



SANDRA ELOISA BÜLAU

VARIABILIDADE GENÉTICA E RELAÇÕES DE PARENTESCO EM *GUBERNATRIX CRISTATA*
(VIEILLOT, 1817) - (AVES, PASSERIFORMES, THRAUPIDAE) - MANTIDOS EM CATIVEIRO.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL, INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL À
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA ANIMAL.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

ORIENTADOR: THALES RENATO OCHOTORENA DE FREITAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE

2015

VARIABILIDADE GENÉTICA E RELAÇÕES DE PARENTESCO EM *GUBERNATRIX CRISTATA*
(VIEILLOT, 1817) - (AVES, PASSERIFORMES, THRAUPIDAE) - MANTIDOS EM CATIVEIRO.

SANDRA ELOISA BÜLAU

Aprovada em ____ de _____ de ____.

Avaliadora 1

Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky

Avaliadora 2

Dra. Gislene Lopes Gonçalves

Dr/a. Avaliador/a 3

Dr. Renato Caparroz

Agradecimentos

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho!

Agradeço aos meus pais, irmãos e arrendados por todo amor a mim devotado, pelo incentivo tanto emocional como financeiro! Sem a ajuda de todos vocês essa história não teria sido escrita!

Agradeço ao Jones, por todo carinho nesses longos anos. Por toda ajuda na realização não só deste trabalho, mas pelo caminho até chegar aqui! Muito obrigada mesmo!

Agradeço ao Claiton por ter me apresentado aos cardeais-amarelos. Também por toda força que me deu, tanto para a realização do trabalho como na vida pessoal. Muito obrigado mesmo, sabes que esse trabalho é também mérito teu!

Agradeço muito ao professor Thales por ter aceitado me orientar. Pela oportunidade de aprendizado e tantas boas histórias durante esse tempo de convivência!

Aos colegas de laboratório (em ordem alfabética) Bruna, Bruno, Carol Sartor, Carol, Daniel, Diego, Fabrício, Fernando, Gisele, Gislene, Graziela, Isadora, Jorge, Josmael, Leonardo, Mayara, Patrícia, Rafael, Renan e William pela companhia, conversas, e aprendizado! Cada um teve contribuição especial para mim!

Agradeço em especial a Gi pela enorme ajuda, pela revisão dos textos, pelo carinho e compreensão dentro e fora do lab. Muito obrigada por sua amizade! A Mayara por me ensinar e ajudar a lidar com os programas, muito obrigada!

Agradeço ao Luciano (Lúuu) por facilitar o trabalho no lab. e por auxiliar em tudo que esteve ao seu alcance, pelas brincadeiras e pela cruzadinha diária!

Agradeço a Lúcia por facilitar a vida nos livrando das mazelas burocráticas!

Agradeço enormemente a Patrícia Serrafini, por toda colaboração, pelo preparo e envio de tantos ofícios! E também por todo o esforço que põe nas ações de conservação do cardeal-amarelo, para que estas saiam do papel e se efetivem!

Agradeço ao Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira da FioCruz, pela parceria para a realização das genotipagens nas instalações do Centro de Pesquisas René Rachou!

Agradeço a Dra. Cristina Miyaki e a Dra. Camila Castilho pela ajuda nas análises de parentesco!

A todos os colegas e professores do curso pela vivência! Em especial aos colegas Diego, Tulasy, Camila Rosa, Camila, Leonardo, Geórgia, Felipe, Emília, Fabiana e Talita, pela convivência e colaboração durante as aulas!

Agradeço a todos os criadores amadoristas, que cederam amostras de seus animais (preciosos) para que essa pesquisa pudesse ser feita. E também pela receptividade de muitos, obrigada pelo café, conversas e caronas!

Agradeço ao CEMAVE/ICMBio por auxiliar e facilitar a realização desta pesquisa!

Agradeço a Superintendência do IBAMA de Porto Alegre, nas pessoas de Cibele Indrusiak e Kuriakin Toscan pela ajuda na parte burocrática para a identificação dos criadores!

Agradeço a coordenação e colaboradores do PPGBAN!

Agradeço a Capes pelo custeio recebido!

E enfim, mas não menos importante, meu agradecimento aos cardeais-amarelos! Ainda lembro com dor da primeira amostra que coletei. Espero que as ações que estão em desenvolvimento resultem em efetiva conservação desse passarinho que me encantou!

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	6
1. Introdução.....	7
1.1. O Cardeal-amarelo	7
1.2. Ameaças e ações para a conservação	10
1.3. Diversidade Genética e Conservação	13
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Capítulo I	17
3.1 Variabilidade Genética e Relações de Parentesco da População Cativa do Cardeal-amarelo - Gubernatrix cristata.....	18
Resumo	18
Introdução	18
Material e Métodos	21
Resultados	26
Discussão.....	31
Referências.....	36
4. Conclusão.....	41
5. Referências Bibliográficas	42
6. Anexos	50

Resumo

O Cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) é uma espécie de ave rara. Tem distribuição geográfica restrita ao Uruguai, Argentina e sul do Brasil, sendo exclusiva do Bioma Pampa. A espécie é ameaçada de extinção em nível global. As principais ameaças são a pressão de caça, a fragmentação e a destruição de seu hábitat. Este trabalho teve por objetivo identificar a variabilidade genética e estimar as relações de parentesco em uma amostra de cardeais-amarelos mantidos em cativeiro. Para isso foram utilizadas amostras de 190 animais, destas 168 foram coletados em criadores amadoristas, 12 foram coletadas a partir de indivíduos apreendidos e dez são provenientes do banco de amostras do Laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados. A variabilidade genética foi acessada através do uso de dez marcadores moleculares do tipo microssatélite, desenvolvidos para a espécie. Os níveis de diversidade foram avaliados pelas medidas de heterozigosidade esperada e observada, número e média de alelos por loco e pelo valor do conteúdo de informação polimórfica (PIC). As análises de parentesco foram realizadas no programa ML-Relate, onde foram estimados o grau de parentesco (estimativa r) e as prováveis relações entre os indivíduos. Todos os locos foram altamente informativos de acordo com os valores de PIC (média 0,68). O número de alelos variou de cinco a 16, com uma média de 8,7 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou entre 0,226 e 0,793 (média de $0,544 \pm 0,208$) e a heterozigosidade esperada variou entre 0,578 a 0,875 (média de $0,726 \pm 0,097$). As análises de parentesco indicaram a presença de um grau de parentesco variando entre 0 e 0,84. Os dados apresentados para 38 animais indicam que os pares formados por estes indivíduos apresentam em sua maioria (88,5%) um baixo grau de parentesco ($r = 0$) e 88,8% destes são classificados como não relacionados. O nível de diversidade genética encontrado indica que a população de cativeiro mantém uma alta diversidade quando comparada a população silvestre da espécie, ou a outras espécies de aves ameaçadas. Porém, apresenta desvios no número de heterozigotos e no equilíbrio de Hardy-Weinberg, provavelmente devido ao manejo dos cativeiros. Os resultados indicam a necessidade de manejo dos espécimes em cativeiro para evitar a erosão genética da população cativa.

1. Introdução

1.1. O Cardeal-amarelo

A espécie *Gubernatrix cristata*, popularmente conhecida como cardeal-amarelo, é um passeriforme endêmico do Sul da América do Sul. Único representante do gênero, está incluso na Família Thraupidae, a qual possui 92 gêneros, como por exemplo *Diuca* e *Paroaria* (Bencke 2001; Burns *et al.* 2014; CBRO 2011).

Os indivíduos adultos apresentam dicromatismo sexual. O macho é identificado pelo amarelo no peito, costas, sobrancelha e faixa malar, e pela coloração preta na crista, linha dos olhos e garganta. A fêmea possui faixa malar e sobrancelhas brancas e o peito é cinzento (Sick 1997). Alimentam-se no chão de sementes, folhas, frutos e insetos, geralmente aos pares ou em pequenos grupos. O casal defende o território durante o período reprodutivo (Collar *et al.* 1992; Ridgely e Tudor 1997; Sick 1997). A reprodução ocorre entre novembro e fevereiro. Geralmente ocorre a postura de dois a três ovos azuis esverdeados e manchados de preto, com período de incubação de 13 dias (Belton 1994; Domínguez *et al.* 2014).

O cardeal-amarelo é uma espécie rara, de distribuição restrita ao Bioma Pampa, onde sua distribuição cobre diferentes zonas fitogeográficas. Ocupa áreas abertas com árvores esparsas, bosques, incluindo os bosques de *Prosopis* sp., planícies, matagais e estepes arbustivas e depende desse ecossistema para sobreviver. Ocorre no extremo sul da América do Sul, no Rio Grande do Sul, na Serra do Sudeste e ao longo da fronteira com o Uruguai, na Argentina, desde o norte até o centro do país, e no Uruguai (Figura 1) (Collar *et al.* 1992; Ridgely e

Tudor 1997; Di Giacomo 2005; Pillar *et al.* 2009).

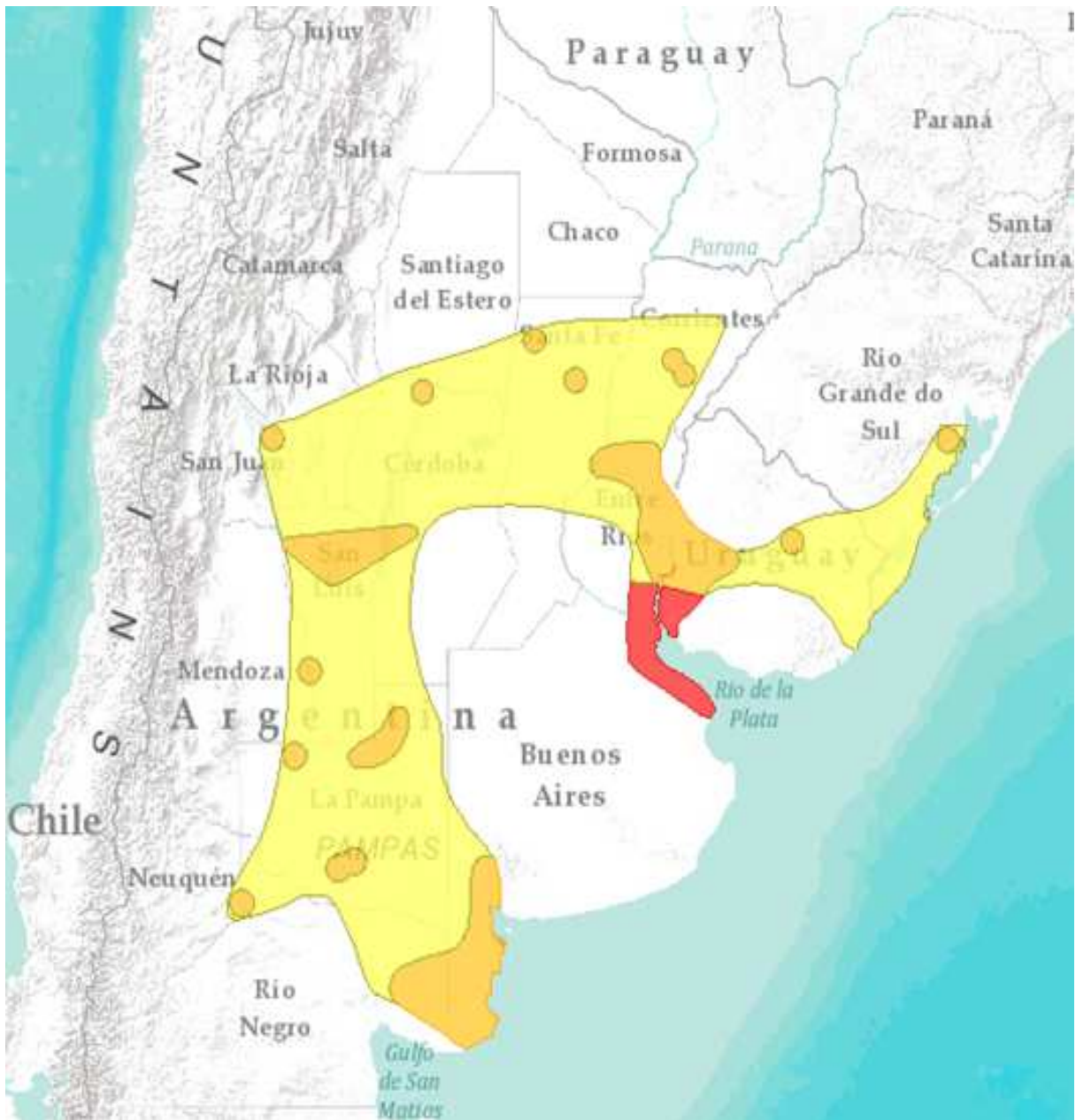


Figura 1: Figura com a distribuição de *Gubernatrix cristata*, com as possíveis áreas de ocorrência da espécie. Fonte: <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=22721578>.

No Rio Grande do Sul, a espécie é considerada rara desde os anos de 1970 e 1980 (Belton 1985). Há registros de captura de *Gubernatrix cristata* nos municípios de Piratini, Pinheiro Machado, Herval, Pedras Altas e Lavras do Sul. São raros os avistamentos da população da Serra do Sudeste, tanto no estado do Rio Grande do Sul como no Uruguai, indicando que ela possa estar isolada ou até mesmo extinta (Fontana *et al.* 2003; Martins-Ferreira 2007; Martins-Ferreira *et*

al. 2013). Há uma população conhecida no Rio Grande do Sul, a qual se encontra no Parque Estadual do Espinilho e arredores (Damiani *et al.* 2009). Há relatos recentes de avistamento de casal reproduzindo em Lavras do Sul e arredores, sugerindo que ainda existam indivíduos reproduzindo nessa vasta região (Martins-Ferreira *et al.* 2013)

No Uruguai, esta espécie é uma das aves mais ameaçadas. Os registros históricos de sua ocorrência geográfica abrangiam 13 departamentos, porém atualmente ocorre principalmente na região litorânea (BirdLife International 2000; Azpiroz 2003). Há registros atuais apenas para Paysandú, Río Negro, Florida, Rocha, Lavalleja e Artigas (BirdLife International 2000; Azpiroz 2003; Martins-Ferreira 2007; Ghione e Martino 2008; Lapitz 2010). Estima-se que a população atual em todo o Uruguai seja formada por 300 indivíduos. Recentemente, foi descoberta uma população importante nas Sierras del Este, com cerca de 50 indivíduos (A. Riccetto com. pess.; Azpiroz observ. pess in: Azpiroz *et al.* 2012).

Na Argentina, *G. cristata* é considerada ave rara dentro da maior parte de sua área de distribuição (Fraga 1997). As populações têm sofrido redução significativa em todo o norte de sua distribuição neste país. Entretanto, esta espécie é considerada localmente comum nas províncias que constituem o limite meridional de sua distribuição, principalmente na província de La Pampa (BirdLife International 1992; Collar *et al.* 1992). Há registros de ocorrência em Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Santa Fé, San Juan, Formosa, Chaco, La Roja, San Luis, Buenos Aires, Río Negro, Corrientes, Entre Ríos, Córdoba, La Pampa e Mendoza (Chebez 1996; Di Giacomo 2005; Ortiz 2008; Sosa *et al.* 2011).

1.2. Ameaças e ações para a conservação

O cardeal-amarelo está ameaçado de extinção e seu *status* de conservação é definido mundialmente como “em perigo” (BirdLife International 2013). Na Argentina, no Uruguai e no Rio Grande do Sul também é classificado como “em perigo” (Fontana *et al.* 2003; López-Lanús *et al.* 2008; Azpiroz *et al.* 2012) e na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção como “criticamente em perigo” (MMA 2003).

O canto melodioso e a beleza de suas cores faz com que o cardeal-amarelo seja muito apreciado como pássaro de estimação. Sua captura, realizada com o auxílio de um chamariz, é facilitada pelo comportamento agressivo do macho, principalmente na época reprodutiva. A retirada de espécimes da natureza para o mercado de aves de gaiola juntamente com a destruição e a fragmentação de seu habitat são as prováveis causas para a diminuição de suas populações naturais (Chebez 1994; Pessino e Titarelli 2006; BirdLife International 2013). Segundo Dominguez *et al.* (2014), também devem ser considerados como importantes ameaças à espécie, o parasitismo de seus ninhos por chupim (*Molothrus bonarienses*), o qual quebra os ovos dos cardeais-amarelos, ocasionando reduções significativas em seu sucesso reprodutivo e aumento na taxa de abandono dos ninhos pelos casais reprodutivos. E ainda, os autores consideram que o parasitismo dos filhotes por larvas de moscas do gênero *Philornis* sp., reduz a taxa de sobrevivência dos mesmos, pois os ninhos infestados com estas moscas são abandonados, ocasionando a sua morte.

Os registros de hibridização natural entre *Gubernatrix cristata* e *Diuca diuca*, na Argentina, documentados para as províncias de Buenos Aires, La

Pampa, San Luis e Río Negro, inserem uma ameaça potencial à sua conservação. Esses registros parecem ser consequência da redução significativa, em especial de machos, do cardeal-amarelo devido à captura ilegal (Bertonatti e Guerra 1997; Bertonatti e Guerra 2001; Pessino *et al.* 2002; Pessino 2006).

Um dramático declínio populacional vem sendo observado ao longo de toda a área de distribuição do cardeal-amarelo e as populações restantes são pequenas e isoladas (BirdLife International 2013). Os registros de ocorrência recentes da espécie vêm sendo obtidos em áreas de difícil acesso ou em locais protegidos (Di Giacomo 2005; Martins-Ferreira 2010). O declínio populacional associado à perda e à fragmentação do habitat pode levar à extinção local de uma espécie. Pequenas populações estão expostas a fatores associados a ação humana e a fatores estocásticos ambientais e genéticos (Gaines *et al.* 1997; Frankham *et al.* 2008).

Com o objetivo de proteger e recuperar espécies ameaçadas de extinção, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) desenvolveu o Plano de Ação Nacional para a conservação dos passeriformes ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho (PAN dos Campos Sulinos), que abrange a conservação do cardeal-amarelo e mais 21 espécies de Passeriformes. Esse Plano tem como objetivo melhorar o estado de conservação das espécies-alvo através da redução da perda, fragmentação e degradação do habitat, do aumento do conhecimento científico das espécies-alvo e atuando na implantação de medidas para impedir a captura ilegal das aves de interesse. Este Plano surgiu da junção de duas iniciativas de conservação, o plano de ação nacional específico para o cardeal-amarelo e o Plano de Ação Internacional, o qual conta com representantes da Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Uruguai, que busca a conservação das espécies migratórias sul-americanas e seus

habitats (Serafini 2013).

No ano de 2014, o ICMBio aprovou o Programa de Cativeiro do Cardeal-amarelo, através da Portaria nº 49, de 30 de Abril de 2014. Este programa contempla uma das finalidades do PAN dos Campos Sulinos: a definição de ações *ex-situ* para a conservação e recuperação das espécies envolvidas, referente a ação 2.3. O programa de Cativeiro tem por objetivo a fundação e manutenção de uma população em cativeiro com a melhor variabilidade genética possível; a produção, o aprimoramento e a divulgação sobre técnicas de manejo alimentar, reprodutivo e sanitário; e ainda a realização de experimentos de reintrodução da espécie na Serra do Sudeste (ICMBio 2014).

A criação e comercialização de passeriformes da fauna silvestre no Brasil são regulamentadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Segundo a Instrução Normativa nº 10/2011, o criador amador de passeriformes da fauna silvestre nativa é quem mantém indivíduos de espécies nativas em cativeiro sem fins comerciais, sendo permitida a reprodução das aves e a transferência entre criadores amadores. A venda de espécimes ou ovos é proibida (IBAMA 2011).

Em território gaúcho, a população de vida livre do cardeal-amarelo é estimada em 50 indivíduos (Serafini 2013). Contudo, esse número é muito inferior ao da população em cativeiro que é estimada em mais de 1.500 animais, segundo levantamento realizado no cadastro do programa de Gestão de Criadores de Passeriformes Silvestres durante essa pesquisa. Portanto, o estudo genético desta população cativa é fundamental para o delineamento do programa de reprodução em cativeiro do cardeal-amarelo.

1.3. Diversidade Genética e Conservação

A detecção da diversidade genética dos organismos pode ser alcançada através do uso de inúmeras técnicas moleculares. Essa diversidade é obtida em sequências ligeiramente diferentes nos genes, os alelos. A média do número de alelos por locos e a heterozigosidade são algumas das medidas que caracterizam a variabilidade genética dos indivíduos (Frankham *et al.* 2008).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados para a investigação da diversidade genética estão os microssatélites. Microssatélites são sequências de nucleotídeos moderadamente repetitivas encontradas ao longo do DNA, formadas por repetições em *tandem* com 1 a 6 pares de bases de comprimento. Formam conjuntos de 5 a centenas de repetições por locos e se encontram geralmente em regiões não codificantes do genoma. São marcadores codominantes herdados de acordo com a herança mendeliana (Tautz 1993; Ferreira e Grattapaglia 1995; Frankham *et al.* 2002).

A taxa de mutação dos microssatélites é alta. Um grande número de alelos são variações em tamanho de um único loco. Os principais mecanismos que dão origem às repetições em tandem são os deslizamentos (*slippage*) da DNA polimerase e o *crossing over* desigual, os quais criam constantes inserções ou deleções de sequências simples no genoma (Tautz e Renz 1984; Small *et al.* 1998; Avise 2004).

Nos microssatélites, as unidades de repetição (alelos) são altamente variáveis, o que lhes confere um elevado nível de polimorfismo. Devido à grande diversidade e o tamanho reduzido, os microssatélites são facilmente amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), através do uso de *primers*

específicos desenhados para as sequências flanqueadoras das repetições (Tautz 1989; Moore *et al.* 1991; Frankham *et al.* 2002; Avise 2004). A alta variabilidade por locus associada a grande quantidade de loci distribuídos pelo genoma dos organismos fazem dos microssatélites os marcadores mais utilizados em estudos de mapeamento genético, fluxo gênico, estrutura populacional e relações de parentesco, podendo inclusive determinar a identidade individual (Goldstein e Schlötterer 1999; Frankham *et al.* 2002; Rosel *et al.* 2005).

As análises de parentesco têm papel importante em estudos de diversidade ecológica, seleção sexual, padrões de dispersão e recrutamento, estimativa de parâmetros genéticos e na biologia da conservação (Jones *et al.* 2010). As estimativas de parentesco auxiliam programas de translocação entre populações naturais e no manejo em cativeiro, podendo ser usadas para evitar acasalamentos consanguíneos (Lacy 1994; Miyaki *et al.* 1997; Caparroz *et al.* 2001; Russello e Amato 2004; De Woody 2005). Quando há ausência de informações sobre a genealogia dos indivíduos, o uso de marcadores moleculares permite calcular o grau de parentesco entre os indivíduos envolvidos e também atribuir a paternidade e a maternidade da progênie (Blouin 2003; Jones e Ardren 2003).

Quando as amostras populacionais são incompletas, há dificuldade no uso das técnicas de parentesco no que concerne a confiança do teste. Com a finalidade de reduzir os problemas dos dados insuficientes, diferentes testes estatísticos e programas computacionais têm sido desenvolvidos para estudos de análises de parentesco, tanto em populações naturais como experimentais. Para o cálculo das relações de parentesco, os métodos se baseiam nas diferentes probabilidades com que dois indivíduos aparentados podem compartilhar alelos idênticos por descendência. Estes métodos permitem atribuir a paternidade aos

indivíduos testados através de comparações de seus genótipos (Jamieson e Taylor 1997; García *et al.* 2002; Jones e Ardren 2003; Blouin 2003; Jones *et al.* 2010).

Questões genéticas são enfatizadas no manejo de populações em cativeiro buscando a minimização do endocruzamento e da depressão endogâmica e a retenção da diversidade genética. Conhecer a diversidade e a estrutura genética é vital para a administração de populações cativas e fundamental para estratégias de manejo de metapopulações, incluindo a reintrodução de indivíduos reproduzidos em cativeiro em ambientes naturais (Urano *et al.* 2013).

Os planos de conservação para espécies em perigo podem incluir o manejo em sua área de ocorrência natural e a reprodução em cativeiro. A manutenção de espécimes em cativeiro pode servir como garantia contra a extinção na natureza, mantendo a diversidade genética existente e a viabilidade populacional, gerando um banco de material genético que sirva de suporte para ações de conservação *in situ* das espécies (Gaines *et al.* 1997; IUCN 2002; Frankham *et al.* 2008).

A diversidade genética origina e mantém o potencial evolutivo e a adaptação das espécies. Conhecer o nível e a maneira como essa diversidade está distribuída nas populações permite conhecer aspectos das histórias de vida desses organismos. Padrões de conectividade populacional, processos demográficos, padrões de dispersão, entre outros, estão envolvidos na estruturação genética das espécies e nem sempre são passíveis de identificação na natureza (Wright 1978; Friesen *et al.* 2007). A análise da variabilidade genética com o uso de marcadores moleculares pode ajudar a esclarecer tais padrões.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Nosso objetivo geral foi identificar a composição genética de espécimes de *Gubernatrix cristata* mantidos em cativeiro por criadores amadoristas do Estado do Rio Grande do Sul, com base em marcadores moleculares do tipo microssatélite.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar os níveis de diversidade genética da população amostrada;
- Estimar as relações de parentesco entre os indivíduos e
- Identificar, de acordo com as relações de parentesco, possíveis matrizes para o programa de reprodução em cativeiro do cardeal-amarelo.

3. Capítulo I

Variabilidade Genética e Relações de Parentesco da População Cativeira do
Cardeal-amarelo - *Gubernatrix cristata*

Sandra Eloisa Bülau^{1*}; Claiton Martins-Ferreira²; Thales R. O. de Freitas¹²

¹PPG Biologia Animal, Departamento de Zoologia/UFRGS, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil;

²PPG Genética e Biologia Molecular, Laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados, Departamento de Genética /UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. Correspondente : Sandra Eloisa Bülau, E-mail: sbulau@yahoo.com.br

A ser submetido para Conservation Genetics

3.1 Variabilidade Genética e Relações de Parentesco da População Cativa do Cardeal-amarelo - *Gubernatrix cristata*

Sandra Eloisa Bülau^{1*}; Claiton Martins-Ferreira²; Thales R. O. de Freitas¹²

¹PPG Biologia Animal, Departamento de Zoologia/UFRGS, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil;

²PPG Genética e Biologia Molecular, Laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados, Departamento de Genética /UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. Correspondente : Sandra Eloisa Bülau, E-mail: sbulau@yahoo.com.br

Resumo

O Cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*) é uma espécie de ave rara, exclusiva do Bioma Pampa. É ameaçada de extinção em nível global. As principais ameaças são a pressão de caça, a fragmentação e a destruição de seu hábitat. Neste trabalho foram utilizadas amostras de 190 animais a fim de identificar a variabilidade genética e estimar as relações de parentesco em cardeais-amarelos mantidos em cativeiro. A variabilidade genética foi acessada através de dez microssatélites desenvolvidos para a espécie. As análises de parentesco foram realizadas no programa ML-Relate, foram estimados o grau de parentesco (estimativa r) e prováveis relações entre os indivíduos. Todos os locos foram altamente informativos de acordo com o valor do conteúdo de informação polimórfica (média 0,68). O número de alelos variou de cinco a 16, com média de 8,7 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou entre 0,226 e 0,793 (média de $0,544 \pm 0,208$) e a heterozigosidade esperada variou entre 0,578 a 0,875 (média de $0,726 \pm 0,097$). O grau de parentesco variou entre 0 e 0,84. Os dados apresentados para 38 animais indicam um baixo grau de parentesco para 88,5% deles ($r = 0$) e que 88,8% destes são não relacionados. A diversidade genética encontrada indica que a população de cativeiro mantém alta variabilidade quando comparada a população silvestre da espécie, ou a outras espécies ameaçadas, porém apresenta desvios no número de heterozigotos e no equilíbrio de Hardy-Weinberg, provavelmente devido a falta de manejo genético, o que pode colocar em risco a conservação do cardeal-amarelo.

Palavras chave: Cardeal-amarelo - Diversidade genética - Cativeiro - Relações de parentesco - Espécie ameaçada

Introdução

O Cardeal-amarelo (*Gubernatrix cristata*), único representante do gênero *Gubernatrix*, é um passeriforme endêmico do Bioma Pampa e classificado na

categoria “Em Perigo” na lista de espécies ameaçadas de extinção em nível global. Sua população de vida livre é estimada em 1.500 a 3.000 indivíduos (BirdLife International 2013).

É considerada uma espécie rara com distribuição restrita. Ocorre no extremo sul da América do Sul, no Rio Grande do Sul na Serra do Sudeste e ao longo da fronteira com o Uruguai; na Argentina, desde o norte até o centro do país, e no Uruguai. Sua distribuição cobre diferentes zonas fitogeográficas. Ocupa áreas abertas com árvores esparsas, bosques, incluindo os bosques de *Prosopis* sp., planícies, matagais e estepes arbustivas e depende desse ecossistema para sobreviver (Collar *et al.* 1992; Ridgely e Tudor 1997; Di Giacomo 2005; Pillar *et al.* 2009).

Um dramático declínio populacional vem sendo observado ao longo de toda sua área de distribuição, e as populações restantes são pequenas e isoladas. Os registros recentes da espécie vêm sendo obtidos em áreas de difícil acesso ou preservadas (Fontana *et al.* 2003; Di Giacomo 2005; Martins-Ferreira 2010; BirdLife International 2013). A destruição e fragmentação de seu habitat e a captura para o comércio de aves de gaiola, são as prováveis causas para a diminuição de suas populações naturais (Chebez 1994; Pessino e Titarelli 2006; Ortiz 2008). Somam-se a essas ameaças, os crescentes registros de hibridização natural entre *G. cristata* e *Diuca diuca*, na Argentina (Bertonatti e Guerra 1997; Pessino 2006). E o parasitismo de seus ninhos, por chupim (*Molothrus bonarienses*), que aumenta a taxa de abandono dos ninhos, e por larvas de moscas do gênero *Philornis* sp., que ao infestarem os filhotes ocasionam o abandono dos mesmos pelos pais, provocando reduções significativas do sucesso reprodutivo da espécie (Domínguez *et al.* 2014).

Conhecer a diversidade genética e como ela está estruturada em uma

espécie é vital para a manejo de populações cativas (Wright 1978; Friesen *et al.* 2007; Urano *et al.* 2013). O estudo da variabilidade genética através de técnicas moleculares associado a análise de parentesco permite inferir a estrutura populacional, o nível de fluxo gênico, padrões de dispersão, de recrutamento e seleção sexual. E quando aplicados no manejo de populações ameaçadas podem evitar pareamentos consanguíneos, auxiliar a minimizar o endocruzamento e a depressão endogâmica, além de auxiliar programas reintrodução ou de translocação de entre populações naturais (Lande e Barrowclough 1987; Lacy 1994; Miyaki *et al.* 1997; Dewood 2005; Presti 2006; Jones *et al.* 2010).

A manutenção de espécimes em cativeiro pode servir como garantia contra a extinção na natureza. Esta ação *ex-situ* possibilita a manutenção da diversidade genética existente e a viabilidade populacional, gerando um banco de material genético que sirva de suporte para ações de conservação *in situ* das espécies (Gaines *et al.* 1997; IUCN 2002; Frankham *et al.* 2008).

Com o objetivo de proteger e recuperar espécies ameaçadas de extinção, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) desenvolveu o Plano de Ação Nacional para a conservação dos passeriformes ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho (PAN dos Campos Sulinos). Uma das ações prioritários deste PAN (ação 2.3) envolve a reprodução em cativeiro do cardeal-amarelo (Serafini 2013). O programa de reprodução em cativeiro foi aprovado pelo governo brasileiro através da Portaria nº 49, de 30 de Abril de 2014 e objetiva a fundação e manutenção de uma população em cativeiro com a maior variabilidade genética possível (ICMBio 2014). Embora seja um plano nacional brasileiro, houve também um grande envolvimento dos governos do Uruguai e da Argentina, e da comunidade científica desses países. Visando a

realização de algumas ações, fortalecendo o esforço internacional para a conservação da espécie (Serafini 2013).

No Rio Grande do Sul, a população de vida livre do cardeal-amarelo é estimada em 50 indivíduos (Serafini 2013). Esse número é muito inferior ao da população em cativeiro que é estimada em mais de 1.500 animais, número obtido no levantamento realizado no cadastro do programa de Gestão de Criadores de Passeriformes Silvestres (SISPASS) durante essa pesquisa. Em discussões durante a elaboração do programa de reprodução em cativeiro, surgiu a hipótese de usar esses animais de cativeiro para incrementar o plantel monitorado pelo programa. Levando isto em consideração, este trabalho buscou amostrar indivíduos de cardeal-amarelo em criadores amadoristas no estado do Rio Grande do Sul, para investigar a variabilidade genética desta importante população e estimar o nível de parentesco da mesma a fim de fomentar as ações do Programa de Reprodução em Cativeiro do Cardeal-amarelo.

Material e Métodos

Coleta das amostras e Genotipagem

Para contemplar os objetivos deste estudo foram analisadas amostras de 190 indivíduos (Anexo 1). Parte desta amostragem (12 amostras) foi coletada no Centro de Triagem de Animais Silvestres (Cetas) em Porto Alegre, provenientes de apreensões realizadas no estado pela Polícia Ambiental no ano de 2014. Outras dez amostras usadas são provenientes do banco de DNA do Laboratório de Citogenética e Evolução, as quais se originaram a partir de amostras enviadas

por criadores amadoristas para sexagem. As 168 amostras restantes foram coletadas em 18 municípios, entre dezembro de 2013 e agosto de 2014, do plantel de criadores amadoristas do estado do Rio Grande do Sul cadastrados SISPASS. As coletas de material biológico para este estudo foram realizadas com licença das autoridades ambientais brasileiras (IBAMA – SISBIO 40312-2).

Os procedimentos adotados durante a coleta seguiram as recomendações de manuseio presentes no Manual de Anilhamento de Aves Silvestres (IBAMA, 1994). A coleta de material biológico se deu através de sangue ou pena. Quando disponíveis, foram retiradas 3 a 4 penas de muda, e armazenadas em papel filtro. O sangue foi coletado na veia ulnar cutânea com o auxílio de uma seringa estéril e estocado em papel filtro ou FTA Cards (Whatman). Antes da coleta, o local era esterilizado com álcool 70%, e após a coleta o sangramento era estancando com auxílio de algodão, por alguns minutos. Foram anotadas as informações referentes ao número da anilha e data de nascimento do animal, e possíveis relações de parentesco. O material coletado e o DNA extraído foram depositados no banco de DNA do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A extração do DNA total foi realizada pelo método de CTAB conforme protocolo Doyle e Doyle (1987) com modificações. O DNA foi quantificado em espectrofotometro UV-visível (Nanodrop, Thermo System). Para as genotipagens, foram usadas alíquotas do DNA total com concentração igual a 10 ng/ul.

A variabilidade genética foi acessada usando dez pares de *primers* (*GcrisC02*; *GcrisC08*; *GcrisE02*; *GcrisG10*; *GcrisF02*; *GcrisF12*; *GcrisH06*; *GcrisH07*; *GcrisH09* e *GcrisH12*) desenvolvidos para a espécie por Martins-Ferreira *et al.* (2010). A amplificação destes *loci* foi feita através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As reações de PCR seguiram o protocolo

estabelecido no artigo de descrição dos *primers*. Os produtos de PCR foram verificados em gel de poliacrilamida e as genotipagens realizadas em sequenciador automático (3730 XL DNA Analyzer da Applied Biosystems) na empresa Macrogen e no Centro de Pesquisa Renné Rachou (Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde). O score dos alelos e genótipos foi conduzido no programa Peak Scanner v 1.0.

Análise dos dados

Para avaliar a presença de alelos nulos e possíveis erros de genotipagem foi utilizado o programa Micro-checker (Van Oosterhout *et al.* 2004), com um intervalo de confiança de 95% e 1.000 replicações. A diversidade genética foi avaliada segundo o número de alelos por loco e as estimativas de heterozigosidades esperada e observada. Tais parâmetros foram estimados com auxílio do programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). O coeficiente de endogamia, equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco e o desequilíbrio de ligação entre os locos foram estimados usando o método de simulação de Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) também no programa Arlequin 3.11. Os valores do nível de significância destes testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foram corrigidos pela correção de Bonferroni ($\alpha = 0,005$; $\alpha = 0,01$ respectivamente).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada loco foi estimada no programa Cervus 3.0 (Kalinowski *et al.* 2007), a partir dos genótipos e frequências alélicas. Marcadores com valor de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente

informativos, e com valores inferiores a 0,25 pouco informativos (Botstein *et al.* 1980).

Para avaliar as medidas de diversidade encontradas neste trabalho fizemos uma comparação entre os dados obtidos neste estudo, com os dados obtidos por Martins-Ferreira *et al.* (2010), que utilizou em suas análises um total de 72 amostras de indivíduos de vida livre, das quais 59 foram de amostras contemporâneas e 13 amostras provenientes de espécimes do *Museu de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia* da Argentina.

O método Bayesiano implementado no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) foi usado para inferir o número (K) de conjuntos gênicos, que podem ser traduzidos em populações. Ele infere o número de populações presentes em uma amostra buscando por *clusters* que maximizem os níveis de equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo cada população caracterizada por um conjunto distinto de frequências alélicas em cada loco. Foram realizadas cinco rodadas independentes para cada K, variando este de 1 a 10 com, 1.000.000 de iterações para MCMC e 500.000 iterações de *burn-in*. Nas análises foi utilizado o modelo que assume ancestralidade múltipla (*admixture model*) e o modelo de frequências alélicas independentes (Pritchard *et al.*, 2000). A partir dos logaritmos das probabilidades dos dados ($\ln P(D)$) obtidos com o programa Structure, foi estimado o melhor k com uma estatística *ad hoc* denominada DeltaK, que se baseia na taxa de mudança do logaritmo da probabilidade dos dados entre sucessivos valores de K (Evanno *et al.* 2005), usando o Structure Harvester (Earl e vonHoldt 2012). As replicas geradas durante as sucessivas corridas para cada K foram combinadas com Clumpp 1.1.2 (Jakobsson e Rosenberg 2007). Os gráficos de probabilidade de atribuição foram construídos no Distruct 1.1 (Rosenberg 2004).

Para estimar o grau de parentesco genético (estimativa r , Blouin 2003) entre os indivíduos foi utilizado o programa ML-Relate (Kalinowski *et al.* 2006). O coeficiente de parentesco estimado por este programa leva em consideração a frequência alélica da população para sugerir o valor de parentesco entre pares de indivíduos (ML r), e permite testar qual relação entre as quatro possíveis: não relacionado (NR), meio-irmão (MI), irmão completo (IC) e pais/filhos (PF), é a mais verossímil para cada par (Queller e Goodnight 1989). O programa ML-Relate foi escolhido porque possuímos pouca informação a respeito do parentesco entre os cardeais-amarelos amostrados. Nesse programa, ao contrário de outros largamente utilizados em análises de parentesco, não é necessário informar a proporção de parentes candidatos amostrados (Woltmann *et al.* 2012).

Nas análises de parentesco devem ser consideradas a ocorrência de dois tipos principais de erros. O erro Tipo I, quando os indivíduos não são relacionados mas as estimativas indicam a existência de relação, e o erro Tipo II, quando os indivíduos são relacionados mas as estimativas indicam que a relação não existe. Os erros do tipo I podem ser causados por presença de desequilíbrio de ligação nos marcadores utilizados. Já a presença de alelos nulos e scores errados podem levar a erros do tipo II (Christie 2010). Tentamos minimizar os erros do tipo II seguindo as recomendações de Kalinowski *et al.* (2006) e Wagner *et al.* (2006).

O índice ML r e as relações de parentesco foram estimados para as 190 amostras coletadas. Entretanto, neste trabalho, são discutidos apenas as relações de parentesco entre machos e fêmeas nascidos entre 2012 e 2014, pois consideramos estes como possíveis candidatos ao programa de reprodução em cativeiro. O número de animais nascidos nesse período foi 38 (26 machos e 12

fêmeas). Ao parearmos os 26 machos contra as 12 fêmeas obtivemos 312 possíveis pares. O índice obtido para os valores de parentesco (MLr) foi dividido em três categorias. Foram considerados: valor de parentesco baixo ($MLr < 0,25$), intermediário ($0,25 \geq MLr < 0,50$) e alto ($MLr \geq 0,50$) de acordo com os valores teóricos médios esperados (Russello e Amato 2004).

Resultados

Dentre os dez pares de primers utilizados para indentificar a variabilidade genética, o loco *GcrisG10* se mostrou monomórfico para esta população e por isso não foi usado nas análises. Oito dos nove locos apresentaram evidências de presença de alelos nulos (*GcrisC02*; *GcrisC08*; *GcrisE02*; *GcrisF02*; *GcrisF12*; *GcrisH06*; *GcrisH09* e *GcrisH12*) devido ao excesso de homozigotos (Anexo 2). Todos os pares apresentaram evidências de desequilíbrio de ligação (Anexo 3). O teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg indica um déficit de heterozigotos sendo que sete dos nove locos apresentaram desvios significativos. Os nove locos foram mantidos nas análises, porque quando testados para outra população por Martins-Ferreira et al. (2010) todos se apresentaram em equilíbrio de ligação, e também porque a amostra utilizada neste estudo é composta primariamente de animais reproduzidos e mantidos que eventualmente possam ser aparentados, em cativeiro o que pode levar a desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Todos os locos foram altamente informativos de acordo com os valores de PIC que variaram de 0,53 (*GcrisC02*) e 0,78 (*GcrisH07*) com valor médio de 0,68. O número de alelos por loco variou entre cinco (*GcrisE02*) e 16 (*GcrisF02*), com

um número médio de 8,7 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou entre 0,226 (*GcrisH12*) e 0,793 (*GcrisF02*) com uma média de 0,544 (desvio padrão \pm 0,208). A heterozigosidade esperada variou entre 0,578 (*GcrisC02*) a 0,875 (*GcrisF02*) com média de 0,726 (desvio padrão \pm 0,097). Estes resultados são apresentados e comparados com os obtidos por Martins-Ferreira *et al.* (2010) na Tabela 1.

O coeficiente médio de endogamia FIS 0,251 ($p < 0,001$) estimado para essa população indica um excesso de homozigotos.

Tabela 1. Comparação das estimativas de diversidade genética obtidas para a população deste estudo (população cativa) composta por 190 amostras e as encontradas por Martins-Ferreira *et al.* (2010) ao analisar 72 amostras.

Loco	População cativa				Dados de Martins-Ferreira et al. 2010			
	NA	Ho	He	PIC	NA	Ho	He	PIC
GcrisC02	8	0,368	0,578*	0,536	4	0,267	0,438*	0,373
GcrisC08	6	0,615	0,701	0,655	6	0,911	0,791	0,748
GcrisE02	5	0,489	0,616*	0,556	4	0,229	0,710*	0,648
GcrisF02	16	0,793	0,875	0,860	14	0,833	0,893	0,873
GcrisF12	6	0,308	0,680*	0,620	6	0,600	0,784*	0,734
GcrisH06	10	0,600	0,811*	0,783	10	0,735	0,830	0,799
GcrisH07	9	0,789	0,810*	0,784	6	0,739	0,755	0,709
GcrisH09	12	0,705	0,771*	0,731	10	0,702	0,834*	0,802
GcrisH12	7	0,226	0,693*	0,635	5	0,232	0,700	0,637
Médias	8,7	0,544	0,726	0,684	7,2	0,583	0,748	0,703

NA - número de alelos (), Ho - heterosigozidade observada (), He - heterozigosidade esperada e os valores do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC); * indicam locos que estão fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os resultados gerados pelo programa Structure, conforme apresentado na Figura 1, permitiram inferir a presença de três *clusters* ($K = 3$), de acordo com o maior valor de Delta K. A distribuição da variabilidade genética dos indivíduos conforme essa estrutura pode ser observada na Figura 2.

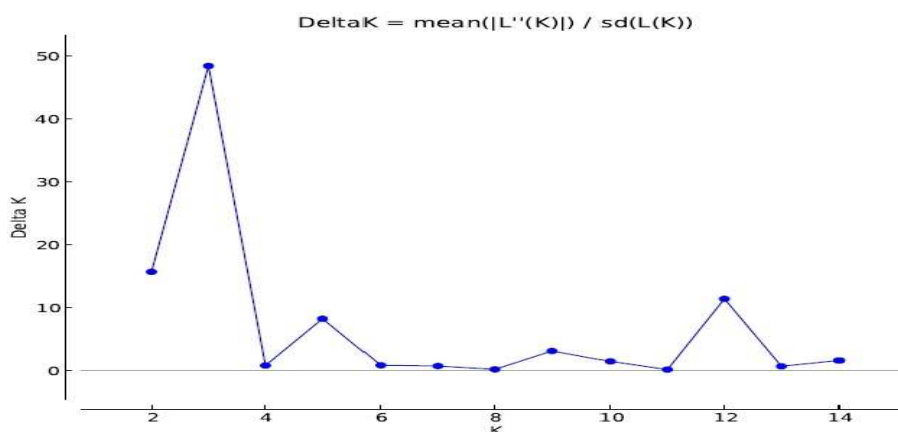


Figura 1. Estimativa do melhor K pela estatística Delta K inferida pelo programa Structure.

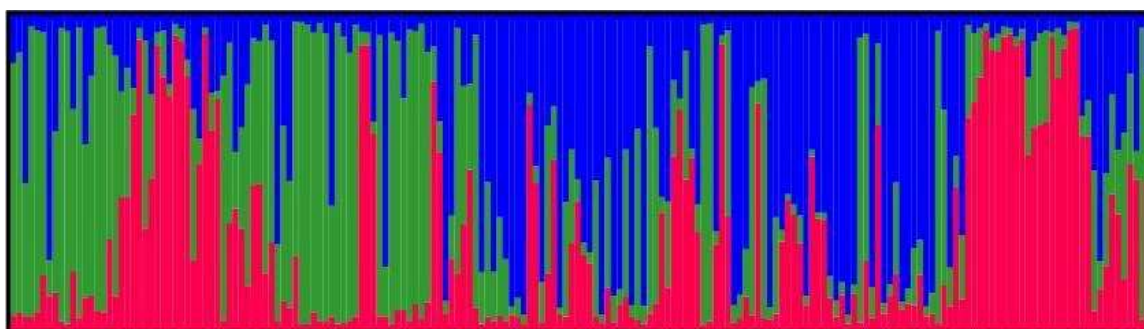


Figura 2. Distribuição da estrutura genética dos genótipos dos indivíduos avaliados neste estudo com o programa Structure para K=3.

O grau de parentesco (MLr) estimado para todas as amostras variou entre 0 e 0,85. Encontramos indivíduos fortemente relacionados. Este resultado era esperado, pois em alguns criadores, coletamos amostras de pais e filhotes. Esta relação também foi verificada na observação direta dos genótipos. Para facilitar a apresentação dos resultados das análises das relações de parentesco para os 312 pares testados, formados pelos 38 cardeais-amarelos nascidos entre 2012 e 2014, foi construída uma matriz pareando as fêmeas com os machos (Tabela 2). O valor máximo de grau de parentesco obtido para esses animais foi 0,55.

Os valores de parentesco (MLr) obtidos para os 312 pares testados indicam que 276 (88,5%) destes pares estão na categoria com valores de relação baixa e valor de parentesco baixo ($MLr < 0,25$). E ainda, destes últimos, 245 pares (88,8%) foram classificados como não relacionados (NR) e os 31 pares restantes foram classificados como meio-irmãos. Na categoria de valores

intermediários ($0,25 \geq MLr < 0,50$) foram encontrados 26 possíveis pares, destes cinco são classificados na relação pais/filhos (PF), quatro como irmãos completos (IC), dois como não relacionados (NR) e 15 como meio-irmãos (MI). Os 10 pares que estão na categoria de relação classificada como alta ($MLr \geq 0,50$), tiveram suas relações estimadas como PF para nove pares e como IC para um par. Portanto, os valores de parentesco indicam principalmente indivíduos não relacionados para a categoria de relação baixa; MI, IC e PF para a categoria de relações intermediárias e possíveis pais e filhos na categoria alta.

A fêmea PE14 não está relacionada a nenhum dos machos, e todos os valores de parentesco estimados estão na categoria baixa. Os machos NH03 e CA26 não estão relacionados a nenhuma fêmea e assim como PE14 todos os valores para MLr estão na categoria baixa.

Os pares formados por PE07 com CA01 e SM06; CA06 com CA09; CA16 com CA15 e SM06; CA21 com CA15; CA27 com CA07; SV02 com CA03; GU05 com CA11 e GU07 com GU06 apresentaram valores de parentesco na categoria alta ($MLr \geq 0,5$) e são relacionados como possíveis PF, com exceção do par CA16 com CA15 para o qual o programa estimou a relação IC. Enquanto que os pares formados por CA05 com GU06; CA08 com GU06; CA23 com CA15 e SM06 e o par CA25 com CA07, são relacionados como PF e apresentaram valores de parentesco na categoria intermediária.

Levando em consideração somente as relações de parentesco avaliadas, podemos indicar como interessantes para o programa de Reprodução em Cativeiro do Cardeal-amarelo as fêmeas PE14, SC03, CA11 e SM15 e os machos NH03, CA26, PE08, EV08, CA10, UR5, UR12 e UR15, devido à pouca relação que possuem com os outros animais testados podendo ser considerados como matrizes em potencial.

Tabela 2. Resultados para os pareamentos testados no programa ML Relate entre machos (M) versus fêmeas (F); de cardeal-amarelo nascidos entre 2012 e 2014.

		PE14		SC03		NH05		CA01		CA03		CA07		CA09		CA11		CA15		GU06		SM06		SM15	
		F		F		F		F		F		F		F		F		F		F		F		F	
		MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R	MLr	R
PE03	M	0	NR	0,39	IC	0,26	IC	0	NR	0	NR	0	NR	0,33	NR	0,13	NR	0	NR	0,21	NR	0,1	NR	0	NR
PE06	M	0	NR	0,18	MI	0,39	IC	0,15	MI	0,19	MI	0	NR	0	NR	0,11	NR	0	NR	0	NR	0,01	NR	0	NR
PE07	M	0	NR	0,12	NR	0,2	MI	0,5	PF	0,19	MI	0,15	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0,14	MI	0,5	PF	0,03	NR
PE08	M	0,19	NR	0	NR	0,01	NR	0,02	NR	0,06	NR	0	NR	0,16	MI	0,1	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR
EV01	M	0	NR	0	NR	0	NR	0,42	IC	0,31	MI	0	NR	0	NR	0,04	NR	0	NR	0	NR	0,12	NR	0	NR
EV02	M	0	NR	0,07	NR	0,01	NR	0,3	MI	0,15	NR	0,01	NR	0	NR	0,06	NR	0	NR	0	NR	0,17	MI	0	NR
EV08	M	0,04	NR	0,11	NR	0,17	MI	0	NR	0	NR	0,12	MI	0	NR	0	NR	0,11	NR	0	NR	0,03	NR	0	NR
EV09	M	0,09	NR	0	NR	0,25	MI	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0,16	MI	0	NR
EV13	M	0	NR	0,18	MI	0,19	MI	0,25	MI	0	NR	0,18	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR
NH03	M	0	NR	0	NR	0,16	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0,02	NR	0,08	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR
CA05	M	0,08	NR	0,09	NR	0	NR	0,26	MI	0,14	MI	0,22	MI	0,37	MI	0,22	MI	0	NR	0,43	PF	0,06	NR	0	NR
CA06	M	0	NR	0,24	MI	0	NR	0	NR	0	NR	0,3	MI	0,5	PF	0,09	NR	0	NR	0,18	MI	0	NR	0	NR
CA08	M	0,18	NR	0	NR	0,05	NR	0,15	MI	0	NR	0	NR	0,23	MI	0	NR	0,2	MI	0,39	PF	0,15	NR	0,36	MI
CA10	M	0	NR	0	NR	0	NR	0,15	MI	0,02	NR	0,02	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR
CA16	M	0	NR	0	NR	0,07	NR	0,04	NR	0,04	NR	0	NR	0,2	NR	0,09	NR	0,55	IC	0,15	MI	0,5	PF	0	NR
CA21	M	0	NR	0	NR	0,06	NR	0,04	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0,5	PF	0,08	NR	0,06	NR	0	NR
CA23	M	0,1	NR	0,09	NR	0,03	NR	0,02	NR	0,02	NR	0,3	MI	0	NR	0	NR	0,41	PF	0,08	NR	0,39	PF	0	NR
CA25	M	0	NR	0	NR	0,03	NR	0	NR	0,23	NR	0,46	PF	0,02	NR	0	NR	0	NR	0,17	MI	0,22	MI	0	NR
CA26	M	0	NR	0,15	NR	0	NR	0,1	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0,05	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR
CA27	M	0	NR	0,1	NR	0	NR	0,07	NR	0,03	NR	0,5	PF	0,3	MI	0,12	NR	0,08	NR	0	NR	0	NR	0	NR
SV02	M	0	NR	0	NR	0,04	NR	0,1	NR	0,5	PF	0,3	MI	0,07	NR	0,03	NR	0,09	NR	0	NR	0	NR	0	NR
GU05	M	0	NR	0	NR	0	NR	0,04	NR	0,07	NR	0,06	NR	0,16	NR	0,51	PF	0,25	MI	0,27	MI	0,12	NR	0	NR
GU07	M	0,05	NR	0,09	NR	0	NR	0,03	NR	0,13	NR	0,37	MI	0,32	MI	0	NR	0	NR	0,55	PF	0,2	MI	0,25	NR
UR05	M	0,04	NR	0,24	MI	0	NR	0,05	NR	0	NR	0,19	MI	0	NR	0,13	NR	0	NR	0,1	NR	0	NR	0	NR
UR12	M	0	NR	0,24	MI	0,03	NR	0	NR	0	NR	0,05	NR	0,02	NR	0,1	NR	0	NR	0	NR	0	NR	0	NR
UR15	M	0	NR	0,02	NR	0	NR	0,02	NR	0	NR	0	NR	0,22	MI	0,12	NR	0	NR	0,17	NR	0,18	MI	0,03	NR

MLr valor da relação de parentesco. Valores de MLr < 0,25 foram considerados baixo, valores ≥ 0,25 e < 0,50 intermediário e MLr ≥ 0,50 alto; R tipo de relação estimada: NR – não relacionado; MI – meio-irmão; IC – irmão completo e PF – pais/filhos.

Discussão

As amostras utilizadas nesse estudo são de animais reproduzidos e criados em cativeiro. Populações de cativeiro podem estar sujeitas a cruzamentos direcionados, a fim de fixar uma determinada característica. As informações coletadas durante este trabalho com os criadores amadores denotam que muitos buscam manter em seu plantel determinada cor ou tipo ou timbre de canto.

As análises realizadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para o coeficiente de endogamia indicam um excesso de homozigotos na população. Os cruzamentos direcionados e o endocruzamento podem levar a redução da frequência de heterozigotos e aumento dos homozigotos em relação às expectativas de Hardy-Weinberg, pois quebram a base que compõe seus princípios. O excesso de homozigotos também influencia os resultados para a presença de alelos nulos (Frankham *et al.* 2002). O cruzamento direcionado pode interferir no equilíbrio de ligação entre os locos gerando o desequilíbrio de ligação (Barton 2000),

Através da comparação das medidas de diversidade genética encontradas neste trabalho com as encontradas por Martins-Ferreira *et al.* (2010) podemos inferir que a população de cativeiro mantém uma diversidade muito semelhante à encontrada nas populações naturais de *G. Cristata*. Os locos que não apresentaram desvios neste estudo também não apresentaram desvios na população testada por Martins-Ferreira *et al.*(2010). Porém, um número maior de alelos foi observado na população cativa, o que pode ser resultado do tamanho amostral que nesse estudo foi superior.

Pelo fato de o cardeal-amarelo ser uma espécie ameaçada de extinção, era esperado que a diversidade genética encontrada seja baixa. Porém, o fato de uma espécie estar ameaçada nem sempre está associado à baixa variabilidade. Isso é evidenciado quando comparamos os dados obtidos neste trabalho com os obtidos por Martins-Ferreira *et al.* (2010). Em ambos os estudos, foi identificado um elevado número de alelos por loco e altos níveis de heterozigosidade quando comparados com outras espécies de aves ameaçadas (Zhang *et al.* 2004; Li *et al.* 2014; Kvist 2011; Presti *et al.* 2011; Chan *et al.* 2011, Davanço, 2012). Lawrence *et al.* (2008) ao estudarem os níveis de diversidade genética em uma espécie de ave marinha (*Pterodroma magentae*) criticamente ameaçada de extinção também encontraram uma alta diversidade nos genomas mitocondrial e nuclear em relação a outras aves proximalmente relacionadas e com graus de ameaças diversos.

Como apresentado nos resultados, animais com valores baixos de grau de parentesco (MLr) apresentaram relações esperadas em indivíduos com um nível maior de valor de parentesco, e alguns indivíduos com valores de MLr alto são tidos como não relacionados. Esse fato pode estar relacionado ao número de locos utilizados na análise, nesse caso nove, e também pelos desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg, presença de alelos nulos apresentados e desequilíbrio de ligação. Entretanto, o uso de locos com alelos nulos, com os devidos ajustes no cálculo para o valores de parentesco, permitem a obtenção de resultados robustos (Wagner *et al.* 2006).

Como é sugerido em diferentes estudos (Blouin *et al.* 1996; Alderson *et al.* 1999; Presti 2010), seria adequado ter um número maior de locos para aumentar a eficiência na determinação das relações de parentesco e para diminuir a variância dos índices. Presti (2010) verificou que ao dobrar o número de locos

(de sete para 14), nas análises de parentesco para a arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*), o intervalo de confiança para os valores estimados diminui consideravelmente. Para o camundongo *Mus musculus*, Blouin *et al.* (1996) afirmam que seria necessário o uso de 20 microssatélites para discriminar todos os indivíduos não-relacionados de irmãos, 80% dos indivíduos meio-irmãos de irmãos inteiros e 80% de indivíduos meio-irmãos de indivíduos não-relacionados. Resultados similares a esses foram obtidos por Alderson *et al.* (1999) ao testar as relações de parentesco para a ave *Molothrus ater*.

As relações e valores de parentesco serviram para estimar que os 312 pares com os valores apresentados, são em sua maioria não relacionados e tem baixo valor de *MLr*. Essas relações permitiram a indicação de quatro fêmeas e oito machos como possíveis matrizes para reprodução em cativeiro. Valores muito baixos de *MLr* indicam que esses animais avaliados não são relacionados, e também que podem carregar alelos novos (Kalinowski *et al.* 2006; Konovalov e Heg, 2008).

Ao longo da distribuição do cardeal-amarelo existem relatos e registros de exemplares capturados na natureza para serem mantidos em cativeiro (Fontana *et al.* 2003; Pessino e Titarelli, 2006). Os animais capturados na natureza poderiam estar introduzindo alelos novos, o que reduziria os valores das relações de parentesco com os outros indivíduos de cativeiro. Em espécies que apresentam populações geneticamente estruturadas é possível inferir a localidade provável onde esse animal foi capturado, como ocorre com a Arara-azul-grande (Presti 2010). Os resultados obtidos por Martins-Ferreira (2010) indicam a presença de uma única população, ao longo da distribuição de *G. cristata*, com pouca diferenciação populacional e fraca estruturação, o que não permite que sejam feitas inferências a respeito da procedência geográfica de um

determinado animal.

Os resultados gerados pelo Structure sugerem que a população de cativeiro tem uma estruturação genética bastante fraca, distribuindo os genótipos dos indivíduos avaliados em três *clusters* diferentes. Como as análises realizadas por Martins-Ferreira (2010) não cobriram a distribuição completa da espécie, não sabemos se a estruturação observada nesse estudo é resquício de uma estruturação populacional presente na população silvestre e que está sendo misturada pelos cruzamentos realizados em cativeiro, ou se ela seria resultado de uma diferenciação genética provocada pela reprodução em cativeiro. Também não nomeamos populações porque amostras do mesmo município estão representadas em clusters diferentes, o que demonstra a realização de trocas de animais entre os criadores, como comentado pelos mesmos durante a coleta de dados. Se levarmos em consideração o fato de que muitos espécimes são capturados na natureza, como mencionado acima, essa estruturação pode indicar que existem populações naturais ainda não amostradas. Portanto, a realização de coletas no ambiente natural que aumentem a cobertura da distribuição avaliada continua sendo importante para o entendimento da variabilidade genética da espécie como já apontado por Martins-Ferreira (2010).

A falta de manejo em cativeiro pode expor a população a diversos fatores de risco. Como parâmetro para a necessidade de manejo genético em populações cativas, podemos tomar como exemplo o mutum-de-alagoas (*Pauxi mitu*). A espécie existe hoje apenas em cativeiro, passou por um severo gargalo populacional, e análises de similaridade genética indicam que os indivíduos restantes são aparentados, sendo primos de primeiro grau, e que sofreram grande perda de variabilidade genética. Nessa espécie, a falta de manejo tem acentuado a perda de variabilidade genética, o que pode estar causando os

recentes registros de nascimento de animais com anomalias morfológicas (Davanço 2012). Como verificado para o mutum-de-alagoas, a falta de manejo no cativeiro pode trazer perdas de variabilidade genética, pois expõe a população aos efeitos da deriva genética, endocruzamentos e efeitos fundadores (Lande e Barrowclough 1987; Frankham et al. 2002). Portanto, para evitar que a população cativa do cardeal-amarelo sofra com a perda variabilidade genética e de heterozigose e, por consequência, sua capacidade de se adaptar às mudanças no ambiente natural, é essencial que se faça o manejo genético.

No Brasil existe um forte “lobby” político em favor da criação de aves silvestres em cativeiro. A bandeira levantada por esses criadores é que com a reprodução em cativeiro estariam contribuindo para a conservação das espécies. Isso também ficou claro nas conversas com os criadores contatados neste estudo, principalmente quando muitos se ofereceram para contribuir com o programa de reprodução em cativeiro do cardeal-amarelo. Porém, os resultados obtidos nesse trabalho contradizem este pensamento. Eles indicam que a criação em cativeiro, sem o devido controle e manejo genético, pode estar colocando em risco a conservação do cardeal-amarelo, principalmente no que tange às questões genéticas. A criação amadorista neste caso tem exposto a população a cruzamentos direcionados e a endogamia. A endogamia pode levar a deriva genética, tendo como consequência a perda de diversidade genética, a fixação de alelos dentro da população, a diversificação entre as populações replicadas e ainda a depressão endogâmica, onde ocorre um aumento no número de homozigotos para alelos recessivos deletérios provocando a redução no valor adaptativo e no sucesso reprodutivo (Frankham *et al.* 2002). Segundo dados obtidos por Martins-Ferreira (2010), a população natural do cardeal-amarelo apresenta um decréscimo de tamanho e sugerindo um gargalo de garrafa.

Portanto, a reprodução em cativeiro de aves silvestres por criadores amadores, onde os animais estão expostos a tantos fatores de risco, deve ser olhada com muita cautela, principalmente porque podem prejudicar as intenções do Programa de Reprodução em Cativeiro do Cardeal-amarelo na formação de uma população representativa da diversidade genética em cativeiro para promover o revigoramento populacional em áreas naturais ao “pôr em xeque” a conservação da espécie.

Referências

Alderson GW, Gibbs HL, Sealy SG (1999) Parentage and kinship studies in an obligate brood parasitic bird, the Brown-Headed Cowbird (*Molothrus ater*), using microsatellite DNA markers. *The Journal of Heredity* 90: 182-190

Barton NH (2000) Estimating multilocus linkage disequilibria. *Heredity* 84: 373-389

Bertonatti C, Guerra AL (1997) Hibridación entre Cardenal Amarillo (*Gubernatrix cristata*) y Diuca Común (*Diuca diuca minor*) en estado silvestre, en la Argentina. *El Hornero* 14 (04): 235-242

BirdLife International (2013) Species factsheet: *Gubernatrix cristata*. <http://www.birdlife.org>. Acesso em 20 de Abril de 2013

Blouin MS, Parsons M, Lacaille V, Lotz S (1996). Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401

Botstein D, White RL, Skolnick H (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* (32): 314-331

Chan C, Robertson HA, Saul EK, Nia LV, Luong VP, Kong X, Zhao Y, Chambers GK (2011) Genetic variation in the kakerori (*Pomarea dimidiata*), an endangered endemic BIRD successfully recovering in the Cook Islands. *Conservation Genetics* 12: 441-447

Chebez JC (1994). *Los que se van: especies Argentinas en peligro*. Albatros, Buenos Aires

Christie MR (2010) Parentage in natural populations: novel methods to detect parent-offspring pairs in large datasets. *Molecular Ecology Resources* 10: 115-128

Collar NJ, Gonzaga LP, Krabbe N, Madroño Nieto A, Naranjo LG, Parker III TA, Wege DC (1992) Threatened birds of the Americas: The I.C.B.P. / I.U.C.N. Red Data Book. Third edition, part 2. Smithsonian Inst. Press, ICBP, Cambridge

Davanço PV (2012) Utilização de *loci* de microssatélites para a identificação de híbridos e manejo genético de uma espécie de ave brasileira extinta na natureza: o mutum-de-alagoas, *Pauxi mitu* (aves, Cracidae). Dissertação, Universidade Federal de São Carlos

Dewood JA (2005) Molecular Approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: Practical applications for wild animal. *Journal of Wildlife Management* 69 (4): 1400-1418

Di Giacomo AS (2005) Áreas importantes para la conservación de las aves en Argentina: sitios prioritários para la conservación de la biodiversidad. *Temas de Naturaleza y Conservación* 5:1-514. Aves Argentinas/Asociación Ornitológica del Plata, Buenos Aires

Domínguez M, Reboreda JC, Mahler B (2014) Impact of shiny cowbird and botfly parasitism on the reproductive success of globally endangered yellow cardinal *Gubernatrix cristata*. *Bird Conservation Internacional/FirstView Articles*: 1-12

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9(1): 11-15

Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611–20

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

Fontana CS, Bencke GA, Reis RE (2003) Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS, Porto Alegre

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge

Friesen VL, Burg TM, Mccoy KD (2007) Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Molecular Ecology* 16: 1765-1785

Gaines MS, Diffendofer JE, Tamarin RH, Whittam TS (1997) The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88: 294-304

IBAMA (1994) Manual de Anilhamento de Aves Silvestres. 2º Ed. Brasília, DF: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. <http://www.icmbio.gov.br/cemave/downloads/finish/7-sna/13-manual-de-anilhamento-de-aves-silvestres.html>. Acesso em 05 de Novembro de 2014

ICMBIO (2014) Portaria nº 49 de 30 de Abril de 2014. Aprova o Programa de Cativeiro do Cardeal- amarelo, espécie ameaçada de extinção, estabelecendo seu objetivo, objetivos específicos e ações estratégicas para a conservação ex situ da espécie. *Resenha Diário Oficial da União*, sessão 1, 71

IUCN (2002) IUCN Technical Guidelines on the Management of Ex-situ populations for Conservation. <http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Rep-2002-017.pdf>. Acesso em 16 de Abril de 2013

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP : a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806

Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratterman NL (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10: 6-30

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6: 576-579

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1006

Konovalov DA, Heg D (2008) A maximum likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. *Molecular Ecology Resources* 8: 256-263

Kvist L, Giralt D, Valera F, Hoi H, Kristin A, Darchiashvili G, Lovaszi P (2014) Population decline is accompanied by loss of genetic diversity in the lesser grey shrike *Lanius minor*. *The International Journal of Avian Science* 153: 98-109

Lacy R (1994) Managing genetic diversity in captive populations of animals. In: Bowles M, Whelan JC *Restoration of Endangered Species: Conceptual Issues, Planning and Implementation*. Cambridge University Press, Cambridge

Land R, Barrowclough G (1987) Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In Soulé ME (Ed.) *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge

Lawrence HA, Taylor GA, Millar CD, Lambert DM (2008) High mitochondrial and nuclear genetic diversity in one of the world's most endangered seabirds, the

Chatham Island Taiko (*Pterodroma magentae*). *Conservation Genetics* 9: 1293-1301

Li S, Li B, Cheng C, Xiong Z, Liu Q, Lai J, Carey HV, Zhang Q, Zheng H, Wei S, Zhang H, Chang L, Liu S, Zhang S, Yu B, Zeng X, Hou Y, Nie W, Guo Y, Chen T, Han J, Wang J, Wang J, Chen C, Liu J, Stambrook PJ, Xu M, Zhang G, Gilbert MTP, Yang H, Jarvis ED, Yu J, Yan J (2014) Genomic signatures of near-extinction and rebirth of the crested ibis and other endangered bird species. *Genome Biology* 15: 557

Martins-Ferreira C (2010) Estrutura populacional, diversidade genética, área de distribuição e conservação do cardeal-amarelo – *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817) (Aves, Passeriformes, Emberezidae). Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Martins-Ferreira C, Santos MO, Haddrath O, Baker AJ, Freitas TRO (2010) Isolation and characterization of 10 microsatellite loci in the Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata*. *Molecular Ecology Resources* 10 (4): 751-754

Martins-Ferreira C, Repenning M, Damiani RV (2013) *Gubernatrix cristata*. In: Serafini PP (org) Plano de Ação Nacional para a conservação dos passeriformes ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho. Série Espécies Ameaçadas, 31. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, Brasília, pp 116-119

Miyaki CY, Perreira SL, Biasia I, Wajntal A (1997) DNA fingerprinting applied to parrot captive breeding program. *Ararajuba* 5 (2): 127-133

MMA (2003) Lista Nacional das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. Anexo à Instrução Normativa nº 3 do MMA, de 25/05/2003. Diário Oficial da União, 101, seção 1. Pp.88

Ortiz D (2008) Distribución Histórica y Actual del Cardenal Amarillo (*Gubernatrix cristata*) en el Litoral Fluvial Argentino. In: Aceñolaza FG (Ed.) Temas de la biodiversidad del litoral fluvial argentino III. INSUGEO, São Miguel de Tucumán, pp 121-126

Pessino ME (2006) Nuevo registro y descripción de híbridos entre cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*) y diuca común (*Diuca diuca*) en la provincia de La Pampa, Argentina. *Nuestras Aves* 52: 16-18

Pessino ME, Titarelli F (2006) Cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*): Diagnóstico de su situación con respecto al comercio ilegal en la Provincia de La Pampa, Argentina. *Gestión Ambiental* 12: 69-76

Pillar VP, Müller SC, Castilhos ZMS, Jacques AVA (2009) Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade. MMA, Brasília

Presti FT (2006) Caracterização da variabilidade genética em espécies de psitacídeos ameaçados. Dissertação, Universidade de São Paulo

Presti FT (2010) Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial. Tese, Universidade de São Paulo

Presti FT, Oliveira-Marques AR, Caparroz R, Biondo C, Miyaki CY (2011) Comparative analysis of microsatellite variability of five macaw species (Psittaciformes, Psittacidae): application for conservation. *Genetics and Molecular Biology* 34: 348-352

Pritchard JK, Matthew S, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959

Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275

Ridgely RS, Tudor G (1997) The birds of South America. Volume I, The Oscine Passerines. University of Texas Press, Austin

Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138

Russello MA, Amato G (2004) Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology* 13(9): 2829-2840

Serafini PP (2013) Plano de Ação Nacional para a conservação dos passeriformes ameaçados dos campos sulinos e espinilho. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBIO, Brasília

Urano K, Tsubono K, Taniguchi Y, Matsuda H, Yamada T, Sigiyama T, Homma K, Kaneko Y, Yamagishi S, Iwaisaki H (2013) Genetic Diversity and Structure in the sado captive population of the japanese crested ibis. *Zoological Science* 30: 432-438

VanOosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538

Wagner AP, Creel S, Kalinowski ST (2006) Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity* 97: 336-345

Woltmann S, Sherry TW, Kreiser BR (2012) A genetic approach to estimating natal dispersal distances and self-recruitment in resident rainforest bird. *Journal of Avian Biology* 43: 33-42

Wright S (1978) *Evolution and Genetics of Populations* vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago

Zhang B, Fang S, Xi Y (2004) Low genetic diversity in the Endangered Crested Ibis *Nipponia nippon* and implications for conservation. *Bird Conservation International* 14: 183-190

4. Conclusão

Os resultados obtidos pela análise de microssatélites para *Gubernatrix cristata* permitem concluir que:

Os níveis de diversidade genética encontrados na população de cativeiro podem ser considerados altos em comparação com a diversidade encontrada em outras espécies de aves ameaçadas.

Os espécimes mantidos em cativeiro retêm uma diversidade genética comparável àquela da população silvestre.

As análises estatísticas revelam que para os locos testados existe um excesso de homozigotos. Esse excesso de homozigotos pode ser atribuído ao endocruzamento e cruzamento direcionado a que estão sujeitos os indivíduos mantidos em cativeiro.

Devido ao elevado coeficiente de endogamia encontrado, é essencial que se adotem medidas de manejo para a população cativa a fim de evitar a perda da diversidade genética.

Alguns indivíduos encontrados nos criadouros amadoristas poderiam ser considerados, de acordo com as análises de parentesco, possíveis matrizes para o programa de reprodução em cativeiro.

E, finalmente, que é necessário o aumento do número de marcadores para esta espécie para que as análises de parentesco sejam mais robustas, pois as informações quanto a variabilidade genética e parentesco são essenciais para o manejo de uma população cativa como a do cardeal-amarelo.

5. Referências Bibliográficas

(De acordo com as normas do periódico Conservation Genetics, Anexo 4)

Alderson GW, Gibbs HL, Sealy SG (1999) Parentage and kinship studies in an obligate brood parasitic bird, the Brown-Headed Cowbird (*Molothrus ater*), using microsatellite DNA markers. The Journal of Heredity 90: 182-190

Avise JC (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc

Azpiroz AB (2003) Aves Del Uruguay: Lista e introducción a su biología y conservación. Montevideo, Aves Uruguay-GUPECA

Azpiroz AB, Alfaro M, Jiménez S (2012) Lista Roja de las Aves del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la avifauna nacional con base en los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo. [https://cmsdata.iucn.org/%20downloads/lravesuruguay 2012.pdf](https://cmsdata.iucn.org/%20downloads/lravesuruguay%202012.pdf). Acesso em 26 de Abril de 2013

Barton NH (2000) Estimating multilocus linkage disequilibria. Heredity 84: 373-389

Belton W (1985) Birds of Rio Grande do Sul, Brazil. Part 2: Formicariidae through Corvidae. Bulletin of the American Museum of Natural History 180 (1): 1-242.

Belton W (1994) Aves do Rio Grande do Sul: distribuição e biologia. Editora Unisinos, São Leopoldo

BENCKE, G. A. 2001. Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

Bertonatti C, Guerra AL (1997) Hibridación entre Cardenal Amarillo (*Gubernatrix cristata*) y Diuca Común (*Diuca diuca minor*) en estado silvestre, en la Argentina. El Hornero 14 (04): 235-242.

Bertonatti C, Guerra AL (2001) Nuevos registros de híbridos entre cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*) y diuca común (*Diuca diuca minor*). Nuestras Aves 41: 27.

BirdLife International (1992) Aves Amenazadas de las Américas (Libro rojo IUCN) Cambridge, UK: BirdLife International. *Gubernatrix cristata* EN - cardenal amarillo, pepitero de pico grueso, havia tyvyta, pychore, cardeal-amarelo. http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/Species/AmRDBPDFs/Gubernatrix_cristata_spa.pdf. Acesso em 23 de Abril de 2013.

BirdLife International (2000) Threatened birds of the world. Lynx Edicions and BirdLife International, Barcelona and Cambridge

BirdLife International (2013) Species factsheet: *Gubernatrix cristata*. <http://www.birdlife.org>. Acesso em 20 de Abril de 2013

Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution* 18 (10): 503-511

Blouin MS, Parsons M, Lacaille V, Lotz S (1996) Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393-401

Botstein D, White RL, Skolnick H (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32 (3): 314-331

Burns KJ, Racicot RA (2009) Molecular phylogenetics of a clade of lowland Tanagers: Implications for avian participation in the Great American Interchange. *The Auk* 126 (3): 635-648

Burns KJ, Shultz AJ, Title PO, Mason NA, Barker FK, Klicka J, Lanyon SM, Lovette IJ (2014) Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75: 41-77

Caparroz R, Miyaki CY, Bampi MI, Wajntal A (2001) Analysis of the genetic variability in a sample of the remaining group of Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*, Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. *Biological Conservation* 99: 307-311

CBRO, Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011) Listas das aves do Brasil. 10ª Edição. <http://www.cbro.org.br>. Acesso em: 12 de Abril de 2013

Chan C, Robertson HA, Saul EK, Nia LV, Luong VP, Kong X, Zhao Y, Chambers GK (2011) Genetic variation in the kakerori (*Pomarea dimidiata*), an endangered endemic BIRD successfully recovering in the Cook Islands. *Conservation Genetics* 12: 441-447

Chebez JC (1994) Los que se van: especies Argentinas en peligro. Albatros, Buenos Aires

Chebez JC (1996) Campos misioneros: algo más que el confín de la selva. *Nuestras Aves* 34: 4-16

Christie, M.R.; 2010. Parentage in natural populations: novel methods to detect parent-offspring pairs in large datasets. *Molecular Ecology Resources* 10: 115-128

Collar NJ, Gonzaga LP, Krabbe N, Madroño Nieto A, Naranjo LG, Parker III TA, Wege DC (1992) Threatened birds of the Americas: The I.C.B.P. / I.U.C.N. Red Data Book. Third edition, part 2. Smithsonian Inst. Press, ICBP, Cambridge

Damiani RV, Ribeiro AC, Martins-Ferreira C (2009) Projeto Cardeal-Amarelo, resultados preliminares do monitoramento de *Gubernatrix cristata* no Parque Estadual do Espinilho – RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ORNITOLOGIA, XVII, 2009, Aracruz. Biogeografia das aves da Mata Atlântica. TEC ART,

Aracruz/ES

Davanço PV (2012) Utilização de *loci* de microssatélites para a identificação de híbridos e manejo genético de uma espécie de ave brasileira extinta na natureza: o mutum-de-alagoas, *Pauxi mitu* (aves, Cracidae). Dissertação, Universidade Federal de São Carlos

Dewood JA (2005) Molecular Approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: Practical applications for wild animal. *Journal of Wildlife Management* 69 (4): 1400-1418

Di Giacomo AS (2005) Áreas importantes para la conservación de las aves en Argentina: sítios prioritários para la conservación de la biodiversidad. *Temas de Naturaleza y Conservación* 5:1-514. Aves Argentinas/Asociación Ornitológica del Plata, Buenos Aires

Domínguez M, Reboreda JC, Mahler B (2014) Impact of shiny cowbird and botfly parasitism on the reproductive success of globally endangered yellow cardinal *Gubernatrix cristata*. *Bird Conservation International/FirstView Articles*: 1-12

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9(1): 11-15

Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2): 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611–20

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

Ferreira ME, Grattapaglia D (1995) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília

Fontana CS, Bencke GA, Reis RE (2003) Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS, Porto Alegre

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) *Fundamentos de Genética da Conservação*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto

Fraga RM (1997) Sección Aves. *In*: Garcia-Fernandez JJ, Ojeda RA, Fraga RM, Díaz GB, Baigún RJ (Ed.). *Libro rojo de mamíferos y aves amenazadas de La Argentina*. FUCEMA, Buenos Aires

Friesen VL, Burg TM, Mccoy KD (2007) Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Molecular Ecology* 16: 1765-1785

Gaines MS, Diffendofer JE, Tamarin RH, Whittam TS (1997) The effects of habitat fragmentation on the genetic structure of small mammal populations. *Journal of Heredity* 88: 294-304

García D, Carleos C, Parra D, Cñón J (2002) Sib-parentage testing using molecular markers when parents are unknown. *Animal Genetics* 33: 364-371

Ghione S, Martino D (2008) Biodiversidad. In: GEO URUGUAY. Informe del estado del ambiente. PNUMA-CLAESDINAMA, Montevideo, pp 178-239

Goldstein DB, Schlötterer C (Ed) (1999) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York

IBAMA (1994) Manual de Anilhamento de Aves Silvestres. 2º Ed. Brasília, DF: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. <http://www.icmbio.gov.br/cemave/downloads/finish/7-sna/13-manual-de-anilhamento-de-aves-silvestres.html>. Acesso em 05 de Novembro de 2014

IBAMA (2011) Instrução Normativa Nº 10, de 20/09/2011. Criação Amadora e Comercial de Passeriformes Nativos. Diário Oficial da União, Brasília

ICMBIO (2014) Portaria nº 49 de 30 de Abril de 2014. Aprova o Programa de Cativeiro do Cardeal- amarelo, espécie ameaçada de extinção, estabelecendo seu objetivo, objetivos específicos e ações estratégicas para a conservação ex situ da espécie. Resenha Diário Oficial da União, sessão 1, 71

IUCN (2002) IUCN Technical Guidelines on the Management of Ex-situ populations for Conservation. <http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/Rep-2002-017.pdf>. Acesso em 16 de Abril de 2013

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP : a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806

Jamieson A, Taylor St.CS (1997) Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400

Jones AG, Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12 (10): 2511-2523

Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratterman NL (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10: 6-30

Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6: 576-579

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program

CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1006

Konovalov DA, Heg D (2008) A maximum likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. *Molecular Ecology Resources* 8: 256-263

Kvist L, Giralt D, Valera F, Hoi H, Kristin A, Darchiashvili G, Lovaszi P (2014) Population decline is accompanied by loss of genetic diversity in the lesser grey shrike *Lanius minor*. *The International Journal of Avian Science* 153: 98-109

Lacy R (1994) Managing genetic diversity in captive populations of animals. In: Bowles M, Whelan JC *Restoration of Endangered Species: Conceptual Issues, Planning and Implementation*. Cambridge University Press, Cambridge

Land R, Barrowclough G (1987) Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In Soulé ME (Ed.) *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge

Lapitz F (2010) Cardenal Amarillo – *Gubernatrix cristata*. *Achará Digital* 1 (1): 8

Lawrence HA, Taylor GA, Millar CD, Lambert DM (2008) High mitochondrial and nuclear genetic diversity in one of the world's most endangered seabirds, the Chatham Island Taiko (*Pterodroma magentae*). *Conservation Genetics* 9: 1293-1301

Li S, Li B, Cheng C, Xiong Z, Liu Q, Lai J, Carey HV, Zhang Q, Zheng H, Wei S, Zhang H, Chang L, Liu S, Zhang S, Yu B, Zeng X, Hou Y, Nie W, Guo Y, Chen T, Han J, Wang J, Wang J, Chen C, Liu J, Stambrook PJ, Xu M, Zhang G, Gilbert MTP, Yang H, Jarvis ED, Yu J, Yan J (2014) Genomic signatures of near-extinction and rebirth of the crested ibis and other endangered bird species. *Genome Biology* 15 (12): 557

López-Lanús B, Grilli P, Coconier E, Di Giacomo A, Banchs R (2008) Categorización de las aves de la Argentina según su estado de conservación. Informe de Aves Argentinas /AOP y Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires

Martins-Ferreira C (2007) Biogeografia e ecologia do Cardeal-Amarelo *Gubernatrix cristata* (Emberizidae) – resultados preliminares / Biogeography and ecology of Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* (Emberizidae) – preliminary results. In: Congresso Brasileiro de Ornitologia (15: 2007: Porto Alegre, RS) [programação e resumos]. EDIPUCRS, Porto Alegre

Martins-Ferreira C (2010) Estrutura populacional, diversidade genética, área de distribuição e conservação do cardeal-amarelo – *Gubernatrix cristata* (Vieillot, 1817) (Aves, Passeriformes, Emberezidae). Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Martins-Ferreira C, Santos MO, Haddrath O, Baker AJ, Freitas TRO (2010) Isolation and characterization of 10 microsatellite loci in the Yellow Cardinal

Gubernatrix crista En. Molecular Ecology Resources 10 (4): 751-754

Martins-Ferreira C, Repenning M, Damiani RV (2013) Gubernatrix cristata In: Serafini PP (org) Plano de Ação Nacional para a conservação dos passeriformes ameaçados dos Campos Sulinos e Espinilho. Série Espécies Ameaçadas, 31. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, Brasília, pp 116-119

Miyaki CY (2010) Metodologias de análises genéticas aplicadas ao estudo e à conservação de aves. In: Von Matter S, Straube FC, Accordi I, Piacentini V, Cândido Jr. JF (Ed.) Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento. 1º. ed. Technical Books, Rio de Janeiro

Miyaki CY, Perreira SL, Biasia I, Wajntal A (1997) DNA fingerprinting applied to parrot captive breeding program. Ararajuba 5 (2): 127-133

MMA. (2003). Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Anexo à Instrução Normativa nº. 3 do MMA, de 25/05/2003, Diário Oficial da União nº. 101, Seção 1, pp 88

Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel GJ (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. Genomics 10: 654-660

Ortiz D (2008) Distribución Histórica y Actual del Cardenal Amarillo (*Gubernatrix cristata*) en el Litoral Fluvial Argentino. In: Aceñolaza FG (Ed.) Temas de la biodiversidad del litoral fluvial argentino III. INSUGEO, São Miguel de Tucumán, pp 121-126

Pessino ME (2006) Nuevo registro y descripción de híbridos entre cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*) y diuca común (*Diuca diuca*) en la provincia de La Pampa, Argentina. Nuestras Aves 52: 16-18

Pessino ME, Titarelli F (2006) Cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*): Diagnóstico de su situación con respecto al comercio ilegal en la Provincia de La Pampa, Argentina. Gestión Ambiental 12: 69-76

Pessino ME, Banchs R, Fernandez M, Dolsan M (2002) Registro de un híbrido entre cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*) y diuca común (*Diuca diuca*) en el norte de la provincia de La Pampa, Argentina. Nuestras Aves 44: 15-16

Pillar VP, Müller SC, Castilhos ZMS, Jacques AVA (2009) Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade. MMA, Brasília

Presti FT (2006) Caracterização da variabilidade genética em espécies de psitacídeos ameaçados. Dissertação, Universidade de São Paulo

Presti FT (2010) Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e

mitochondrial. Tese, Universidade de São Paulo

Presti FT, Oliveira-Marques AR, Caparroz R, Biondo C, Miyaki CY (2011) Comparative analysis of microsatellite variability of five macaw species (Psittaciformes, Psittacidae): application for conservation. *Genetics and Molecular Biology* 34: 348-352

Pritchard JK, Matthew S, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959

Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275

Ridgely RS, Tudor G (1997) *The birds of South America. Volume I, The Oscine Passerines.* University of Texas Press, Austin

Rosel PE, Forgetta V, Dewar K (2005) Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology Notes* 5: on line

Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138

Russello MA, Amato G (2004) Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology* 13(9): 2829-2840

Serafini PP (2013) Plano de Ação Nacional para a conservação dos passeriformes ameaçados dos campos sulinos e espinilho. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBIO, Brasília

Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira.* Nova Fronteira, Rio de Janeiro

Small MP, Beacham TD, Withler RE, Nelson RJ (1998) Discrimination coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) population within the Fraser River, British Columbia, using microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 7: 141-155

Sosa H, Martín S, Zarco A (2011) Nuevos registros de cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*) en la Provincia de Mendonza, argentina. *BioScriba* 4 (1): 21-25

Tautz D, (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.

Tautz D, (1993) Notes on definition and nomenclature of tandemly repetitive sequences. In: *DNA fingerprinting: State of science.* Pena SDJ, *et al* pp. 21-28

Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138

Urano K, Tsubono K, Taniguchi Y, Matsuda H, Yamada T, Sigiyama T, Homma K,

Kaneko Y, Yamagishi S, Iwaisaki H (2013) Genetic Diversity and Structure in the sado captive population of the japanese crested ibis. *Zoological Science* 30: 432-438

VanOosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538

Wagner AP, Creel S, Kalinowski ST (2006) Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity* 97: 336-345

Woltmann S, Sherry TW, Kreiser BR (2012) A genetic approach to estimating natal dispersal distances and self-recruitment in resident rainforest bird. *Journal of Avian Biology* 43: 33-42

Wright S (1978) *Evolution and Genetics of Populations* vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago

Zhang B, Fang S, Xi Y (2004) Low genetic diversity in the Endangered Crested Ibis *Nipponia nippon* and implications for conservation. *Bird Conservation International* 14: 183-190

6. Anexos

Anexo 1. Relação dos municípios onde foram coletados as amostras utilizadas neste trabalho.

Local	Fêmeas	Machos	Total
Cetas Porto Alegre (CE)	4	8	12
Laboratório de Citogenética (CT)	9	1	10
Alvorada (AL)	-	2	2
Cachoeirinha (CC)	1	1	2
Canoas (CA)	11	16	27
Estância Velha (EV)	3	12	15
Esteio (ES)	2	1	3
Guaíba (GU)	6	7	13
Lajeado (LA)	-	1	1
Novo Hamburgo (NH)	4	7	11
Pelotas (PE)	10	13	23
Porto Alegre (PA)	1	1	2
Rio Grande (RG)	3	4	7
Santa Cruz do Sul (SC)	5	4	9
Santa Maria (SM)	7	9	16
Santa Vitória do Palmar (SV)	4	4	8
São Leopoldo (SL)	4	3	7
Sapucaia do Sul (SP)	2	3	5
Taquara (TA)	-	1	1
Uruguaiana (UR)	5	11	16
Total	81	109	190

Relação dos locais amostrados e número de amostras obtidas em cada localidade utilizadas neste estudo.

Anexo 2. Estimativas da presença de alelos nulos.

Loco	Alelo nulo	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1
GcrisC02	Sim	0,1652	0,2204	0,1321
GcrisC08	Sim	0,0585	0,0634	0,0491
GcrisE02	Sim	0,1033	0,1135	0,0776
GcrisF02	Sim	0,0446	0,0477	0,0425
GcrisF12	Sim	0,2575	0,3749	0,2205
GcrisH06	Sim	0,1269	0,1484	0,1156
GcrisH07	Não	0,0045	0,0118	0,0104
GcrisH09	Sim	0,0441	0,0435	0,0363
GcrisH12	Sim	0,314	0,507	0,2752

Resultados para a presença de alelos nulos para os nove locos testados usando três métodos de estimativa de alelos nulos inferidos no programa Micro-checker.

Anexo 3. Locos com evidências de desequilíbrio de ligação

Locos #	GcrisC02	GcrisC08	GcrisE02	GcrisF02	GcrisF12	GcrisH06	GcrisH07	GcrisH09	GcrisH12
GcrisC02	*	-	+	-	-	-	+	+	+
GcrisC08	-	*	-	-	+	+	-	-	+
GcrisE02	+	-	*	-	-	-	+	-	+
GcrisF02	-	-	-	*	+	-	+	-	+
GcrisF12	-	+	-	+	*	+	+	+	-
GcrisH06	-	+	-	-	+	*	-	-	+
GcrisH07	+	-	+	+	+	-	*	+	-
GcrisH09	+	-	-	+	+	-	+	*	+
GcrisH12	+	+	+	+	-	+	-	+	*

Resultados para o equilíbrio de ligação para os nove locos usados neste estudo testados no programa Arlequin 3.11.

Anexo 4. Normas para submissão de manuscritos a revista Conservation Genetics

Conservation Genetics

Editor: A. Rus Hoelzel

ISSN: 1566-0621 (print version)

ISSN: 1572-9737 (electronic version)

Journal no. 10592

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

ARTICLE TYPES

Appropriate subjects for papers in Conservation Genetics are described in the section on ‘aims and scope’ (and see note appended below on dominant markers).

Original research papers are typically no longer than 6,000 words, but can be up to a maximum of 8,000 words. The writing style should be concise and consistently relevant.

Manuscripts should be structured as follows.

The title page should be organized as described in the section ‘title page’. This should be followed by the Abstract (typically 200-250 words), Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion sections. These sections can be divided into subsections, as appropriate. Both print and online appendices are allowed (online versions encouraged for large appendices). Further specific information on the formatting of the text and nature of the acknowledgements (which follow the text and precede the references) is given in the section on ‘text’.

Referencing format is described in the section on 'references'. References should be followed by the figure captions, figures and tables, in that order.

Short communications of a maximum 2,000 words, 30 references and three display items will also be considered. These should normally follow the above format, though results and discussion sections can be combined if preferred.

Review Articles and Perspectives are typically solicited by the editors, but can be submitted after an initial contact with the editor in chief. Reviews will be concise reports on an area of interest in conservation genetics and should be no more than 7,000 words long. They are not expected to adhere to a strict format, though they should include the title page and abstract as described above. Perspectives can provide personal viewpoints, promote discussion on current topics, or propose new areas of conservation genetic research, application or development. They must meet the normal standards of scientific objectivity and will be subjected to peer review. These should be no longer than 3,000 words.

Important note on RAPDs, ISSRs and similar dominant markers:

We do not send for review papers that use only RAPD (or similar) markers when using different markers, or other markers in addition would be more appropriate. This holds for all studies looking at population structure in sexual species, given the problems with dominance and interpretation. There are exceptional circumstances for which RAPDs (or similar) may work well (e.g. with clonal species), and we therefore don't exclude their inclusion entirely, but discourage their exclusive use in all cases, and when used, require rigorous assessment of the repeatability of the genotypes.

The word count should include title, abstract, keywords, body of the text, figures, and tables but excluding authors affiliations, references and on-line supplementary material.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long

author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern*

genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.

<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN

List of Title

Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the

table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps. Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another

when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are

still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about

2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue

the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material)

should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.