	0,000	-0,671	U	0,40	
38	1 40	0,000	-0,207	U	0,56	85	2 40	0,000	-0,380	U	0,50	
39	1 41	0,000	-0,421	U	0,50	86	2 41	0,132	-0,170	U	0,60	
40	1 42	0,000	-0,253	U	0,50	87	2 42	0,091	-0,170	U	0,55	
41	1 43	0,500	0,571	PO	0,75	88	2 43	0,000	-0,393	U	0,50	
42	1 44	0,000	0,370	U	0,67	89	2 44	0,111	-0,261	HS	0,50	
43	1 45	0,246	0,332	HS	0,65	90	2 45	0,000	-0,253	U	0,50	
44	1 46	0,098	-0,170	HS	0,55	91	2 46	0,000	-0,504	U	0,40	
45	1 47	0,237	0,250	U	0,69	92	2 47	0,000	-0,286	U	0,44	
46	1 48	0,076	0,248	U	0,70	93	2 48	0,000	-0,253	U	0,50	
47	1 49	0,000	-0,253	U	0,50	94	2 49	0,182	-0,086	HS	0,60	
						95	2 50	0,490	0,415	PO	0,70	
						96	4 5	0,000	0,248	U	0,65	



97	4	6	0,000	-0,086	U	0,50	154	5	18	0,500	0,582	PO	0,75
98	4	7	0,000	-0,755	U	0,35	155	5	19	0,000	-0,086	U	0,55
99	4	8	0,405	0,550	FS	0,78	156	5	20	0,041	-0,086	U	0,55
100	4	9	0,079	0,100	HS	0,61	157	5	21	0,000	0,164	U	0,60
101	4	10	0,270	0,499	FS	0,75	158	5	22	0,287	0,248	FS	0,75
102	4	11	0,018	0,332	U	0,70	159	5	23	0,000	0,081	U	0,65
103	4	12	0,091	-0,003	U	0,60	160	5	24	0,250	0,415	HS	0,75
104	4	13	0,109	0,332	HS	0,65	161	5	25	0,000	-0,421	U	0,45
105	4	14	0,097	0,081	U	0,55	162	5	26	0,000	-0,086	U	0,50
106	4	15	0,000	0,332	U	0,65	163	5	27	0,510	0,666	PO	0,80
107	4	16	0,130	0,332	HS	0,70	164	5	28	0,000	-0,170	U	0,55
108	4	17	0,179	0,164	HS	0,60	165	5	29	0,000	0,081	U	0,65
109	4	18	0,000	0,332	U	0,60	166	5	30	0,000	-0,170	U	0,50
110	4	19	0,000	-0,588	U	0,45	167	5	31	0,500	0,582	PO	0,75
111	4	20	0,000	-0,253	U	0,55	168	5	32	0,000	-0,081	U	0,56
112	4	21	0,000	-0,086	U	0,60	169	5	33	0,574	0,749	FS	0,85
113	4	22	0,000	-0,003	U	0,65	170	5	34	0,459	0,499	FS	0,80
114	4	23	0,059	0,081	U	0,65	171	5	35	0,000	0,164	U	0,65
115	4	24	0,000	-0,086	U	0,55	172	5	36	0,214	0,332	U	0,75
116	4	25	0,067	0,081	U	0,55	173	5	37	0,353	0,666	PO	0,80
117	4	26	0,000	-0,337	U	0,55	174	5	38	0,000	-0,086	U	0,50
118	4	27	0,000	0,164	U	0,60	175	5	39	0,255	0,415	HS	0,70
119	4	28	0,500	0,415	PO	0,70	176	5	40	0,054	-0,035	U	0,61
120	4	29	0,000	-0,086	U	0,60	177	5	41	0,031	-0,003	U	0,65
121	4	30	0,087	-0,253	HS	0,45	178	5	42	0,180	0,248	HS	0,65
122	4	31	0,000	0,332	U	0,70	179	5	43	0,026	0,250	U	0,69
123	4	32	0,000	-0,171	U	0,44	180	5	44	0,237	0,550	PO	0,78
124	4	33	0,239	0,499	FS	0,75	181	5	45	0,500	0,499	PO	0,75
125	4	34	0,000	-0,086	U	0,50	182	5	46	0,000	-0,421	U	0,45
126	4	35	0,010	0,248	U	0,65	183	5	47	0,014	0,143	U	0,63
127	4	36	0,000	0,248	U	0,65	184	5	48	0,273	0,415	HS	0,75
128	4	37	0,206	0,415	U	0,70	185	5	49	0,025	-0,003	U	0,60
129	4	38	0,383	0,332	FS	0,75	186	5	50	0,000	-0,170	U	0,55
130	4	39	0,000	-0,086	U	0,55	187	6	7	0,280	0,332	HS	0,75
131	4	40	0,000	-0,207	U	0,44	188	6	8	0,000	0,190	U	0,61
132	4	41	0,000	-0,253	U	0,45	189	6	9	0,000	0,100	U	0,61
133	4	42	0,000	-0,170	U	0,50	190	6	10	0,000	0,248	U	0,60
134	4	43	0,044	0,143	U	0,56	191	6	11	0,000	0,248	U	0,60
135	4	44	0,000	-0,081	U	0,56	192	6	12	0,061	0,081	U	0,65
136	4	45	0,488	0,415	PO	0,70	193	6	13	0,000	-0,003	U	0,55
137	4	46	0,041	0,081	U	0,60	194	6	14	0,440	0,332	PO	0,70
138	4	47	0,318	0,464	FS	0,81	195	6	15	0,266	0,415	HS	0,70
139	4	48	0,230	0,081	U	0,70	196	6	16	0,000	-0,086	U	0,50
140	4	49	0,000	-0,170	U	0,45	197	6	17	0,158	0,248	HS	0,65
141	4	50	0,000	-0,170	U	0,45	198	6	18	0,367	0,415	HS	0,70
142	5	6	0,000	0,332	U	0,70	199	6	19	0,500	0,415	PO	0,65
143	5	7	0,000	-0,170	U	0,55	200	6	20	0,185	0,081	HS	0,55
144	5	8	0,129	0,550	U	0,78	201	6	21	0,000	0,164	U	0,60
145	5	9	0,000	0,100	U	0,50	202	6	22	0,342	0,582	PO	0,75
146	5	10	0,000	0,415	U	0,70	203	6	23	0,000	0,164	U	0,65
147	5	11	0,000	0,415	U	0,70	204	6	24	0,165	0,248	HS	0,65
148	5	12	0,000	0,081	U	0,60	205	6	25	0,006	-0,253	U	0,55
149	5	13	0,081	0,332	U	0,70	206	6	26	0,044	0,081	U	0,55
150	5	14	0,000	0,164	U	0,65	207	6	27	0,085	0,248	U	0,65
151	5	15	0,354	0,582	PO	0,80	208	6	28	0,000	-0,170	U	0,60
152	5	16	0,245	0,415	HS	0,70	209	6	29	0,000	0,081	U	0,60
153	5	17	0,000	0,081	U	0,60	210	6	30	0,181	-0,003	HS	0,55





211	6	31	0,000	0,164	U	0,60	268	7	45	0,000	-0,170	U	0,50
212	6	32	0,000	-0,351	U	0,50	269	7	46	0,000	-0,755	U	0,30
213	6	33	0,000	0,248	U	0,60	270	7	47	0,000	-0,607	U	0,44
214	6	34	0,500	0,499	PO	0,75	271	7	48	0,000	-0,337	U	0,45
215	6	35	0,000	-0,003	U	0,55	272	7	49	0,000	-0,421	U	0,50
216	6	36	0,000	0,164	U	0,65	273	7	50	0,384	0,332	FS	0,70
217	6	37	0,000	0,332	U	0,65	274	8	9	0,000	0,190	U	0,56
218	6	38	0,000	-0,170	U	0,50	275	8	10	0,543	0,730	FS	0,89
219	6	39	0,089	0,248	U	0,65	276	8	11	0,295	0,550	FS	0,83
220	6	40	0,000	-0,380	U	0,44	277	8	12	0,163	0,100	U	0,61
221	6	41	0,000	-0,421	U	0,55	278	8	13	0,207	0,550	PO	0,72
222	6	42	0,252	-0,086	U	0,65	279	8	14	0,107	0,190	U	0,67
223	6	43	0,051	0,143	U	0,69	280	8	15	0,000	0,370	U	0,67
224	6	44	0,000	0,370	U	0,61	281	8	16	0,081	0,370	U	0,72
225	6	45	0,345	0,499	PO	0,70	282	8	17	0,107	0,190	U	0,67
226	6	46	0,000	-0,504	U	0,35	283	8	18	0,307	0,640	FS	0,78
227	6	47	0,000	-0,072	U	0,56	284	8	19	0,054	0,010	HS	0,61
228	6	48	0,000	0,248	U	0,60	285	8	20	0,068	0,010	HS	0,56
229	6	49	0,490	0,332	PO	0,70	286	8	21	0,000	0,100	U	0,61
230	6	50	0,143	0,164	HS	0,70	287	8	22	0,000	0,010	U	0,61
231	7	8	0,000	-0,261	U	0,50	288	8	23	0,525	0,460	FS	0,83
232	7	9	0,142	-0,081	HS	0,56	289	8	24	0,331	0,460	U	0,78
233	7	10	0,000	-0,337	U	0,45	290	8	25	0,000	0,010	U	0,50
234	7	11	0,000	-0,337	U	0,45	291	8	26	0,000	0,100	U	0,61
235	7	12	0,001	-0,588	U	0,50	292	8	27	0,000	0,370	U	0,61
236	7	13	0,000	-0,170	U	0,50	293	8	28	0,502	0,550	PO	0,72
237	7	14	0,131	0,248	HS	0,70	294	8	29	0,450	0,460	PO	0,78
238	7	15	0,000	-0,253	U	0,50	295	8	30	0,074	-0,081	HS	0,44
239	7	16	0,000	-0,671	U	0,35	296	8	31	0,166	0,640	FS	0,83
240	7	17	0,125	0,164	HS	0,65	297	8	32	0,000	0,100	U	0,56
241	7	18	0,000	-0,003	U	0,60	298	8	33	0,599	0,820	FS	0,89
242	7	19	0,172	-0,003	HS	0,60	299	8	34	0,104	0,370	U	0,72
243	7	20	0,079	-0,337	U	0,50	300	8	35	0,295	0,550	FS	0,83
244	7	21	0,000	-0,337	U	0,50	301	8	36	0,394	0,640	FS	0,83
245	7	22	0,093	0,081	U	0,60	302	8	37	0,339	0,640	FS	0,78
246	7	23	0,000	-0,421	U	0,50	303	8	38	0,000	0,010	U	0,61
247	7	24	0,000	-0,337	U	0,50	304	8	39	0,101	0,370	U	0,67
248	7	25	0,000	-0,838	U	0,40	305	8	40	0,000	0,162	U	0,56
249	7	26	0,000	-0,504	U	0,45	306	8	41	0,000	-0,171	U	0,56
250	7	27	0,000	-0,337	U	0,50	307	8	42	0,000	-0,261	U	0,50
251	7	28	0,000	-0,588	U	0,50	308	8	43	0,523	0,679	PO	0,81
252	7	29	0,000	-0,253	U	0,50	309	8	44	0,000	0,280	U	0,61
253	7	30	0,214	-0,086	HS	0,55	310	8	45	0,000	0,280	U	0,61
254	7	31	0,000	-0,337	U	0,50	311	8	46	0,000	-0,261	U	0,50
255	7	32	0,000	-0,441	U	0,44	312	8	47	0,097	0,357	U	0,69
256	7	33	0,000	-0,170	U	0,50	313	8	48	0,000	0,370	U	0,72
257	7	34	0,129	0,332	HS	0,70	314	8	49	0,000	0,100	U	0,61
258	7	35	0,000	-0,588	U	0,40	315	8	50	0,000	0,100	U	0,61
259	7	36	0,000	-0,170	U	0,55	316	9	10	0,000	0,010	U	0,56
260	7	37	0,000	-0,086	U	0,55	317	9	11	0,000	-0,171	U	0,50
261	7	38	0,000	-0,838	U	0,35	318	9	12	0,000	-0,171	U	0,50
262	7	39	0,013	-0,421	U	0,50	319	9	13	0,000	0,100	U	0,44
263	7	40	0,000	-0,552	U	0,39	320	9	14	0,500	0,280	PO	0,61
264	7	41	0,158	-0,421	U	0,55	321	9	15	0,000	0,010	U	0,56
265	7	42	0,000	-0,588	U	0,50	322	9	16	0,000	-0,531	U	0,39
266	7	43	0,043	-0,072	U	0,63	323	9	17	0,500	0,280	PO	0,61
267	7	44	0,000	-0,171	U	0,50	324	9	18	0,000	0,100	U	0,56



325	9	19	0,000	-0,441	U	0,50	382	10	36	0,386	0,749	FS	0,85
326	9	20	0,271	0,280	HS	0,67	383	10	37	0,133	0,582	FS	0,75
327	9	21	0,177	0,190	FS	0,67	384	10	38	0,013	0,164	U	0,65
328	9	22	0,000	-0,081	U	0,50	385	10	39	0,500	0,499	PO	0,70
329	9	23	0,000	-0,261	U	0,44	386	10	40	0,000	-0,121	U	0,50
330	9	24	0,000	0,190	U	0,61	387	10	41	0,000	-0,253	U	0,50
331	9	25	0,010	-0,171	U	0,56	388	10	42	0,000	-0,170	U	0,50
332	9	26	0,000	-0,441	U	0,50	389	10	43	0,500	0,571	PO	0,75
333	9	27	0,000	0,280	U	0,56	390	10	44	0,000	0,190	U	0,56
334	9	28	0,166	0,280	HS	0,67	391	10	45	0,083	0,415	U	0,70
335	9	29	0,115	0,190	PO	0,61	392	10	46	0,019	-0,086	U	0,60
336	9	30	0,000	-0,081	U	0,50	393	10	47	0,011	0,250	U	0,63
337	9	31	0,000	0,190	U	0,56	394	10	48	0,260	0,332	U	0,75
338	9	32	0,000	0,010	U	0,50	395	10	49	0,500	0,415	PO	0,70
339	9	33	0,000	0,190	U	0,50	396	10	50	0,000	0,164	U	0,65
340	9	34	0,350	0,280	HS	0,56	397	11	12	0,000	-0,170	U	0,50
341	9	35	0,000	-0,171	U	0,50	398	11	13	0,500	0,499	PO	0,75
342	9	36	0,000	0,190	U	0,56	399	11	14	0,000	0,081	U	0,60
343	9	37	0,000	0,190	U	0,50	400	11	15	0,422	0,666	PO	0,80
344	9	38	0,057	-0,171	U	0,56	401	11	16	0,594	0,833	FS	0,90
345	9	39	0,000	-0,351	U	0,44	402	11	17	0,044	0,164	U	0,65
346	9	40	0,000	-0,490	U	0,25	403	11	18	0,213	0,499	HS	0,75
347	9	41	0,063	-0,351	U	0,39	404	11	19	0,067	-0,086	U	0,55
348	9	42	0,000	-0,441	U	0,44	405	11	20	0,000	-0,170	U	0,50
349	9	43	0,000	-0,072	U	0,50	406	11	21	0,142	0,415	PO	0,65
350	9	44	0,000	-0,081	U	0,44	407	11	22	0,000	0,164	U	0,65
351	9	45	0,000	-0,261	U	0,44	408	11	23	0,520	0,415	PO	0,80
352	9	46	0,000	-0,531	U	0,44	409	11	24	0,007	0,164	U	0,70
353	9	47	0,000	0,036	U	0,56	410	11	25	0,127	0,081	U	0,60
354	9	48	0,101	0,280	HS	0,67	411	11	26	0,014	-0,086	U	0,60
355	9	49	0,000	-0,531	U	0,39	412	11	27	0,000	0,081	U	0,55
356	9	50	0,204	0,010	HS	0,61	413	11	28	0,000	-0,003	U	0,55
357	10	11	0,800	0,833	FS	0,95	414	11	29	0,248	0,081	U	0,70
358	10	12	0,000	-0,003	U	0,55	415	11	30	0,000	-0,588	U	0,35
359	10	13	0,492	0,499	PO	0,70	416	11	31	0,260	0,666	PO	0,80
360	10	14	0,091	0,248	U	0,65	417	11	32	0,000	-0,171	U	0,50
361	10	15	0,371	0,666	PO	0,80	418	11	33	0,127	0,499	U	0,75
362	10	16	0,446	0,666	FS	0,85	419	11	34	0,000	0,248	U	0,65
363	10	17	0,203	0,332	U	0,70	420	11	35	0,815	0,916	FS	0,95
364	10	18	0,339	0,666	FS	0,80	421	11	36	0,415	0,499	FS	0,80
365	10	19	0,000	-0,253	U	0,50	422	11	37	0,000	0,415	U	0,70
366	10	20	0,000	-0,170	U	0,50	423	11	38	0,014	0,164	U	0,65
367	10	21	0,000	0,248	U	0,60	424	11	39	0,500	0,499	PO	0,70
368	10	22	0,000	0,164	U	0,65	425	11	40	0,041	-0,121	U	0,56
369	10	23	0,556	0,582	FS	0,85	426	11	41	0,000	-0,504	U	0,45
370	10	24	0,201	0,332	U	0,75	427	11	42	0,072	-0,003	U	0,55
371	10	25	0,500	0,248	PO	0,60	428	11	43	0,500	0,571	PO	0,75
372	10	26	0,171	0,081	U	0,65	429	11	44	0,000	0,190	U	0,56
373	10	27	0,000	0,081	U	0,55	430	11	45	0,100	0,415	U	0,70
374	10	28	0,229	0,248	HS	0,60	431	11	46	0,019	-0,253	U	0,55
375	10	29	0,215	0,332	HS	0,75	432	11	47	0,000	0,036	U	0,56
376	10	30	0,000	-0,588	U	0,35	433	11	48	0,073	0,164	U	0,70
377	10	31	0,426	0,499	PO	0,75	434	11	49	0,500	0,415	PO	0,70
378	10	32	0,000	0,010	U	0,50	435	11	50	0,000	-0,086	U	0,60
379	10	33	0,286	0,666	FS	0,80	436	12	13	0,000	-0,170	U	0,40
380	10	34	0,000	0,248	U	0,65	437	12	14	0,170	-0,086	U	0,60
381	10	35	0,675	0,749	FS	0,90	438	12	15	0,000	-0,170	U	0,45



439	12	16	0,000	-0,337	U	0,40	496	13	36	0,479	0,582	PO	0,75
440	12	17	0,049	-0,170	U	0,55	497	13	37	0,348	0,582	FS	0,75
441	12	18	0,251	0,332	U	0,70	498	13	38	0,121	-0,086	U	0,60
442	12	19	0,000	-0,421	U	0,50	499	13	39	0,000	-0,086	U	0,55
443	12	20	0,000	-0,504	U	0,45	500	13	40	0,346	0,310	FS	0,72
444	12	21	0,050	-0,086	U	0,60	501	13	41	0,053	0,164	U	0,60
445	12	22	0,000	-0,337	U	0,50	502	13	42	0,043	-0,086	U	0,50
446	12	23	0,069	-0,086	U	0,60	503	13	43	0,577	0,786	FS	0,88
447	12	24	0,069	-0,003	U	0,60	504	13	44	0,080	0,280	U	0,67
448	12	25	0,045	-0,421	U	0,45	505	13	45	0,074	0,164	U	0,65
449	12	26	0,000	-0,170	U	0,55	506	13	46	0,000	-0,170	U	0,50
450	12	27	0,102	0,248	U	0,65	507	13	47	0,500	0,571	FS	0,75
451	12	28	0,091	-0,086	U	0,60	508	13	48	0,229	0,332	HS	0,65
452	12	29	0,000	-0,170	U	0,55	509	13	49	0,000	-0,170	U	0,55
453	12	30	0,111	-0,086	HS	0,55	510	13	50	0,000	0,164	U	0,60
454	12	31	0,025	0,164	U	0,65	511	14	15	0,000	0,081	U	0,55
455	12	32	0,195	0,100	HS	0,56	512	14	16	0,000	-0,086	U	0,50
456	12	33	0,103	0,164	U	0,60	513	14	17	0,781	0,916	FS	0,95
457	12	34	0,000	-0,086	U	0,55	514	14	18	0,622	0,582	FS	0,85
458	12	35	0,000	-0,421	U	0,45	515	14	19	0,079	-0,086	U	0,60
459	12	36	0,000	0,081	U	0,60	516	14	20	0,104	-0,086	U	0,55
460	12	37	0,154	0,248	U	0,65	517	14	21	0,000	-0,086	U	0,55
461	12	38	0,039	-0,337	U	0,50	518	14	22	0,096	0,248	U	0,65
462	12	39	0,196	0,081	HS	0,60	519	14	23	0,020	-0,086	U	0,65
463	12	40	0,000	0,052	U	0,50	520	14	24	0,198	-0,086	U	0,65
464	12	41	0,006	-0,421	U	0,50	521	14	25	0,000	-0,588	U	0,35
465	12	42	0,000	-0,337	U	0,55	522	14	26	0,000	-0,170	U	0,50
466	12	43	0,000	-0,286	U	0,50	523	14	27	0,125	0,081	U	0,65
467	12	44	0,000	-0,261	U	0,50	524	14	28	0,000	-0,337	U	0,45
468	12	45	0,041	0,081	U	0,60	525	14	29	0,000	-0,170	U	0,55
469	12	46	0,308	-0,086	HS	0,45	526	14	30	0,097	-0,170	U	0,50
470	12	47	0,113	-0,072	U	0,56	527	14	31	0,027	0,081	U	0,65
471	12	48	0,000	-0,170	U	0,55	528	14	32	0,000	-0,081	U	0,50
472	12	49	0,000	-0,253	U	0,50	529	14	33	0,265	0,248	U	0,70
473	12	50	0,017	-0,086	U	0,50	530	14	34	0,515	0,666	FS	0,85
474	13	14	0,000	-0,086	U	0,50	531	14	35	0,000	-0,170	U	0,55
475	13	15	0,247	0,415	HS	0,75	532	14	36	0,000	0,164	U	0,65
476	13	16	0,312	0,332	FS	0,75	533	14	37	0,241	0,332	FS	0,75
477	13	17	0,000	-0,003	U	0,55	534	14	38	0,094	-0,253	U	0,50
478	13	18	0,000	0,332	U	0,60	535	14	39	0,000	-0,086	U	0,50
479	13	19	0,000	-0,337	U	0,45	536	14	40	0,000	-0,293	U	0,50
480	13	20	0,000	-0,504	U	0,40	537	14	41	0,015	-0,337	U	0,55
481	13	21	0,000	-0,003	U	0,55	538	14	42	0,000	-0,086	U	0,60
482	13	22	0,000	-0,086	U	0,60	539	14	43	0,080	-0,179	U	0,63
483	13	23	0,046	0,164	U	0,65	540	14	44	0,000	-0,171	U	0,50
484	13	24	0,000	0,081	U	0,55	541	14	45	0,043	0,164	U	0,65
485	13	25	0,000	-0,003	U	0,55	542	14	46	0,000	-0,337	U	0,40
486	13	26	0,000	-0,253	U	0,45	543	14	47	0,000	-0,500	U	0,38
487	13	27	0,017	0,164	U	0,60	544	14	48	0,000	-0,170	U	0,55
488	13	28	0,416	0,415	PO	0,65	545	14	49	0,000	-0,170	U	0,55
489	13	29	0,184	0,332	HS	0,65	546	14	50	0,500	0,499	PO	0,70
490	13	30	0,000	-0,671	U	0,30	547	15	16	0,443	0,499	FS	0,80
491	13	31	0,500	0,499	PO	0,75	548	15	17	0,000	0,164	U	0,60
492	13	32	0,000	-0,081	U	0,50	549	15	18	0,356	0,499	HS	0,70
493	13	33	0,300	0,666	FS	0,80	550	15	19	0,000	-0,337	U	0,40
494	13	34	0,000	-0,003	U	0,60	551	15	20	0,035	-0,170	U	0,50
495	13	35	0,500	0,415	PO	0,70	552	15	21	0,000	0,248	U	0,55



553	15	22	0,333	0,332	FS	0,75	610	16	45	0,385	0,415	PO	0,70
554	15	23	0,000	0,164	U	0,65	611	16	46	0,108	-0,086	U	0,60
555	15	24	0,000	0,164	U	0,65	612	16	47	0,037	-0,179	U	0,56
556	15	25	0,226	0,164	HS	0,65	613	16	48	0,107	0,164	U	0,70
557	15	26	0,000	-0,337	U	0,50	614	16	49	0,089	0,081	U	0,60
558	15	27	0,099	0,248	U	0,65	615	16	50	0,000	-0,421	U	0,50
559	15	28	0,033	0,081	U	0,60	616	17	18	0,337	0,499	FS	0,80
560	15	29	0,000	-0,170	U	0,55	617	17	19	0,029	-0,170	U	0,55
561	15	30	0,000	-0,588	U	0,35	618	17	20	0,162	-0,003	U	0,60
562	15	31	0,000	0,332	U	0,60	619	17	21	0,000	-0,003	U	0,60
563	15	32	0,000	-0,261	U	0,44	620	17	22	0,122	0,332	HS	0,70
564	15	33	0,500	0,499	PO	0,70	621	17	23	0,235	-0,003	U	0,70
565	15	34	0,063	0,248	HS	0,65	622	17	24	0,092	-0,170	U	0,60
566	15	35	0,500	0,582	PO	0,75	623	17	25	0,000	-0,337	U	0,40
567	15	36	0,235	0,415	U	0,75	624	17	26	0,004	-0,086	U	0,55
568	15	37	0,500	0,582	PO	0,75	625	17	27	0,043	-0,003	U	0,60
569	15	38	0,000	0,081	U	0,55	626	17	28	0,000	-0,086	U	0,50
570	15	39	0,170	0,332	HS	0,70	627	17	29	0,000	-0,253	U	0,50
571	15	40	0,000	-0,552	U	0,44	628	17	30	0,097	-0,253	U	0,45
572	15	41	0,000	-0,170	U	0,55	629	17	31	0,000	-0,003	U	0,60
573	15	42	0,038	0,081	U	0,55	630	17	32	0,000	-0,081	U	0,50
574	15	43	0,086	0,250	U	0,69	631	17	33	0,128	0,164	U	0,65
575	15	44	0,500	0,550	PO	0,72	632	17	34	0,334	0,582	FS	0,80
576	15	45	0,295	0,582	PO	0,80	633	17	35	0,000	0,081	U	0,60
577	15	46	0,000	-0,421	U	0,50	634	17	36	0,041	0,248	U	0,70
578	15	47	0,078	0,143	U	0,63	635	17	37	0,449	0,415	FS	0,80
579	15	48	0,244	0,332	HS	0,75	636	17	38	0,138	-0,170	U	0,55
580	15	49	0,291	0,332	HS	0,70	637	17	39	0,000	-0,003	U	0,55
581	15	50	0,000	-0,086	U	0,60	638	17	40	0,000	-0,380	U	0,44
582	16	17	0,000	-0,003	U	0,55	639	17	41	0,000	-0,421	U	0,50
583	16	18	0,042	0,332	U	0,65	640	17	42	0,000	-0,170	U	0,55
584	16	19	0,026	-0,253	U	0,45	641	17	43	0,080	-0,179	U	0,63
585	16	20	0,000	-0,337	U	0,40	642	17	44	0,000	-0,171	U	0,50
586	16	21	0,087	0,248	HS	0,55	643	17	45	0,137	0,248	U	0,70
587	16	22	0,022	0,164	HS	0,65	644	17	46	0,000	-0,253	U	0,45
588	16	23	0,333	0,248	HS	0,70	645	17	47	0,000	-0,500	U	0,38
589	16	24	0,000	-0,003	U	0,60	646	17	48	0,000	-0,086	U	0,60
590	16	25	0,000	-0,253	U	0,50	647	17	49	0,000	-0,253	U	0,50
591	16	26	0,154	-0,086	U	0,60	648	17	50	0,500	0,415	PO	0,65
592	16	27	0,000	0,081	U	0,55	649	18	19	0,000	-0,086	U	0,60
593	16	28	0,000	-0,337	U	0,45	650	18	20	0,000	-0,421	U	0,45
594	16	29	0,035	-0,086	U	0,60	651	18	21	0,000	-0,003	U	0,55
595	16	30	0,000	-0,755	U	0,25	652	18	22	0,000	-0,003	U	0,55
596	16	31	0,500	0,499	PO	0,70	653	18	23	0,239	0,332	U	0,75
597	16	32	0,000	-0,351	U	0,39	654	18	24	0,349	0,248	U	0,75
598	16	33	0,500	0,499	PO	0,75	655	18	25	0,000	-0,170	U	0,50
599	16	34	0,000	0,081	U	0,55	656	18	26	0,116	0,164	HS	0,60
600	16	35	0,558	0,749	FS	0,85	657	18	27	0,224	0,415	HS	0,75
601	16	36	0,111	0,332	U	0,70	658	18	28	0,000	0,081	U	0,55
602	16	37	0,174	0,415	HS	0,70	659	18	29	0,000	0,164	U	0,65
603	16	38	0,000	0,081	U	0,60	660	18	30	0,000	-0,504	U	0,40
604	16	39	0,492	0,499	PO	0,70	661	18	31	0,355	0,499	HS	0,75
605	16	40	0,181	0,052	HS	0,61	662	18	32	0,000	0,010	U	0,50
606	16	41	0,000	-0,253	U	0,50	663	18	33	0,431	0,666	FS	0,80
607	16	42	0,436	0,332	PO	0,60	664	18	34	0,218	0,415	FS	0,75
608	16	43	0,070	0,143	U	0,63	665	18	35	0,213	0,248	U	0,70
609	16	44	0,000	0,100	U	0,56	666	18	36	0,500	0,582	PO	0,75



667	18	37	0,385	0,749	FS	0,85	724	20	33	0,000	-0,253	U	0,45
668	18	38	0,000	-0,003	U	0,55	725	20	34	0,299	0,332	FS	0,70
669	18	39	0,200	0,332	HS	0,60	726	20	35	0,000	-0,253	U	0,45
670	18	40	0,078	0,052	U	0,61	727	20	36	0,040	-0,086	U	0,55
671	18	41	0,101	0,081	U	0,65	728	20	37	0,000	-0,170	U	0,50
672	18	42	0,000	-0,003	U	0,60	729	20	38	0,000	-0,671	U	0,45
673	18	43	0,214	0,357	HS	0,75	730	20	39	0,038	-0,086	U	0,55
674	18	44	0,000	0,280	U	0,61	731	20	40	0,000	-0,897	U	0,28
675	18	45	0,250	0,582	PO	0,80	732	20	41	0,000	-1,089	U	0,25
676	18	46	0,000	-0,253	U	0,45	733	20	42	0,000	-0,170	U	0,45
677	18	47	0,000	0,036	U	0,50	734	20	43	0,000	-0,715	U	0,38
678	18	48	0,000	0,164	U	0,65	735	20	44	0,000	-0,531	U	0,44
679	18	49	0,171	0,248	HS	0,70	736	20	45	0,017	-0,504	U	0,50
680	18	50	0,500	0,582	PO	0,75	737	20	46	0,000	-0,671	U	0,40
681	19	20	0,218	0,081	FS	0,65	738	20	47	0,000	-0,500	U	0,44
682	19	21	0,130	-0,003	U	0,65	739	20	48	0,219	0,164	PO	0,65
683	19	22	0,047	-0,003	U	0,50	740	20	49	0,000	-0,504	U	0,40
684	19	23	0,187	0,248	PO	0,60	741	20	50	0,000	-0,755	U	0,35
685	19	24	0,086	0,164	U	0,65	742	21	22	0,182	0,248	U	0,65
686	19	25	0,000	-1,005	U	0,30	743	21	23	0,000	0,081	U	0,60
687	19	26	0,371	0,332	PO	0,65	744	21	24	0,000	0,248	U	0,60
688	19	27	0,065	-0,003	U	0,60	745	21	25	0,000	-0,003	U	0,55
689	19	28	0,000	-0,755	U	0,40	746	21	26	0,000	-0,253	U	0,50
690	19	29	0,128	-0,003	U	0,60	747	21	27	0,000	0,081	U	0,55
691	19	30	0,124	-0,086	HS	0,55	748	21	28	0,000	-0,086	U	0,60
692	19	31	0,093	-0,170	U	0,60	749	21	29	0,067	-0,003	HS	0,55
693	19	32	0,000	-0,621	U	0,44	750	21	30	0,000	-0,003	U	0,55
694	19	33	0,000	-0,170	U	0,55	751	21	31	0,092	0,332	U	0,70
695	19	34	0,058	-0,003	U	0,60	752	21	32	0,221	0,100	U	0,67
696	19	35	0,081	-0,337	U	0,50	753	21	33	0,000	-0,003	U	0,55
697	19	36	0,000	-0,170	U	0,50	754	21	34	0,114	0,248	U	0,65
698	19	37	0,000	-0,003	U	0,55	755	21	35	0,425	0,332	PO	0,60
699	19	38	0,000	-1,005	U	0,35	756	21	36	0,204	0,248	U	0,65
700	19	39	0,046	-0,003	U	0,50	757	21	37	0,000	0,081	U	0,60
701	19	40	0,138	-0,035	HS	0,56	758	21	38	0,000	-0,337	U	0,55
702	19	41	0,000	-0,671	U	0,40	759	21	39	0,000	0,164	U	0,60
703	19	42	0,138	-0,170	HS	0,55	760	21	40	0,000	-0,552	U	0,33
704	19	43	0,000	-0,286	U	0,50	761	21	41	0,000	-0,755	U	0,35
705	19	44	0,000	-0,351	U	0,44	762	21	42	0,100	0,081	HS	0,60
706	19	45	0,000	-0,170	U	0,50	763	21	43	0,000	-0,286	U	0,50
707	19	46	0,000	-1,089	U	0,30	764	21	44	0,000	-0,261	U	0,50
708	19	47	0,000	-0,714	U	0,38	765	21	45	0,000	-0,086	U	0,55
709	19	48	0,000	-0,003	U	0,55	766	21	46	0,151	-0,170	HS	0,55
710	19	49	0,092	0,081	HS	0,55	767	21	47	0,000	-0,072	U	0,56
711	19	50	0,168	-0,170	U	0,60	768	21	48	0,192	0,248	PO	0,65
712	20	21	0,500	0,582	PO	0,80	769	21	49	0,000	-0,086	U	0,45
713	20	22	0,306	0,332	FS	0,70	770	21	50	0,000	-0,421	U	0,45
714	20	23	0,000	-0,170	U	0,50	771	22	23	0,000	-0,170	U	0,60
715	20	24	0,134	0,164	HS	0,60	772	22	24	0,000	-0,003	U	0,60
716	20	25	0,000	-0,504	U	0,45	773	22	25	0,022	-0,337	U	0,50
717	20	26	0,024	-0,337	U	0,50	774	22	26	0,000	-0,170	U	0,50
718	20	27	0,093	-0,003	U	0,60	775	22	27	0,042	-0,003	U	0,60
719	20	28	0,053	-0,253	HS	0,55	776	22	28	0,000	-0,253	U	0,55
720	20	29	0,096	-0,170	HS	0,55	777	22	29	0,000	-0,170	U	0,55
721	20	30	0,382	0,499	PO	0,75	778	22	30	0,167	0,081	HS	0,60
722	20	31	0,000	-0,086	U	0,55	779	22	31	0,000	-0,086	U	0,55
723	20	32	0,003	-0,081	U	0,56	780	22	32	0,000	-0,351	U	0,50



781	22	33	0,000	0,164	U	0,65	838	24	37	0,058	0,332	U	0,70
782	22	34	0,285	0,582	FS	0,80	839	24	38	0,000	-0,504	U	0,45
783	22	35	0,000	0,081	U	0,60	840	24	39	0,500	0,332	PO	0,65
784	22	36	0,241	0,081	U	0,70	841	24	40	0,107	-0,121	U	0,56
785	22	37	0,082	0,248	U	0,70	842	24	41	0,000	-0,253	U	0,55
786	22	38	0,000	-0,337	U	0,50	843	24	42	0,000	-0,170	U	0,55
787	22	39	0,205	0,332	FS	0,70	844	24	43	0,000	-0,072	U	0,63
788	22	40	0,000	-0,638	U	0,39	845	24	44	0,000	0,010	U	0,56
789	22	41	0,000	-0,588	U	0,45	846	24	45	0,000	-0,170	U	0,55
790	22	42	0,164	0,081	HS	0,60	847	24	46	0,000	-0,755	U	0,35
791	22	43	0,000	-0,393	U	0,50	848	24	47	0,000	0,143	U	0,56
792	22	44	0,150	0,190	HS	0,67	849	24	48	0,327	0,499	FS	0,80
793	22	45	0,327	0,415	FS	0,75	850	24	49	0,000	-0,003	U	0,60
794	22	46	0,023	-0,170	U	0,50	851	24	50	0,000	-0,253	U	0,55
795	22	47	0,000	-0,286	U	0,56	852	25	26	0,000	-0,755	U	0,40
796	22	48	0,313	0,332	FS	0,75	853	25	27	0,000	-0,671	U	0,40
797	22	49	0,000	-0,337	U	0,45	854	25	28	0,552	0,499	FS	0,80
798	22	50	0,000	-0,421	U	0,45	855	25	29	0,000	-0,421	U	0,50
799	23	24	0,403	0,499	FS	0,80	856	25	30	0,000	-0,838	U	0,40
800	23	25	0,085	0,081	HS	0,55	857	25	31	0,000	-0,337	U	0,50
801	23	26	0,500	0,415	PO	0,70	858	25	32	0,500	0,460	PO	0,67
802	23	27	0,000	0,081	U	0,60	859	25	33	0,000	-0,337	U	0,40
803	23	28	0,000	-0,086	U	0,55	860	25	34	0,000	-0,671	U	0,40
804	23	29	0,500	0,248	PO	0,70	861	25	35	0,169	0,164	HS	0,65
805	23	30	0,000	-0,588	U	0,35	862	25	36	0,500	0,332	PO	0,65
806	23	31	0,000	0,164	U	0,70	863	25	37	0,000	-0,086	U	0,45
807	23	32	0,074	0,100	HS	0,56	864	25	38	0,049	-0,253	U	0,55
808	23	33	0,227	0,332	U	0,75	865	25	39	0,000	-0,421	U	0,50
809	23	34	0,048	-0,170	U	0,60	866	25	40	0,000	-1,156	U	0,22
810	23	35	0,500	0,332	PO	0,75	867	25	41	0,000	-0,755	U	0,35
811	23	36	0,415	0,415	FS	0,80	868	25	42	0,000	-0,838	U	0,35
812	23	37	0,342	0,415	FS	0,80	869	25	43	0,005	-0,179	U	0,56
813	23	38	0,000	-0,337	U	0,55	870	25	44	0,000	-0,441	U	0,44
814	23	39	0,043	0,164	U	0,65	871	25	45	0,036	-0,170	U	0,55
815	23	40	0,082	0,052	U	0,56	872	25	46	0,000	-0,421	U	0,35
816	23	41	0,000	-0,337	U	0,55	873	25	47	0,500	0,464	PO	0,69
817	23	42	0,000	-0,253	U	0,55	874	25	48	0,000	-0,253	U	0,50
818	23	43	0,264	0,357	HS	0,75	875	25	49	0,034	-0,337	U	0,50
819	23	44	0,000	-0,261	U	0,50	876	25	50	0,007	-0,337	U	0,50
820	23	45	0,000	0,081	U	0,65	877	26	27	0,168	0,164	HS	0,60
821	23	46	0,000	-0,504	U	0,45	878	26	28	0,000	-0,421	U	0,50
822	23	47	0,000	0,143	U	0,63	879	26	29	0,169	0,248	HS	0,65
823	23	48	0,064	0,164	U	0,70	880	26	30	0,000	-0,755	U	0,35
824	23	49	0,500	0,499	PO	0,70	881	26	31	0,000	-0,170	U	0,55
825	23	50	0,072	0,164	U	0,60	882	26	32	0,000	-0,621	U	0,33
826	24	25	0,130	-0,086	HS	0,55	883	26	33	0,000	0,081	U	0,55
827	24	26	0,128	0,164	HS	0,65	884	26	34	0,000	-0,253	U	0,45
828	24	27	0,105	0,332	HS	0,70	885	26	35	0,000	-0,170	U	0,55
829	24	28	0,000	-0,086	U	0,55	886	26	36	0,203	0,248	HS	0,65
830	24	29	0,500	0,499	PO	0,80	887	26	37	0,500	0,415	PO	0,65
831	24	30	0,140	-0,086	U	0,55	888	26	38	0,000	-0,588	U	0,50
832	24	31	0,000	0,248	U	0,70	889	26	39	0,173	0,332	HS	0,70
833	24	32	0,301	0,370	PO	0,61	890	26	40	0,169	0,224	PO	0,50
834	24	33	0,197	0,415	U	0,75	891	26	41	0,000	-0,337	U	0,45
835	24	34	0,226	0,164	U	0,70	892	26	42	0,000	-0,253	U	0,50
836	24	35	0,007	-0,086	U	0,65	893	26	43	0,000	-0,286	U	0,50
837	24	36	0,502	0,582	PO	0,80	894	26	44	0,000	-0,261	U	0,44



895	26	45	0,055	0,081	U	0,55	952	29	36	0,398	0,582	PO	0,80
896	26	46	0,000	-0,671	U	0,40	953	29	37	0,000	0,248	U	0,60
897	26	47	0,000	-0,714	U	0,44	954	29	38	0,000	-0,504	U	0,50
898	26	48	0,312	0,332	FS	0,70	955	29	39	0,015	0,164	U	0,60
899	26	49	0,008	-0,253	U	0,45	956	29	40	0,353	0,224	PO	0,67
900	26	50	0,088	-0,253	U	0,50	957	29	41	0,071	-0,253	U	0,55
901	27	28	0,000	-0,170	U	0,50	958	29	42	0,000	-0,504	U	0,45
902	27	29	0,036	-0,003	U	0,60	959	29	43	0,500	0,357	PO	0,69
903	27	30	0,000	-0,086	U	0,55	960	29	44	0,000	-0,081	U	0,50
904	27	31	0,462	0,582	PO	0,75	961	29	45	0,000	-0,253	U	0,50
905	27	32	0,000	-0,171	U	0,50	962	29	46	0,030	-0,253	U	0,50
906	27	33	0,500	0,582	PO	0,75	963	29	47	0,080	0,143	U	0,63
907	27	34	0,206	0,332	HS	0,70	964	29	48	0,380	0,666	FS	0,80
908	27	35	0,000	-0,170	U	0,50	965	29	49	0,000	-0,253	U	0,55
909	27	36	0,000	0,164	U	0,60	966	29	50	0,081	-0,170	U	0,60
910	27	37	0,432	0,666	PO	0,80	967	30	31	0,000	-0,170	U	0,50
911	27	38	0,000	-0,170	U	0,50	968	30	32	0,190	0,010	HS	0,61
912	27	39	0,000	0,081	U	0,55	969	30	33	0,000	-0,337	U	0,40
913	27	40	0,275	0,224	HS	0,72	970	30	34	0,159	0,248	HS	0,65
914	27	41	0,107	-0,003	U	0,60	971	30	35	0,000	-0,838	U	0,30
915	27	42	0,500	0,415	PO	0,70	972	30	36	0,000	-0,421	U	0,45
916	27	43	0,035	0,143	U	0,63	973	30	37	0,000	-0,421	U	0,35
917	27	44	0,134	0,190	U	0,67	974	30	38	0,026	-0,755	U	0,35
918	27	45	0,465	0,248	FS	0,75	975	30	39	0,068	-0,337	U	0,50
919	27	46	0,000	-0,671	U	0,35	976	30	40	0,000	-0,811	U	0,33
920	27	47	0,000	0,036	U	0,56	977	30	41	0,000	-1,089	U	0,25
921	27	48	0,120	0,332	HS	0,70	978	30	42	0,000	-0,421	U	0,40
922	27	49	0,000	-0,170	U	0,55	979	30	43	0,000	-0,822	U	0,31
923	27	50	0,000	-0,170	U	0,50	980	30	44	0,000	-0,711	U	0,39
924	28	29	0,066	-0,086	U	0,60	981	30	45	0,000	-0,588	U	0,40
925	28	30	0,144	-0,337	HS	0,50	982	30	46	0,050	-0,671	U	0,35
926	28	31	0,000	-0,003	U	0,60	983	30	47	0,032	-0,393	U	0,44
927	28	32	0,000	0,190	U	0,61	984	30	48	0,024	-0,421	U	0,45
928	28	33	0,000	0,081	U	0,55	985	30	49	0,000	-0,838	U	0,35
929	28	34	0,000	-0,337	U	0,50	986	30	50	0,000	-0,755	U	0,35
930	28	35	0,074	0,081	U	0,60	987	31	32	0,080	0,010	U	0,61
931	28	36	0,337	0,499	PO	0,75	988	31	33	0,284	0,666	FS	0,85
932	28	37	0,250	0,332	HS	0,60	989	31	34	0,219	0,415	HS	0,75
933	28	38	0,058	-0,086	U	0,60	990	31	35	0,334	0,415	FS	0,75
934	28	39	0,000	-0,337	U	0,55	991	31	36	0,000	0,332	U	0,70
935	28	40	0,000	-0,552	U	0,33	992	31	37	0,042	0,415	U	0,70
936	28	41	0,086	-0,421	U	0,50	993	31	38	0,089	0,164	U	0,70
937	28	42	0,000	-0,755	U	0,40	994	31	39	0,000	0,164	U	0,60
938	28	43	0,157	0,250	U	0,69	995	31	40	0,500	0,224	PO	0,67
939	28	44	0,000	-0,081	U	0,56	996	31	41	0,000	-0,337	U	0,50
940	28	45	0,031	-0,003	U	0,55	997	31	42	0,185	0,164	HS	0,65
941	28	46	0,000	-0,253	U	0,40	998	31	43	0,500	0,679	PO	0,81
942	28	47	0,468	0,679	FS	0,81	999	31	44	0,000	0,100	U	0,61
943	28	48	0,072	0,081	U	0,60	1000	31	45	0,000	0,164	U	0,60
944	28	49	0,000	-0,671	U	0,40	1001	31	46	0,000	-0,337	U	0,45
945	28	50	0,088	-0,170	U	0,55	1002	31	47	0,095	0,250	U	0,69
946	29	30	0,043	-0,504	U	0,50	1003	31	48	0,000	0,081	U	0,60
947	29	31	0,169	0,164	U	0,70	1004	31	49	0,007	0,081	U	0,60
948	29	32	0,000	-0,171	U	0,50	1005	31	50	0,000	-0,086	U	0,55
949	29	33	0,500	0,499	PO	0,75	1006	32	33	0,000	0,010	U	0,50
950	29	34	0,000	-0,086	U	0,60	1007	32	34	0,020	0,010	U	0,61
951	29	35	0,248	-0,170	U	0,65	1008	32	35	0,000	-0,171	U	0,50



1009	32	36	0,020	0,280	U	0,67	1066	35	45	0,212	0,332	HS	0,65
1010	32	37	0,000	0,010	U	0,50	1067	35	46	0,000	-0,337	U	0,50
1011	32	38	0,000	-0,621	U	0,39	1068	35	47	0,000	0,036	U	0,56
1012	32	39	0,129	-0,261	U	0,56	1069	35	48	0,000	0,081	U	0,65
1013	32	40	0,000	-0,490	U	0,38	1070	35	49	0,183	0,164	HS	0,65
1014	32	41	0,000	-0,531	U	0,39	1071	35	50	0,000	-0,337	U	0,55
1015	32	42	0,000	-0,441	U	0,50	1072	36	37	0,608	0,666	PO	0,80
1016	32	43	0,000	-0,286	U	0,50	1073	36	38	0,000	-0,170	U	0,55
1017	32	44	0,000	-0,621	U	0,44	1074	36	39	0,292	0,415	HS	0,75
1018	32	45	0,000	-0,531	U	0,39	1075	36	40	0,000	0,052	U	0,56
1019	32	46	0,045	-0,351	U	0,44	1076	36	41	0,122	-0,003	U	0,65
1020	32	47	0,000	0,143	U	0,50	1077	36	42	0,000	-0,170	U	0,55
1021	32	48	0,000	-0,261	U	0,44	1078	36	43	0,181	0,357	U	0,75
1022	32	49	0,000	-0,621	U	0,39	1079	36	44	0,000	0,100	U	0,61
1023	32	50	0,000	-0,171	U	0,50	1080	36	45	0,000	0,164	U	0,65
1024	33	34	0,268	0,415	FS	0,75	1081	36	46	0,000	-0,170	U	0,50
1025	33	35	0,114	0,248	U	0,70	1082	36	47	0,000	0,357	U	0,63
1026	33	36	0,371	0,582	HS	0,75	1083	36	48	0,349	0,582	PO	0,80
1027	33	37	0,415	0,749	FS	0,85	1084	36	49	0,000	-0,086	U	0,55
1028	33	38	0,028	-0,003	U	0,60	1085	36	50	0,101	0,164	U	0,65
1029	33	39	0,000	0,332	U	0,60	1086	37	38	0,000	-0,086	U	0,55
1030	33	40	0,503	0,396	PO	0,72	1087	37	39	0,114	0,415	U	0,65
1031	33	41	0,174	0,248	HS	0,65	1088	37	40	0,500	0,310	PO	0,67
1032	33	42	0,020	0,164	U	0,60	1089	37	41	0,227	0,332	HS	0,70
1033	33	43	0,362	0,679	PO	0,81	1090	37	42	0,158	0,248	HS	0,65
1034	33	44	0,282	0,460	HS	0,72	1091	37	43	0,285	0,357	U	0,75
1035	33	45	0,215	0,415	HS	0,70	1092	37	44	0,282	0,460	HS	0,72
1036	33	46	0,000	-0,086	U	0,55	1093	37	45	0,369	0,666	FS	0,85
1037	33	47	0,307	0,464	FS	0,75	1094	37	46	0,000	-0,170	U	0,50
1038	33	48	0,428	0,499	PO	0,75	1095	37	47	0,014	0,250	U	0,63
1039	33	49	0,000	0,081	U	0,60	1096	37	48	0,283	0,582	PO	0,80
1040	33	50	0,000	0,164	U	0,60	1097	37	49	0,000	-0,003	U	0,55
1041	34	35	0,000	-0,003	U	0,60	1098	37	50	0,310	0,332	HS	0,60
1042	34	36	0,246	0,164	U	0,70	1099	38	39	0,000	-0,170	U	0,55
1043	34	37	0,096	0,332	U	0,70	1100	38	40	0,067	-0,293	U	0,44
1044	34	38	0,000	-0,253	U	0,50	1101	38	41	0,113	-0,337	U	0,45
1045	34	39	0,143	0,248	HS	0,65	1102	38	42	0,042	-0,253	U	0,45
1046	34	40	0,000	-0,380	U	0,50	1103	38	43	0,088	0,036	U	0,63
1047	34	41	0,000	-0,504	U	0,50	1104	38	44	0,074	0,010	HS	0,56
1048	34	42	0,059	0,081	U	0,60	1105	38	45	0,048	0,081	U	0,60
1049	34	43	0,222	0,036	U	0,69	1106	38	46	0,452	0,164	PO	0,50
1050	34	44	0,171	0,190	HS	0,67	1107	38	47	0,191	0,036	HS	0,63
1051	34	45	0,058	0,164	U	0,65	1108	38	48	0,000	-0,421	U	0,50
1052	34	46	0,000	-0,421	U	0,40	1109	38	49	0,000	-0,337	U	0,45
1053	34	47	0,000	-0,393	U	0,44	1110	38	50	0,000	-0,504	U	0,40
1054	34	48	0,000	0,081	U	0,60	1111	39	40	0,000	-0,207	U	0,44
1055	34	49	0,000	-0,253	U	0,55	1112	39	41	0,000	-0,504	U	0,45
1056	34	50	0,000	-0,003	U	0,60	1113	39	42	0,000	-0,170	U	0,50
1057	35	36	0,288	0,415	HS	0,75	1114	39	43	0,000	-0,179	U	0,56
1058	35	37	0,000	0,332	U	0,65	1115	39	44	0,277	0,280	HS	0,72
1059	35	38	0,002	0,081	U	0,60	1116	39	45	0,373	0,415	HS	0,65
1060	35	39	0,500	0,415	PO	0,65	1117	39	46	0,017	-0,253	U	0,50
1061	35	40	0,000	-0,380	U	0,50	1118	39	47	0,000	-0,607	U	0,44
1062	35	41	0,000	-0,755	U	0,40	1119	39	48	0,500	0,499	PO	0,70
1063	35	42	0,072	-0,253	U	0,50	1120	39	49	0,015	-0,170	U	0,55
1064	35	43	0,500	0,571	PO	0,75	1121	39	50	0,000	-0,588	U	0,40
1065	35	44	0,000	0,190	U	0,56	1122	40	41	0,500	0,396	PO	0,67





1123	40	42	0,500	0,224	PO	0,61
1124	40	43	0,195	0,219	HS	0,64
1125	40	44	0,111	-0,118	HS	0,50
1126	40	45	0,000	-0,293	U	0,56
1127	40	46	0,065	-0,293	U	0,44
1128	40	47	0,000	-0,227	U	0,43
1129	40	48	0,040	-0,035	U	0,56
1130	40	49	0,105	-0,466	U	0,50
1131	40	50	0,000	-0,121	U	0,50
1132	41	42	0,288	0,248	FS	0,70
1133	41	43	0,026	-0,393	U	0,56
1134	41	44	0,184	0,100	HS	0,56
1135	41	45	0,000	-0,170	U	0,55
1136	41	46	0,051	-0,253	HS	0,40
1137	41	47	0,036	-0,072	U	0,50
1138	41	48	0,000	-0,086	U	0,55
1139	41	49	0,000	-0,671	U	0,45
1140	41	50	0,290	0,081	HS	0,65
1141	42	43	0,000	-0,608	U	0,44
1142	42	44	0,064	-0,081	HS	0,44
1143	42	45	0,000	-0,003	U	0,55
1144	42	46	0,059	-0,337	U	0,45
1145	42	47	0,000	-0,393	U	0,44
1146	42	48	0,000	-0,086	U	0,55
1147	42	49	0,000	-0,337	U	0,45
1148	42	50	0,000	-0,421	U	0,50
1149	43	44	0,000	0,143	U	0,63
1150	43	45	0,000	0,036	U	0,63
1151	43	46	0,000	-0,500	U	0,38
1152	43	47	0,500	0,471	PO	0,71
1153	43	48	0,000	-0,072	U	0,56
1154	43	49	0,230	0,250	HS	0,69
1155	43	50	0,074	0,250	U	0,69
1156	44	45	0,394	0,460	PO	0,72
1157	44	46	0,000	-0,441	U	0,39
1158	44	47	0,000	-0,179	U	0,56
1159	44	48	0,229	0,370	HS	0,67
1160	44	49	0,108	-0,081	HS	0,56
1161	44	50	0,000	-0,351	U	0,39
1162	45	46	0,000	-0,086	U	0,50
1163	45	47	0,041	-0,072	U	0,56
1164	45	48	0,049	0,248	U	0,70
1165	45	49	0,005	-0,003	U	0,60
1166	45	50	0,000	-0,003	U	0,55
1167	46	47	0,241	0,036	FS	0,56
1168	46	48	0,031	-0,253	U	0,55
1169	46	49	0,000	-0,922	U	0,35
1170	46	50	0,000	-0,504	U	0,45
1171	47	48	0,000	0,036	U	0,63
1172	47	49	0,000	-0,179	U	0,50
1173	47	50	0,000	-0,072	U	0,50
1174	48	49	0,000	-0,337	U	0,50
1175	48	50	0,000	-0,421	U	0,50
1176	49	50	0,210	0,081	U	0,65