



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Camila Hüpner

Desenvolvimento de um protocolo para recebimento, manuseio e práticas de genética molecular com amostras de penas de Psitacídeos da espécie *Guaruba guarouba* para análise de diversidade genética

Florianópolis
2022

Camila Hüpner

Desenvolvimento de um protocolo para recebimento, manuseio e práticas de genética molecular com amostras de penas de Psitacídeos da espécie *Guaruba guarouba* para análise de diversidade genética

Dissertação/Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em biologia celular e do desenvolvimento

Orientador: Profa. Andrea Rita Marrero, Dr.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hüpner, Camila

Desenvolvimento de um protocolo para recebimento,
manuseio e práticas de genética molecular com amostras de
penas de psitacídeos da espécie *Guaruba guarouba* para
análise de diversidade genética / Camila Hüpner ;
orientadora, Andrea Rita Marrero , 2022.
62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Genética
da conservação. 3. Genética molecular. 4. Marcadores
moleculares. 5. Psitacídeos. I. , Andrea Rita Marrero. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III.
Título.

Camila Hüpner

Desenvolvimento de um protocolo para recebimento, manuseio e práticas de genética molecular com amostras de penas de Psitacídeos da espécie *Guaruba guarouba* para análise de diversidade genética

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Patrícia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Norma Machado
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.(a) Camile Lugarini
ICMBio

Prof.(a) Dr.(a) Guilherme Toledo e Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Andrea Rita Marrero, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, ao meu amado namorado e aos meus queridos sogros, que estiveram comigo durante todo esse tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais Lucia e Evaldo Hüpner, e meu irmão Maurício, por me permitir seguir fazendo ciência, por me amar incondicionalmente e por ser minha força todos os dias.

Agradeço também a meu namorado Lucas D'Ávila, por permanecer ao meu lado durante todos estes anos, por ser minha luz e meu amparo, por compartilhar comigo os dias bons e ruins, as vitórias e derrotas, e por nunca duvidar das minhas capacidades.

Agradeço aos meu sogro Valmor D'Ávila e minha sogra Denise Ramos de Aguiar D'Ávila por me apoiarem, por me acolherem, pela paciência e pelo carinho recebido.

Agradeço também a minha orientadora, Prof. Dra. Andrea Rita Marrero, por ser orientadora, amiga, confidente, mãe e chefe! Por apoiar meus objetivos, por dar luz nos dias de incertezas, por não desistir, por continuar sendo professora e amiga em todos os momentos. Obrigada por aceitar ser orientadora, e continuar sendo até o fim, mesmo com todos os problemas que passamos juntas.

Agradeço à coordenadoria da Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PPGBCD), aos professores do curso e a todos os colaboradores, que mantiveram a PG funcionando mesmo com todos os obstáculos dos últimos anos.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela bolsa concedida de 11 meses, e pelo apoio para que este trabalho se concretizasse.

Agradeço ao LAMEB e aos seus colaboradores pelo apoio e pela ajuda para a finalização deste trabalho.

Também agradeço a todos os meus colegas de laboratório, Ariane Ferreira, Kathleen Yasmin de Almeida, Isabela Faria, Caio Pereira e Julia Penso pela ajuda, pelo carinho, pelas risadas e por manter viva a vontade de fazer ciência, todos os dias que estivemos juntos.

Agradeço também aos amigos do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), aos professores e colegas que de alguma forma fizeram parte desta caminhada. Agradeço à professora Norma Machado da Silva e ao LAGEV, pela ajuda tão necessitada nessas últimas semanas de experimentos.

Finalmente agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes nesta caminhada, aos colegas de classe, aos trabalhadores do Centro de Ciências Biológicas e aos amigos que mesmo a distância, fizeram meus dias mais completos.

Um grande Abraço, e obrigada por tudo!

"Research is formalized curiosity. It is poking and prying with a purpose. It is a seeking that he who wishes may know the cosmic secrets of the world and they that dwell therein."
(HURSTON, Zora Neale, 1942)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de protocolo de manuseio e triagem de penas de aves, além do teste de protocolo de extração de DNA pelo método da Proteinase K para penas de *Guaruba guarouba* (Psittacidae, Gmelin, 1788) e a utilização das extrações para técnicas moleculares de PCR. As penas foram recebidas de uma população cativa de 23 indivíduos, atualmente residentes do BioParque na cidade do Rio de Janeiro – RJ. A coleta das penas foi realizada por veterinário da instituição, e foram coletadas de 2 a 4 penas de cobertura das Ararajubas, sendo elas penas maduras ou em crescimento.

Para os testes de biologia molecular foram selecionados 5 pares de iniciadores moleculares heterólogos, descritos para espécies filogeneticamente próximas da Ararajuba. As extrações foram realizadas com material genético extraído do cálcamo das penas disponíveis, com objetivo de obter DNA das células da epiderme fixadas na parte externa do cálcamo, ou ainda do canhão, estrutura vascularizadas presente apenas em penas em desenvolvimento, porém com maior retorno de DNA. Os resultados das extrações de DNA obtidos foram melhores com penas em crescimento, que ainda possuíam tecido de canhão. Os iniciadores de marcadores microssatélites heterólogos específicos de outras espécies amplificaram bandas visíveis em todas as amostras que possuíam canhão, e apenas 3 amostras sem canhão amplificaram todos os iniciadores. As outras tiveram resultados variáveis e bandas fracas, ou nenhuma banda. Todos os iniciadores selecionados amplificaram fragmentos para Ararajuba.

Palavras-chave: Diversidade Genética. Genética da Conservação. Protocolos moleculares.

ABSTRACT

The objective of this work was to produce a management and handling protocol for Avian feathers, to test an extraction DNA protocol from Proteinase K method for feathers from *Guaruba guarouba* (Psittacidae, Gmelin – 1788), and to test the use of genetic material extracted into molecular techniques, such as PCR. The feathers were received from a captive population of twenty three Golden Conure individuals, residing on BioParque, a zoological institution in Rio de Janeiro – RJ. Two to four cover feathers were collected by veterinarians from the Zoo, in a mix of mature and growing feathers.

To test molecular biology, 5 pairs of heterologous *primers* were selected, originally targeted for filogenetic related species of Golden Conure. DNA extractions were obtained from genetic material extracted from the calamus of available feathers, from epidermis cells fixated on the calamus exterior of full grown feathers, or from the sheath, vascularized structure presente only on growing feathers (blood feathers), these last ones provide great amount of DNA.

The DNA extraction resulted in better material from growing feathers, with sheath still attached. The heterologous microsatellite markers selected for PCR analysis amplified fragments from all samples that contained growing tissue, and only 3 samples without growing tissue amplified all *primers*. The other samples had variable results, weak bands or even no band at all. All *primers* selected amplified fragments for Golden Conure.

Keywords: Genetic Diversity. Conservation Genetics. Molecular Protocols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo de uma região microssatélite	22
Figura 2 - Indivíduo adulto de Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>)	24
Figura 3 - Distribuição geográfica de Ararajubas	25
Figura 4- Filhote de Ararajuba	26
Figura 5- Embalagens lacradas, contendo as penas de cada indivíduo	30
Figura 6 - Esquema representando a estrutura de uma pena, com cálam, raque e barbas	31
Figura 7 - Diferenças entre uma pena em crescimento com canhão, e uma pena madura, sem canhão	31
Figura 8 - Método para fixação da pena com pinça e corte com tesoura	32
Figura 9 - Tamanho do cálam de uma pena de contorno de Ararajuba	36
Figura 10 - Imagem de transiluminador com os produtos da primeira extração de DNA realizada com penas de Ararajuba, com amostras danificadas por queda de energia durante o protocolo de extração	37
Figura 11 - Média da quantificação de DNA de penas de acordo com o tipo de pena (Pena Madura X Pena Canhão)	38
Figura 12 - Identificação dos genes CHD-Z e CHD-W em indivíduos de <i>Turdus amaurochalinus</i> - Ordem Passeriformes, com amostras de sangue para teste de eficácia do método de extração com Proteinase K	40
Figura 13 - Árvore filogenética da Ararajuba	42
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos das PCR dos iniciadores analisados.	
14a) Marcador molecular UnaCT43	42
14b) Marcador molecular Ach113	43
14c) Marcador molecular Ach114	44
14d) Marcador molecular HYA1132	44
14e) Marcador molecular UnaCT74	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informação dos indivíduos de <i>Guaruba guarouba</i> analisados	28
Tabela 2 - Iniciadores selecionados para análise neste trabalho	34
Tabela 3 - Quantificação das amostras de DNA [ng/ul]	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FAPESC – Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza

LAGEV – Laboratório de Genética Evolutiva

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PPGBDC – Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

RPM – Rotações por minuto

SSR – Sequências de repetição curtas

STR – Sequências de repetição em tandem

WAZA – Associação Mundial de Zoológicos e Aquários

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE A –	58
	APÊNDICE B –	59
	APÊNDICE C -	61

1 INTRODUÇÃO

O planeta Terra possui uma grande biodiversidade, com variedade de ambientes e elementos que propiciam vida às mais diversas criaturas. Os animais, incluindo os humanos, estão sujeitos a eventos evolutivos que ocorrem naturalmente, mesmo quando não há influências externas aparentes, no decorrer da existência de determinada espécie, podendo levar a extinção ou a mudanças nesta mesma espécie.

Globalmente, a destruição, degradação, fragmentação ou conversão de habitats para a agricultura, pecuária, horticultura, ecoturismo e indústria, a fragmentação das paisagens naturais sobre colheita comercial para satisfazer o mercado urbano e de exportação são algumas das pressões humanas exercidas sobre as populações naturais, sua biologia e potencial para responder à mudanças ambientais, que levam à diminuição de tamanhos e densidades populacionais, à diminuição da aptidão, ao isolamento acentuado, à erosão e extinção de espécies (BARATA et al., 2018).

Com a diminuição do tamanho das populações selvagens, fatores adicionais, como variação demográfica, ambiental, genética ou catástrofes naturais, aumentam sobremaneira o risco de extinção (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

Com o desenvolver das sociedades humanas, a necessidade por mais espaço para o crescimento e as atividades econômicas que influenciam a vida selvagem iniciaram uma série de avanços nos processos de mutação antes totalmente naturais, transformando o desenvolvimento de uma espécie na possível extinção de outra.

Se a evolução e a extinção são processos naturais em todas as espécies, por que conservar?

Os processos evolutivos naturais se desdobram no decorrer de um vasto período, através de dezenas de gerações de uma mesma espécie, fazendo a vida contemporânea um reflexo de linhagens ininterruptas, que datam da própria origem da vida, mas esse processo está “quebrado” (FENSTER et al., 2018). São dois os principais motivos: a) com a extinção de populações dentro de uma espécie, existem cada vez menos gerações para diversificação e adaptação às constantes mudanças do ambiente e b) com a redução da diversidade genética, cada espécie se adapta mais lentamente às mudanças constantes nos habitats (FENSTER et al., 2018). Ou seja, perde-se tanto a diversidade de vida, quanto alguns dos mecanismos naturais que promovem o aumento dessa diversidade.

1.1 CONSERVAÇÃO E GENÉTICA

Segundo SOULÉ, (1985) a biologia da conservação é a aplicação das ciências para os problemas de conservação, incorporando a biologia das espécies, das populações de uma mesma espécie, comunidades e ecossistemas que estão perturbados, direta ou indiretamente, por atividades humanas ou outros agentes e tem como objetivo principal prover princípios e ferramentas para a preservação da diversidade biológica.

Em 2012, KAREIVA e MARVIER adicionaram outras definições à biologia da conservação, visando melhorar a vida humana através do manejo do meio ambiente. Nas ciências da conservação, também devem ser incluídas estratégias que quando praticadas em conjunto, maximizam benefícios para as pessoas e para a biodiversidade, ou seja, é uma disciplina que requer a aplicação de ciências naturais e sociais.

A conservação é uma disciplina de crise (KAREIVA; MARVIER, 2012; SOULÉ, 1985), ou seja, suas ações são muitas vezes necessárias quando as espécies já estão em avançado estado de extinção ou os habitats já estão criticamente ameaçados. Apesar de ser necessária em momentos de crise, isso não significa ser uma disciplina de ações imediatas e sem planejamento, muito pelo contrário, com o aumento dos esforços de biólogos da conservação, cada vez mais as práticas de conservação podem ser planejadas, pensadas e melhoradas (KAREIVA; MARVIER, 2012).

Existem diversas metodologias aplicáveis para a conservação da biodiversidade. A genética da conservação é uma disciplina de planejamento, que tem como definição a aplicação da teoria e das técnicas de genética molecular e evolutiva para a redução do risco de extinção de espécies ameaçadas (FRANKHAM *et al.*, 2004), e a conservação da biodiversidade (FRANKHAM, 2010, ALLENDORF; LUIKART, 2007).

Para a resistência a longo prazo da maioria das espécies ameaçadas de extinção, o uso da genética e de suas considerações relacionadas têm sido o foco no esforço da conservação (HEDRICK, 2001). O objetivo de manutenção de longo prazo é preservar as espécies como entidades dinâmicas, capazes de sobreviver às mudanças do ambiente (FRANKHAM *et al.*, 2004).

As principais contribuições da genética, na biologia da conservação, de acordo com FRANKHAM (2010), são:

- Contribuições genéticas para resolução de incertezas taxonômicas;

- Definição de unidades de divergência evolutiva para manejo individual dentro de determinada espécie;
- Manejo genético para diminuição de cruzamentos consanguíneos e perda de diversidade genética em populações, e risco de extinção em vida selvagem;
- Manejo genético de populações cativas para minimização de cruzamentos consanguíneos e perda de diversidade genética em cativeiro, além da maximização do sucesso de reintrodução;
- Contribuições de genética no manejo de espécies invasivas e seu impacto em espécies ameaçadas;
- Aplicação de genética molecular para obtenção de informações importantes para conservação de espécies (sexo, tamanho populacional, história demográfica, sistema de cruzamentos, estrutura da população, fluxo gênico, parentesco, dieta e doenças);
- Uso de genética molecular em análises forenses;
- Integração da genética com variáveis demográficas e ambientais, catástrofes e impacto humano para predição de risco de extinção, e comparação de opções alternativas em programas de recuperação de espécies.

Muitos dos pontos acima descritos levam em consideração uma das principais características da manutenção da biodiversidade através da genética: a diversidade genética, que é a variabilidade de alelos e genótipos presentes no grupo que está sendo estudado (população, espécie, etc) (FRANKHAM, et al., 2004; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002), manifestada pelas diferenças nas características apresentadas por um indivíduo (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002), desde as proteínas codificadas até a cor da plumagem das aves.

Toda diversidade genética é originada através de mutações, que mudam as sequências de nucleotídeos nos alelos. Populações são os diferentes grupos de uma mesma espécie, a diversidade genética pode ser dispersada nas populações através de migrações (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Essas alterações são transmitidas através de cruzamentos, e quanto maior a população for, geralmente maior será a sua diversidade genética (FRANKHAM et al., 2004).

Isto significa que, nas populações em declínio, a diversidade genética tende a diminuir, pois há menores possibilidades de cruzamento, maior possibilidade de cruzamento com indivíduos aparentados (que possuem os mesmos alelos), pouca ou nenhuma migração, entre outros fatores que quando acumulados, diminuem as chances de restabelecimento da população.

A conservação genética pode ser vista então, como uma tentativa de proteger a diversidade genética (ALLENDORF; LUIKART, 2007). Para a manutenção da variabilidade genética e a viabilidade das populações, faz-se necessário o uso de vários recursos disponíveis, tanto na conservação de vida livre, quanto na conservação de espécies sob cuidado humano.

1.2 MANEJO DE POPULAÇÕES EX SITU

A criação de áreas protegidas capazes de garantir a segurança dos diferentes componentes da biodiversidade, além de seus padrões e seus processos evolutivos naturais, é sem dúvida a melhor estratégia de conservação (FRANCISCO; SILVEIRA; PIRATELLI, 2013; PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Entretanto, a realidade é mais difícil, e nem sempre é possível manter as estratégias de conservação somente no meio natural (conservação *in situ*), pois são frequentes as situações em que não existem condições básicas para determinadas espécies sobreviverem em seus habitats naturais, principalmente por conta do impacto humano (FRANKHAM et al., 2004). Para situações assim, o manejo *ex situ*, ou seja, a criação, o cuidado e a reprodução em cativeiro, pode complementar as estratégias de conservação *in situ* (FRANCISCO; SILVEIRA; PIRATELLI, 2013).

De acordo com FRANCISCO et al., (2013), citam-se como exemplos de casos em que existe a necessidade da criação de programas de conservação *ex-situ*: situações em que todos os esforços de conservação *in situ* não foram suficientes para impedir o declínio populacional, situações em que as populações remanescentes de uma espécie ameaçada encontram-se fora de áreas protegidas e não existe expectativa de se tornarem protegidas no futuro próximo, quando uma espécie é representada na natureza por apenas uma ou poucas populações, especialmente se estiverem em áreas com altos riscos de catástrofes, ou ainda quando as densidades populacionais se tornam tão baixas que o simples encontro entre dois indivíduos para reprodução é pouco provável.

O estabelecimento de populações em cativeiros pode prover uma valiosa rede de segurança contra a extinção quando uma espécie atinge níveis críticos na natureza, ou está sob

risco de desaparecimento frente a eventos estocásticos, catástrofes ambientais, ou perda de variabilidade genética (ZACARIOTTI; BONDAN; DURRANT, 2013).

Programas de conservação *ex situ* proporcionam maiores chances de sobrevivência a certas espécies que sofrem de forma extensiva com os problemas relacionados a seu declínio populacional. A IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) possui um Guia para o suporte das ações de conservação que utilizam a conservação *ex situ* como um de seus métodos. A extensão dos cenários e ferramentas na conservação *ex situ* é bem diversa e pode ter como alvo diferentes necessidades e papéis na conservação, servindo, portanto, a diversos propósitos (IUCN/SSC, 2014).

As populações cativas podem ser consideradas importantes ferramentas de conservação, tendo em vista a possibilidade de se criar espécimes para futura soltura e reestruturação de populações na natureza (STANTON et al., 2015).

Populações cativas geralmente sofrem de duas limitações: são pequenas e descendem de poucos fundadores, e isso significa que existe relativamente pouca diversidade genética desde o início da população (FRANKHAM, 1995). Além disso, parte da diversidade que há se perderá a cada geração por causa do isolamento da população (FIENIEG; GALBUSERA, 2013). Outra consideração importante quando tratamos de populações cativas é a adaptação ao cativeiro, e a seleção de indivíduos mais adaptados ao cativeiro. Algumas vezes essa seleção pode ser favorável a indivíduos com menor sucesso no habitat, o que dificultaria a futura soltura, por exemplo.

Para que essas populações sejam geneticamente representativas das populações selvagens, deve haver um manejo genético adequado destas (MARTIN-WINTLE et al., 2019). Uma das principais etapas do manejo genético é a fase de cruzamentos. Essa fase consiste da seleção de pares reprodutivos, com possível troca de indivíduos de uma instituição para outra (FIENIEG; GALBUSERA, 2013), sempre buscando um maior nível de variabilidade para a população.

A fundação de populações para a criação de programas de reprodução e manejo *ex situ* também é um passo importante a se considerar. Deve-se começar com a seleção dos indivíduos que darão origem a essa população, sendo que às vezes não há outra escolha a não ser os indivíduos sobreviventes em cativeiro (quando os indivíduos disponíveis já são os últimos da espécie) (ALLENDORF et al., 2007). Nestes casos, é importante determinar qual a situação da diversidade genética destes indivíduos (STANTON et al., 2015). Por outro lado, quando há disponibilidade de indivíduos e possibilidade de escolha, o objetivo é selecionar fundadores que capturem o máximo

de diversidade genética selvagem possível, tentando combinar o perfil genético dos fundadores aos de uma população selvagem (MILLER et al., 2010; STANTON et al., 2015).

É importante que os programas de conservação de uma espécie dentro e fora de seu hábitat estejam em sincronia, pois o sucesso na preservação da espécie dificilmente será alcançado se as estratégias não forem realizadas de forma complementar (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; ZACARIOTTI; BONDAN; DURRANT, 2013). A conservação *ex situ* não deve ser vista como uma alternativa às estratégias *in situ*, mas sim como uma ferramenta adicional (IUDZG/CBSG; IUCN/SSC, 1993; ZACARIOTTI; BONDAN; DURRANT, 2013).

Instalações *ex situ* para preservação da biodiversidade incluem zoológicos, fazendas com criação de animais selvagens, aquários, programas de criação em cativeiro, jardins botânicos, bancos de sementes (PRIMACK; RODRIGUES, 2001), além de santuários e outras instituições de cuidado animal.

Apesar da popularidade e da origem recreativa na história humana, os zoológicos sofreram consideráveis mudanças tanto na sua estrutura quanto na sua função nos últimos anos (TRIBE; BOOTH, 2003). Além de manterem sua atratividade como local de entretenimento, os zoológicos e aquários atualmente exercem grande contribuição na conservação da biodiversidade (TRIBE; BOOTH, 2003). É possível identificar os zoológicos como locais de conservação, pesquisa, educação e entretenimento (CARR; COHEN, 2011) desde que estes tenham recintos adequados e estejam envolvidos com programas de preservação, além de estarem conscientes das boas práticas de manejo e bem-estar animal.

A Associação Mundial de Zoológicos e Aquários (WAZA) constitui mais de 1200 instituições, visitadas por mais de 600 milhões de pessoas todos os anos (CARR; COHEN, 2011; HOLTORF, 2008). São os tipos de museus mais visitados, com um espectro de visitantes dos mais ecléticos, desde crianças até idosos (HOLTORF, 2008). Por conta deste grande território abrangido, os zoológicos podem e devem operar no espectro total das atividades de conservação, desde a reprodução *ex situ* de espécies ameaçadas, a investigação, educação e formação do público, bem como exercer influência e advogar o apoio à conservação *in situ* das espécies e populações (ASSOCIAÇÃO MUNDIAL DE ZOOS E AQUÁRIOS, 2005; HOLTORF, 2008).

1.3 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

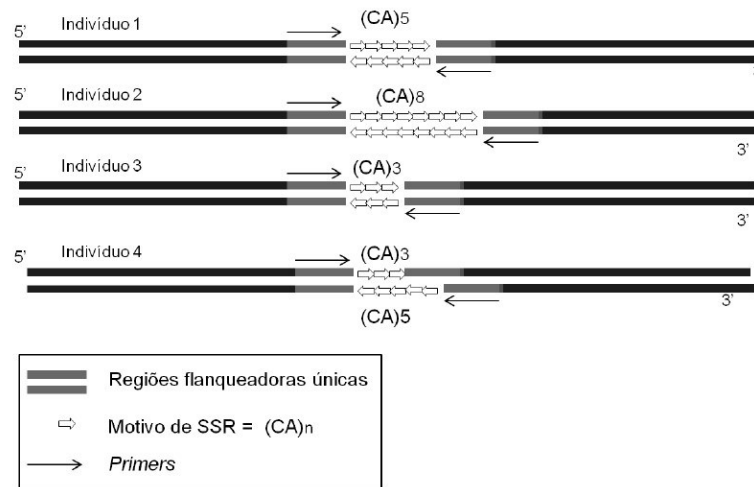
Diversidade genética é essencial para assegurar a sustentabilidade e reduzir os riscos de extinção de uma espécie (FAN et al., 2018). Geralmente, populações com maior diversidade genética possuem uma chance maior de adaptação às mudanças do ambiente (FAN et al., 2018; FRANKHAM, 2010).

Uma forma de avaliar a diversidade genética é através do uso de marcadores moleculares que podem ser utilizados para responder perguntas sobre fluxo gênico, parentesco e estrutura populacional, resultando em dados relacionados à distribuição da diversidade genética dentro de uma população e entre populações, dados estes essenciais nas estratégias de conservação *ex situ* e *in situ* (PRESTI; WASKO, 2014).

Os microssatélites são repetições em tandem de 1-6 nucleotídeos encontrados em alta frequência no genoma nuclear da maioria dos táxons (SELKOE; TOONEN, 2006). Também podem ser chamados de SSR (Short Sequence Repeats) ou STR (Short Tandem Repeats). Um locus de microssatélite varia tipicamente entre 5 e 40 repetições do mesmo tandem, e tandems de dinucleotídeos (ex: GAGAGAGA), trinucleotídeos (ex: TAGTAGTAGTAG) e tetranucleotídeos (ex: GATAGATAGATA) são as escolhas mais comuns para estudos genéticos (SELKOE; TOONEN, 2006).

Considera-se como “alelo” de um microssatélite a quantidade de repetições de cada cópia, e no caso de espécies diplóides, de reprodução sexuada cada indivíduo recebe uma cópia de origem materna e outra de origem paterna (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2011), isto significa que alguns microssatélites podem ter mais de 40 alelos diferentes (um para cada número de repetição), sendo altamente polimórficos.

Figura 1: Esquema representando uma região microsatélite, e a variação de repetições entre indivíduos. Os indivíduos 1, 2 e 3 são homocigotos para cada número de repetição, e o indivíduo 4 é heterocigoto, pois possui números diferentes de repetições (3 e 5).



Fonte: Retirado de TURCHETTO-ZOLLET, et al., 2017.

Cada loci de microsatélite é uma amostra do genoma, e por conta da recombinação, seleção, migração e deriva genética, diferentes genes e regiões do genoma possuem histórias de ancestralidade diferentes (SELKOE; TOONEN, 2006). Possuem expressão multialélica codominante, que permite a identificação de homocigotos e heterocigotos, facilitando a caracterização de diferentes populações por análise de frequência alélica (ABDUL-MUNEER, 2014; PRESTI; WASKO, 2014).

Para análise da diversidade genética, é importante utilizar um painel com múltiplos loci microsatélite, que combina o resultado de todos eles, e provê resultados mais precisos e estatisticamente confiáveis, permitindo a comparação de populações e indivíduos (SELKOE; TOONEN, 2006).

1.4 INICIADORES HETERÓLOGOS

A necessidade do isolamento de novos iniciadores específicos, quando se estuda uma espécie, pode ser um problema entre pesquisadores que não possuem equipamento específico para clonagem e sequenciamento (PRIMMER; MOLLER; ELLEGREN, 1996). Além disso, é necessário que se conheça informações do genoma da espécie para a utilização de iniciadores espécie-específicos (ABDUL-MUNEER, 2014; DE CASTRO et al., 2017).

Uma das soluções utilizadas para estes problemas é a utilização da transferência de iniciadores entre espécies (DE CASTRO et al., 2017). Isso significa que um *primer* desenhado

para uma determinada espécie pode ser utilizado para amplificar fragmentos microssatélites em outra espécie.

Os microssatélites estão geralmente presentes nas regiões não-codificadoras, e por conta das altas taxas de mutação encontradas nestes loci, mutações acumuladas nas regiões flangeadoras eventualmente inibirão a amplificação em uma espécie com iniciadores desenvolvidos para outras espécies (PRIMMER; MOLLER; ELLEGREN, 1996). Entretanto, se as espécies estão filogeneticamente próximas, as chances de uma amplificação heteróloga aumentam (ABDUL-MUNEER, 2014; DE CASTRO et al., 2017; PRIMMER; MOLLER; ELLEGREN, 1996).

Para o caso da família Psittacidae, vários estudos amplificaram com sucesso iniciadores heterólogos entre diferentes espécies da família. Trabalhos com espécies do gênero *Amazona*, *Ara*, *Anadorhynchus*, *Psittacus* e *Cyanopsitta* já comprovaram a eficácia da utilização de marcadores heterólogos para trabalhos com Psittacidaeos (CAPARROZ et al., 2007; CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, 2003; DA SILVA et al., 2015; FARIA; MIYAKI, 2006; GEBHARDT; WAITS, 2008; PRESTI et al., 2011).

1.5 PLANO DE AÇÃO NACIONAL PARA CONSERVAÇÃO DAS AVES DA AMAZÔNIA

A floresta amazônica possui cerca de 5,5 milhões de quilômetros quadrados de extensão, dos quais 60% fazem parte do território brasileiro. É a maior extensão de floresta tropical do mundo e abriga a maior biodiversidade do planeta, com mais de 1000 espécies de aves (ICMBIO; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

Com o avanço da devastação florestal e o aumento do número de espécies em estado crítico de conservação, que sofrem com essa perda de habitat, foi elaborado pelo governo brasileiro, por intermédio do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), em maio de 2016, um plano de ação para o combate da ameaça de extinção da biodiversidade de aves da Amazônia (ICMBIO; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

O Plano de Ação Nacional para Conservação das Aves da Amazônia – PAN Aves da Amazônia é um plano com estratégias que visam reconhecer e proteger a riqueza da biodiversidade de Aves, além de recuperar as espécies ameaçadas, por meio de medidas como a elaboração e execução de planos de ação (ICMBIO; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE,

2016). Este plano contempla um total de 57 espécies, com 53 delas ameaçadas de extinção segundo o livro vermelho das aves (ICMBIO, 2018).

Dentro desta lista encontram-se espécies criticamente ameaçadas e conhecidas da Amazônia como o Jacamim-de-costas-escuras (*Psophia obscura*) e o mutum-pinima (*Crax fasciolata pinima*). Também encontram-se espécies de Psitacídeos em estado vulnerável e em perigo, como a Ararajuba (*Guaruba guarouba*) e a Jandaia-amarela (*Aratinga solstitialis*), além de espécies de grande porte de aves de rapina, como o Gavião-Real (*Harpia harpyja*).

Para este trabalho, foi selecionada a Ararajuba para foco de estudo.

1.6 ARARAJUBA – *GUARUBA GUARUBA*

A Ararajuba (*Guaruba guarouba* – Gmelin, 1788) é uma ave endêmica da Floresta Amazônica, pertencente à família Psittacidae, que inclui outros papagaios neotropicais como a Arara Azul, a Ararinha e o Papagaio-de-peito-roxo.

Figura 2: Ararajuba (*Guaruba guarouba*)



Fonte: WikiAves. Fotógrafo: Luciano Faria. Acesso em 08/01/2022

A ararajuba, também conhecida como Guaruba, habita principalmente as florestas de terra firme na Amazônia do Maranhão e do Pará, com registros mais recentes no Mato Grosso e Rondônia (ICMBIO, 2018).

Figura 3: Distribuição geográfica de Ararajubas



Fonte: Livro vermelho das Aves – ICMBio (2018).

Classificada como vulnerável pela Lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (IUCN, 2018), e como vulnerável pelo Livro vermelho do ICMBio (ICMBIO, 2018), a Ararajuba possui populações situadas no “arco do desmatamento da Amazônia” e nos últimos anos a espécie perdeu pelo menos 35% da sua área de ocorrência (LARANJEIRAS; COHN-HAFT, 2009), e foram profundamente afetadas pela perda e descaracterização de seu hábitat (ICMBIO, 2018).

Além da fragmentação de seu ambiente as ararajubas sofrem com o comércio ilegal de aves, por conta de sua bela plumagem amarelo e verde, apesar de esta ameaça ter diminuído nos últimos anos, por conta das populações cativas legais (BIRDLIFE, 2022).

A Ararajuba é um psitacídeo de porte médio, medindo entre 34 e 36 centímetros de comprimento total. Possui coloração amarelo-dourada, com as penas de voo verdes (ICMBIO, 2018) e características corporais comuns aos psitacídeos (aves robustas com bico reforçado). São aves residentes e vivem em grupos familiares, que podem variar de 3 a 30 indivíduos. Os filhotes são facilmente identificados pela coloração esverdeada das penas, que acompanham os pais até o fim do primeiro ano (SINHORINI, 2013). Apresentam atitudes territoriais quando na presença de outras aves (ICMBIO, 2018).

Figura 4: Filhote de Ararajuba



Fonte: Valéria Barreira, O Liberal. (<https://liberal.com.br/cidades/americana/no-bercario-de-especies-ibis-e-ararajubas-sao-bons-exemplos-1088980/>). Acesso em 08/01/2022).

A dieta principal consiste em frutos inteiros, sementes, polpa, flores, broto, néctar e casca de Murici (*Byrsonima* spp) e Cróton (*Croton matourensis*) (SINHORINI, 2013).

O estado vulnerável de conservação da Ararajuba, a baixa quantidade de estudos genéticos de diversidade desta espécie, a necessidade dos esforços de conservação antes que seja tarde demais, e a importância desta espécie para a biodiversidade de aves do Brasil, são argumentos decisivos para a seleção da *Guaruba guarouba* como propósito de estudo deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolvimento de um protocolo para recebimento, manuseio e práticas de genética molecular com amostras de penas de Psitacídeos da espécie *Guaruba guarouba*, além da caracterização de cinco loci de microssatélites heterólogos para futuro trabalho de análise de parentesco e diversidade genética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desenvolver técnica de manuseio para extração de DNA de pena de indivíduos de Ararajuba;
- Testar a eficácia da extração de DNA de penas com e sem canhão, recebidas de indivíduos residentes de uma instituição zoológica no Brasil;
- Identificar iniciadores na literatura que possam ser utilizados para análise de diversidade e parentesco em Ararajuba;
- Testar a eficiência do uso de iniciadores heterólogos de espécies de outros psitacídeos filogeneticamente próximos;
- Testar a eficácia destes iniciadores em amplificar regiões no DNA de Ararajubas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de pena foram coletadas de 23 indivíduos de *Guaruba guarouba*, vindas de indivíduos atualmente mantidos em cativeiro, no BioParque, situado no estado do Rio de Janeiro, com projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), que regula e aprova o uso de animais em pesquisas (aprovação número 7372200818).

Tabela 1: Relação das informações dos indivíduos analisados neste trabalho

Número	Anilha	Informação adicional
1	963000000170266	4 penas maduras
2	RZ09216	4 penas maduras
3	963000000190966	1 canhão, 2 penas madura
4	RZ09335	2 penas maduras
5	963000000005104	3 penas maduras
6	RZ09214	4 penas maduras
7	2CRASMS163098905	4 penas maduras
8	RZ0928250986	3 penas maduras
9	PMA089	3 penas maduras
10	AGC670- 963000000245895	3 penas maduras

11	963008001218783	2 penas maduras
12	963000000251293	3 penas maduras
13	PMA088	3 penas maduras
14	PMA154	3 penas maduras
15	963007000039676	4 penas maduras
16	AMC08031	4 penas maduras
17	9630070000803837	3 penas maduras
18	9630070000803726	1 pena madura, 1 com canhão
19	RZ09275	3 penas maduras
20	RZ09276	3 penas maduras
21	RZ09274	2 penas maduras
22	CT9.50300	1 pena madura, 1 com tecido de canhão aparente (porém a pena era madura)
23	CT9.50289	2 penas maduras (aparência bem escura)

As amostras foram coletadas pelo veterinário presente na instituição, durante exames de rotina, levando em consideração as características físicas do animal (peso, altura, condição de saúde), através de contenção física do animal. Duas a quatro penas foram removidas do tórax, peito ou área lateral do animal, com cuidado para não machucar nem estressar o animal com contensão extrema.

Após a coleta, as penas de cada indivíduo foram embaladas, lacradas e identificadas com o número correspondente à anilha de cada indivíduo. Todas as amostras foram enviadas à Universidade Federal de Santa Catarina, aos cuidados dos colaboradores deste trabalho.

Figura 5: Embalagem contendo as penas lacradas e identificadas.



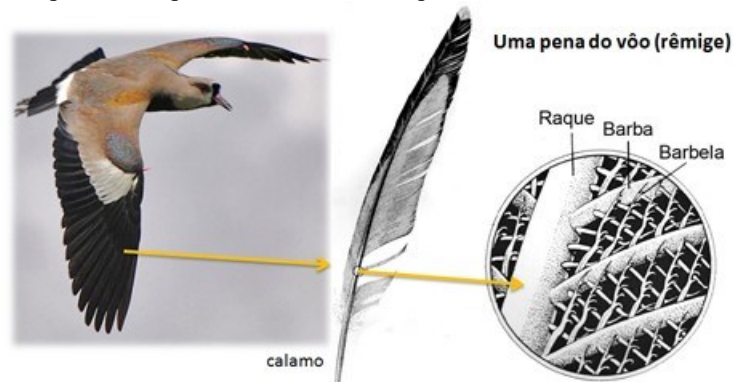
Fonte: Camila Hüpner (2021).

3.2 PROCESSAMENTO E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO

Uma ou duas penas foram selecionadas de cada indivíduo para extração de DNA. Para preparação do material para a extração, a pena selecionada é retirada com o auxílio de pinça esterilizada de sua embalagem e colocada em uma placa de Petri limpa, em bancada limpa (DE VOLO et al., 2008). Para a extração de DNA de penas, é preferível a utilização de penas em crescimento, que ainda possuem o canhão, estrutura presente na ponta da pena, na qual a pena é inserida na pele do animal. Os canhões estão presentes em penas ainda em crescimento e vascularizadas, permitindo que a pena se desenvolva sadiamente (SICK, 2001). Quando a pena

está madura, o canhão desaparece, deixando apenas o cálamo, que é a base da pena, que fica inserida no folículo até que essa pena caia.

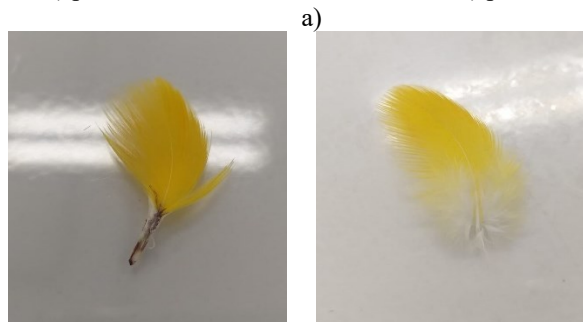
Figura 6: A pena é composta do cálamo, da raque e das barbas e barbelas.



Fonte: Museu Escola do Jardim Botânico (https://www2.ibb.unesp.br/Museu_Escola/Ensino_Fundamental/Animais_JD_Botanico/aves/aves_biologia_geral_penas.htm Acesso em: 02/01/2022).

Quando não existe canhão, existe a possibilidade de extração de DNA das células da polpa, presentes na parte interna da raque e do cálamo, de penas que não estão em crescimento, recém extraídas (TABERLET; BOUVET, 1991).

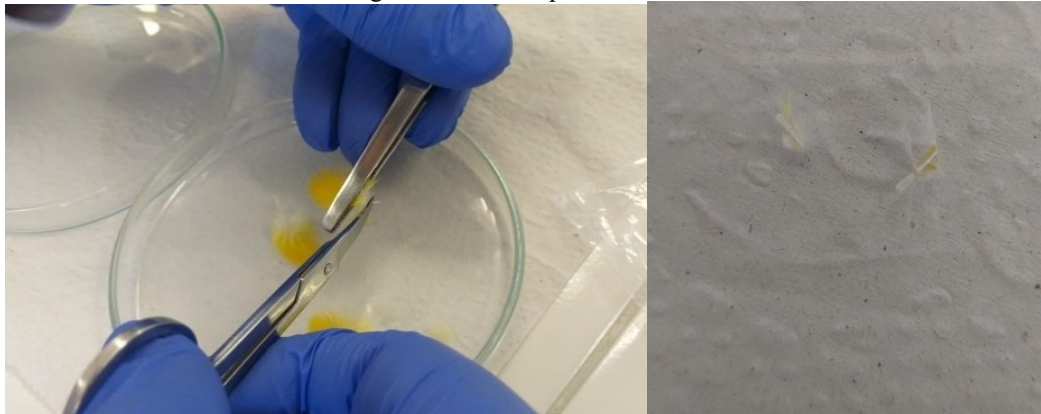
Figura 7: a) pena com canhão em crescimento e b) pena madura.



Fonte: Camila Hüpner (2021).

Após a seleção da pena, a mesma é firmada com pinça estéril e seu cálamo é cortado transversalmente, com ajuda de tesoura ou bisturi, aproximadamente 2mm de corte (figura 8).

Figura 8: Corte da pena



Fonte: Camila Hüpner (2021).

O material é então depositado em tubo eppendorf, individualmente identificado, e o restante da pena é armazenado para possível reutilização.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada através do método descrito por Aljanabi e Martinez (1997), com modificações realizadas pelos membros do grupo de estudos de Genética de Populações Forense da Universidade Federal de Santa Catarina.

O protocolo original está descrito abaixo e encontra-se, por etapas, no Apêndice A, e as modificações realizadas levaram em consideração o espaço e equipamentos disponíveis no LAPOGE, de forma a realizar o protocolo todo dentro do laboratório, e otimizar o tempo/espaço, além de levar em consideração o tipo de amostra utilizada.

Inicialmente seleciona-se um fragmento da pena da ave selecionada, e adiciona-se a um microtubo (1,5 mL), individual e identificado. Em seguida adicionamos 400 μ L de solução tampão de lise pH 8,0 (NaCl 0,4M/L, TRIS-HCl 10 mM/L e EDTA 2 mM/L), 60 μ L de SDS 10% e 12 μ L de Proteínase K (20 mg/mL).

Agitamos levemente a amostra e deixamos incubar por no mínimo 3 h, e no máximo 12 h (de acordo com o tamanho do fragmento), a 55 °C em banho-maria.

Em seguida foi adicionado 300 μ L de NaCl 6M, e agitou-se em vórtex por 30seg em velocidade máxima. Centrifuga-se por 30min a 13000RPM em microcentrífuga.

Foram preparados novos microtubos (1,5 ml) identificados, e transferiu-se o sobrenadante de cada amostra para os novos microtubos (sugestão de 400 μ L). Adiciona-se ao

sobrenadante o mesmo volume de isopropanol gelado, agita-se cuidadosamente o microtubo, e a amostra vai para armazenamento em freezer -20 °C por 12 horas.

Centrifuga-se novamente, por 10 min a 11000 RPM, adiciona-se 300 µL de etanol 70% gelado, seguido de mais uma centrifugação de 10 min a 11000 RPM, verte-se o sobrenadante, adiciona-se 300 µL de etanol 100%, e por último outra centrifugação de 10 min a 11000RPM.

Verte-se novamente o sobrenadante e preserva-se o pellet para secar em temperatura ambiente. Depois de seco adicionar 40 µL de água MiliQ e 10 µL de RNase (100 ng/mL).

Por último deixar no banho-maria a 34 °C por 1 h, e depois eluir na bancada por 4 h. Proceder ao armazenamento em freezer -20 °C.

A primeira modificação foi o aumento da quantidade de Proteinase K adicionada no passo 4 do protocolo, que foi aumentada de 8 µL para 12 µL, com o objetivo de diminuir a contaminação da amostra final de DNA com proteínas.

No passo 17, após verter o sobrenadante, deixar descansar as amostras na bancada em temperatura ambiente, de cabeça para baixo com a tampa aberta no papel toalha. Este procedimento também é realizado em outros protocolos do LAPOGE, e somente deixar a amostra com as tampas abertas na bancada demorava demais para evaporar todo o restante de álcool, mesmo após verter a amostra.

No passo 19 é necessário o descanso das amostras em estufa a 37°C por duas horas, entretanto o LAPOGE não possui estufa em funcionamento no momento, e no período de pandemia nem sempre existem pessoas nos laboratórios próximos para o empréstimo de estufa (além de várias estufas serem específicas para crescimento de células, incubação de ovos, etc). Portanto este passo foi substituído por banho-maria, com temperatura entre 32 – 35 °C (levando em consideração a variação natural do banho-maria), por uma hora.

Após a realização da extração, as amostras foram quantificadas em aparelho de espectrofotometria UV-Vis Nanovue™ Plus.

3.4 PCR E ELETROFORESE

Os protocolos de PCR foram realizados em termociclador ThermoFisher Scientific 2720, disponibilizado pelo no Laboratório de Genética Evolutiva (LAGEV), de acordo com os protocolos sugeridos pelo kit de DNA polimerase 5X FIREPol Master Mix da marca Solis

BioDyne utilizada nas reações de PCR, com temperaturas de anelamento de acordo com os *iniciadores* utilizados e disponíveis na tabela 2.

O protocolo consiste de desnaturação inicial com temperatura de 95 °C por 2 min, a etapa de ciclos segue o protocolo de desnaturação de 95 °C por 30 s, anelamento de temperatura (t) para cada *primer* por 30 s, extensão de 72 °C por 30 s, sendo o total de 35 ciclos, além de uma etapa de extensão final de 72 °C por 2 min, e hold contínuo de 4°C.

A visualização dos resultados das PCR foi realizada através de eletroforese com gel de agarose 3% (Agarose + TBE 1X), com fonte e cuba BioRad. O protocolo utilizado consiste de aplicação de corrente de 80 V, 300 mA, por 45 minutos. Foi utilizado marcador de peso molecular de 50 e 100 pares de bases para identificação dos fragmentos amplificados.

3.5 SELEÇÃO DOS INICIADORES

A utilização de iniciadores heterólogos para este trabalho foi escolhida principalmente por não haver tempo hábil para estudo¹ e desenvolvimento de novos loci espécie-específicos, e por não haver até a data deste trabalho, iniciadores específicos para Ararajubas. Além disso, atualmente, não há aporte financeiro para a produção de vários iniciadores para teste, necessários durante o desenvolvimento de novos iniciadores.

Portanto, selecionamos nossos iniciadores de outras espécies de psitacídeos, filogeneticamente próximas de *Guaruba guarouba*, para aumento da probabilidade de amplificação heteróloga, devido ao fato de psitacídeos possuírem diversas regiões de hipervariabilidade conservadas entre si.

A busca e seleção dos artigos que continham primers descritos para outras espécies de psitacídeos utilizou as principais base de dados científicos como fonte de pesquisa (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://www.scielo.br/> e <https://scholar.google.com.br/>) e, teve com palavras-chave de busca “Microsatellite primer”, “psittacidae”, “microsatellite marker”, “genetic structure” e “population analysis”.

As informações de cada *primer* seguem na tabela 1:

¹ em caráter excepcional e transitório, pela substituição de atividades presenciais, enquanto durar a pandemia do novo coronavírus – COVID-19, em atenção à Portaria MEC 544, de 16 de junho de 2020 e Boletim Oficial UFSC nº 121.2020 de 9 de novembro de 2020 (Nº 379/2020/GR)

Tabela 2: Informações dos Iniciadores: locus selecionados, sequências de nucleotídeos, temperatura de anelamento, tamanho do fragmento esperado e referência bibliográfica.

LOCUS	SEQUÊNCIAS	T(a)	FRAGMENTO	REFERÊNCIA
UnaCT43	F:TCATCCTATCACCAGAAGGG R:CTTGAGGACAGTGCAGAGGG	60°C	199-219pb	CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, (2003)
UnaCT74	F:CTGGACTGCTGCTCTTAACA R:AGCCTGAAGTGAAGTGCATG	53°C	232-260pb	CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, (2003)
Achl13	F:ACTAGAAACCGATCACTG R:CTAAATAATCTGTTATCAG	45,1°C	130pb	MARTINS, J.M., (2007)
Achl14	F:GCAGACTTCTTTCTGTTC R:ATTTCCAAGTTACACTCTTC	53°C	318pb	MARTINS, J.M.,(2007)
HYA1172	F:GATCCTTTGCTTAAGACAGATGTC R:GAGTGAAATACACATTCAGCTTCTG	52°C	250pb	FARIA; MIYAKI, (2006)

Os critérios de avaliação se basearam em espécies filogeneticamente próximas da ararajuba, de acordo com os mapas filogenéticos dos psitacídeos (PROVOST; JOSEPH; SMITH, 2017; TAVARES; YAMASHITA; MIYAKI, 2004; URANTÓWKA; STRZAŁA; MACKIEWICZ, 2017; WRIGHT et al., 2008). Outro critério importante foi a seleção de marcadores de espécies próximas, que já haviam sido testados para amplificação heteróloga em outras espécies.

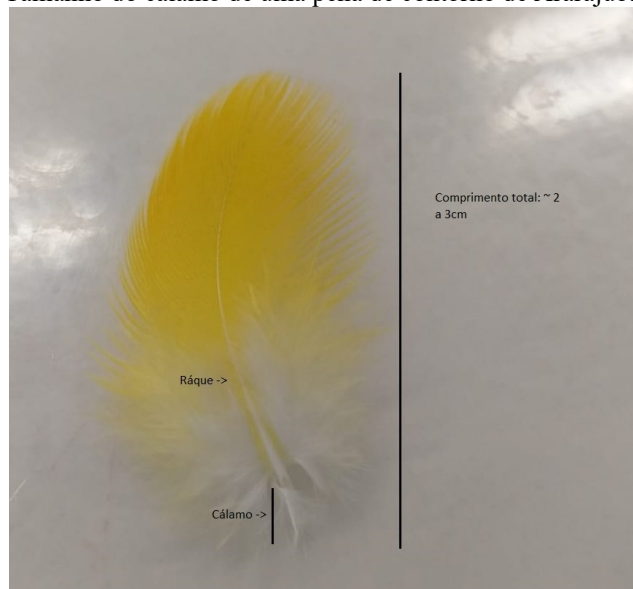
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

As extrações de DNA foram realizadas com intuito de purificar o DNA presente em possíveis células da epiderme aderidas à parte externa do cálamo (DE VOLO et al., 2008) de penas maduras, ou ainda de um pequeno coágulo sanguíneo encontrado geralmente na base da raque, e que se forma porque ao final do desenvolvimento da pena, a polpa mesenquimal, que contém uma única artéria axial, é reabsorvida do cálamo, e somente os bulbos de queratina sobram (HORVÁTH et al., 2005). Para penas em crescimento, o tecido presente no bulbo contém células sanguíneas das artérias que suprem o crescimento das penas (HORVÁTH et al., 2005), este tecido é chamado de canhão ou a pena em crescimento de pena-canhão.

Alguns autores como Bello et al., (2001) e De Volo (2008) sugerem a utilização de fragmentos de cálamo em tamanhos entre 0,3 e 1cm de comprimento, para extração de maior quantidade de amostra, entretanto as penas recebidas para este trabalho não eram remiges ou retrizes, que são as penas de voo e da cauda (SICK, 2001), geralmente maiores e mais firmes mas sim penas de contorno, que possuem tamanho bem menor (Figura 9), quando comparada às anteriores, e portanto, com cálamo muito menor, não passando de 2mm de comprimento total.

Figura 9: Tamanho do cálamo de uma pena de contorno de Ararajuba



Fonte: Camila Hüpner (2021).

A primeira extração, com apenas o cálcio de uma pena foi realizada em um dia que houve queda de energia durante a tarde, e as amostras estavam em período de incubação a 55°C no banho-maria. Havia passado pouco mais de uma hora de incubação e a energia caiu, e somente retornou no final da tarde, deixando as amostras dentro do banho-maria frio por 4 horas. Assim que a luz retornou as amostras foram deixadas mais três horas em incubação, e seguimos o protocolo normalmente, até o dia seguinte, que novamente, no período de incubação a 32-34°C caiu a luz, e as amostras permaneceram em espera por mais 2 horas, até que retornasse a luz.

Essas amostras foram utilizadas para teste de PCR com todos os iniciadores, porém somente as amostras 3 e 18, que possuíam canhão, amplificaram fragmentos bem visíveis em eletroforese com gel de agarose 3%, em todos os iniciadores.

Figura 10 a e b: Imagem de transiluminador dos produtos amplificados pelo *Primer* UnaCT43, de todas as amostras de ararajuba da primeira extração de DNA. Percebe-se que somente as amostras 3, 9 e 18 amplificaram fragmentos visíveis e identificáveis. As amostras 3 e 18 são as que possuíam canhão, as demais, não possuíam. A escala de peso molecular utilizada foi a de 50 pares de base.



Fonte: Camila Hüpner (2021).

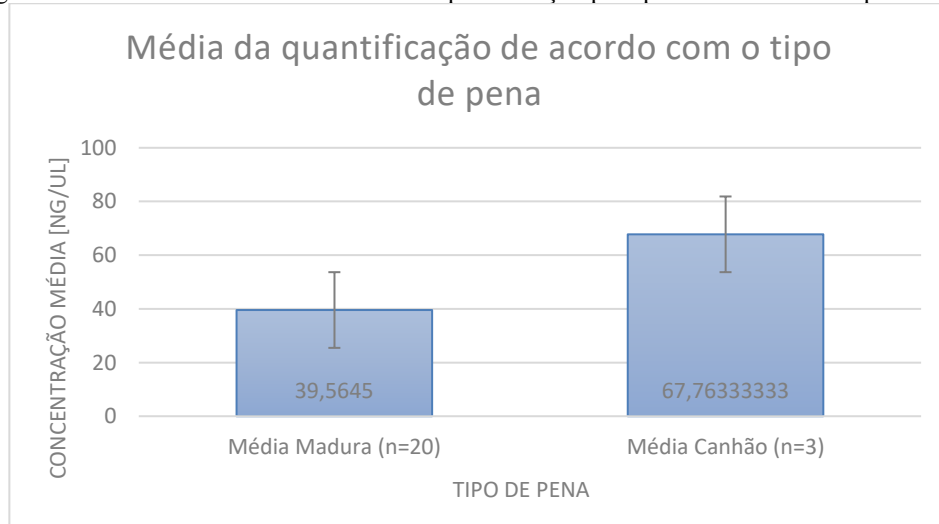
Considerando que esta primeira extração havia sido prejudicada por questões além do controle, e sabendo que os resultados dos outros 4 iniciadores foram os mesmos, decidiu-se recomeçar os protocolos de extração.

Reiniciou-se as extrações de DNA, e agora foram testadas diferentes configurações para os testes com as penas. Como não havia penas suficientes para todas as amostras terem a mesma quantidade de calamos, para as amostras que tinham 4 penas, adicionamos 2 cálamos inteiros e não utilizados anteriormente para essa nova extração. Para as amostras que possuíam 3 penas, adicionamos 1 cálamo novo, e um fragmento do cálamo/ráque da pena já utilizada anteriormente. Para as amostras que só possuem 2 penas, utilizamos apenas 1 cálamo novo. E as amostras que possuíam canhão, utilizamos apenas um pedaço do canhão.

Para essa nova extração, não houve problemas elétricos e o protocolo ocorreu de forma regular.

Foi realizada quantificação das amostras da segunda extração (Apêndice B), e os valores das concentrações de DNA variaram para cada amostra. Para garantia de valores, a medição foi feita 3 vezes para cada amostra.

Figura 11: Gráfico da média dos valores de quantificação para penas com canhão e penas maduras.



Fonte: Camila Hüpner (2021).

Os valores observados na quantificação de DNA indicam uma influência significativa do tipo de pena e dos valores de concentração de DNA obtidos durante a extração, que corrobora os resultados obtidos por DE VOLO et al., (2008), que também obtiveram diferenças entre as quantidades de DNA extraídos de diferentes tipos de pena, onde penas de contorno produziram

menos DNA que penas de voo ou penas da cauda. JENSEN; PERNASETTI; DURRANT (2003) analisaram a quantidade de DNA extraída de diferentes origens, sangue, cascas de ovos e penas, e reconheceram que a quantidade de e a qualidade do DNA extraído de penas é menor quando comparado a outras fontes de DNA dupla fita em pássaros.

Geralmente a quantidade ideal de células necessárias para análises moleculares é obtida de 3 a 5 penas recém-retiradas, entretanto essa quantidade pode variar de acordo com o tamanho das penas (CERIT; AVANUS, 2007; MALAGÓ et al., 2002). Isso pode significar que a quantidade de material disponível para que obtivéssemos DNA em quantidade ideal para PCR não foi suficiente.

O DNA presente nas penas está somente na ponta. Podemos encontrar células velhas conectadas na parte exterior do cálamo da pena, ou restos de células sanguíneas remanescentes de quando a pena estava em crescimento (HONKATUKIA et al., 2003). Isso significa que coletar penas recém retiradas da ave é uma forma efetiva de assegurar uma quantidade adequada de células de tecido necessárias para a realização dessas análises(CERIT; AVANUS, 2007; MALAGÓ et al., 2002). Neste estudo, as penas foram coletas em Janeiro de 2021, armazenadas a seco em freezer -20°C e somente extraídas em Novembro de 2021, 10 meses depois.

Um dos motivos pelos quais as amostras de penas maduras sem canhão terem falhado poderia se dar pelo fato de que as amostras ficaram tempo demais em armazenamento, sem tratamento adequado.

Alguns autores, como TABERLET e BOUVET (1991), sugerem que após a coleta das penas, o ideal é armazená-las em tudo estéril com etanol 70%, e que então podem ficar armazenadas por muitos meses em geladeira antes do protocolo de extração. DE VOLO et al., (2008) não armazenou a pena em etanol, mas sim em envelopes individuais, em um depósito escuro, seco e com temperatura controlada. Entretanto ao iniciar o protocolo também embebeu a amostra em etanol 70%, e separou por completo a ponta do cálamo do resto da pena.

Como as penas são muito pequenas, a quantidade de células epidérmicas presentes na parte exterior do cálamo ou ainda na polpa interna é muito pouca, e isso pode ter ocasionado degradação do material. LEETON; CHRISTIDIS e WESTERMAN (1993) extraíram DNA de uma pena de voo de um indivíduo de 100 anos de idade de Papagaio-da-noite (*Geopsittacus occidentalis*), para estudos filogenéticos. A amostra foi retirada de uma ave com preparação para exposição no museu, um fragmento de 2-5mm da raque foi separado, juntamente com a ponta do cálamo, lavado diversas vezes com etanol 70% e depois com água destilada. Neste

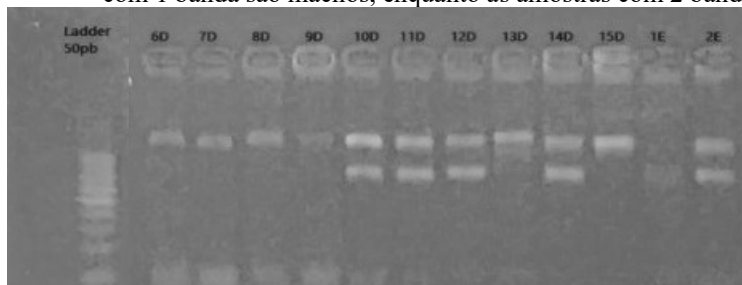
caso os protocolos de PCR funcionaram, demonstrando que possa haver outros fatores envolvidos na falha das extrações.

Por outro lado, as penas com canhão possuem tecido e sangue, aumentando consideravelmente a quantidade de cópias de material genético disponível para extração.

O mesmo protocolo de extração foi testado com sangue de aves da espécie *Turdus amaurochalinus*, conhecido popularmente como sabiá-poca, pertencentes a outro projeto deste grupo de pesquisa, gentilmente cedidas pela Professora Dra. Andrea Rita Marrero e pela aluna responsável Ariane Ferreira, para confirmação do funcionamento do protocolo. Além de também testarmos com penas de outras aves armazenadas em álcool absoluto.

As extrações com sangue de Sabiá-poca foram testadas para os Iniciadores P2 e P8 (GRIFFITHS et al., 1998), utilizados para a amplificação de dois genes CHD-Z e CHD-W, que permitem a identificação sexual das aves. Fêmeas amplificam duas bandas, enquanto machos amplificam uma banda apenas (Figura 12).

Figura 12: Identificação dos genes CHD-Z e CHD-W em indivíduos de *Turdus amaurochalinus*, com extração de DNA através do método da Proteinase K, para avaliação do método em outras fontes de amostra. As amostras com 1 banda são machos, enquanto as amostras com 2 bandas são fêmeas.



Fonte: Ariane Ferreira (2021).

4.2 SELEÇÃO DE INICIADORES HETERÓLOGOS PARA ESTUDOS DE VARIABILIDADE

Os iniciadores selecionados levam em consideração a possibilidade de amplificação cruzada entre regiões microssatélites compartilhadas entre a família Psittacidae.

Poucos marcadores microssatélites foram desenvolvidos para as muitas espécies de papagaios pertencentes aos psitacídeos (PRESTI et al., 2011).

A grande maioria se concentra em espécies altamente conhecidas, ou altamente ameaçadas de extinção (CAPARROZ et al., 2007; CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, 2003; DA

SILVA et al., 2015; GEBHARDT; WAITS, 2008; JAN; FUMAGALLI, 2016; LEITE et al., 2008; LIMA-REZENDE et al., 2019; PRESTI et al., 2011; PRESTI; WASKO, 2014). Isso significa que espécies menos conhecidas não possuem a quantidade ideal de marcadores, ou não possuem nenhum marcador específico.

Até a finalização deste trabalho, não havia nenhum marcador microsatélite específico para *Guaruba guarouba*, e como atualmente o incentivo a pesquisa é baixo e os materiais possuem valores altos, ficamos impossibilitados de nos envolver no desenvolvimento de novos iniciadores espécie-específicos para ararajuba.

Os iniciadores selecionados e testados neste trabalho foram escolhidos de forma que o pouco orçamento que havia disponível fosse suficiente para testar iniciadores com altas chances de amplificação.

Para isso foi realizada uma busca nas principais bibliotecas online, e os critérios mais importantes considerados foram iniciadores para psitacídeos, que já tivessem sido testados em outras espécies, e que fossem próximos filogeneticamente das ararajubas.

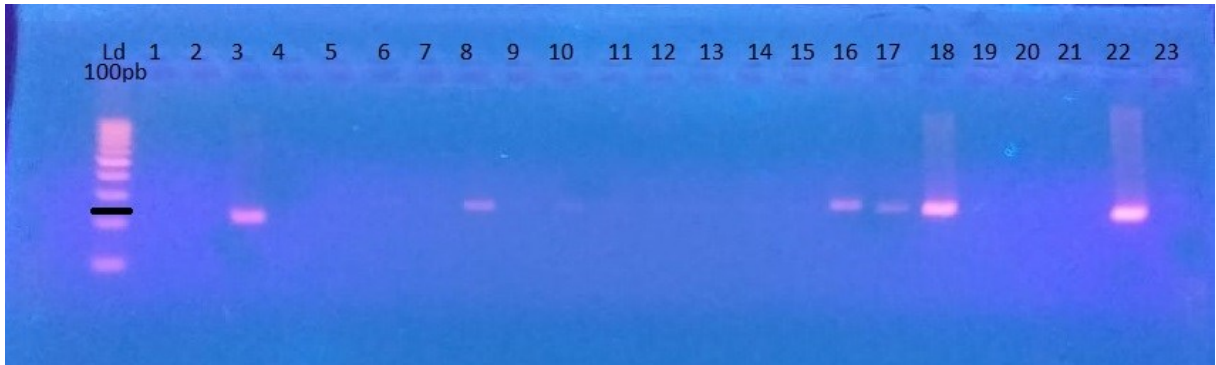
Os iniciadores selecionados e testados são aqueles descritos na tabela 2 deste trabalho, e além desses, outros iniciadores já foram selecionados para fazerem parte de um conjunto de 11 marcadores, que caso sejam polimórficos, auxiliarão na criação de um perfil genético capaz de identificar parentesco e analisar a variabilidade de indivíduos de ararajuba.

Os iniciadores complementares são AgGT12, AgGT21 e AgGT08, descritos para *Amazona guildingii*, o papagaio-de-São-Vicente (RUSSELLO et al., 2001), MAC436, descrito para *Anodorhynchus hyacinthinus*, a Arara Azul (FARIA; MIYAKI, 2006) e UnaCT32, descrito para *Ara ararauna*, a Arara-canindé (CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, 2003).

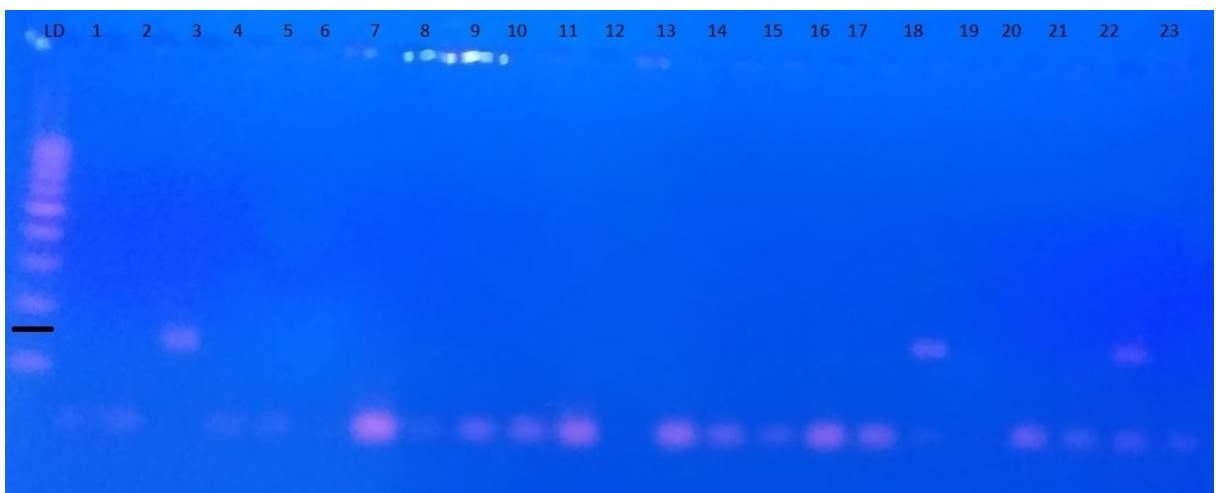
CAPARROZ; MIYAKI e BAKER, (2003) desenvolveram 6 pares de iniciadores para a Arara-canindé, e testaram a heterologia em outras espécies de psitacídeos. As espécies do gênero *Ara* pertencem ao grupo de pequenos papagaios, junto das Ararajubas (Figura 13) (TAVARES et al., 2006; URANTÓWKA; STRZAŁA; MACKIEWICZ, 2017).

Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos das PCR dos iniciadores analisados. a) UnaCT43, b) Ach113, c) Ach114, d) HYA1172 e e) UnaCT74

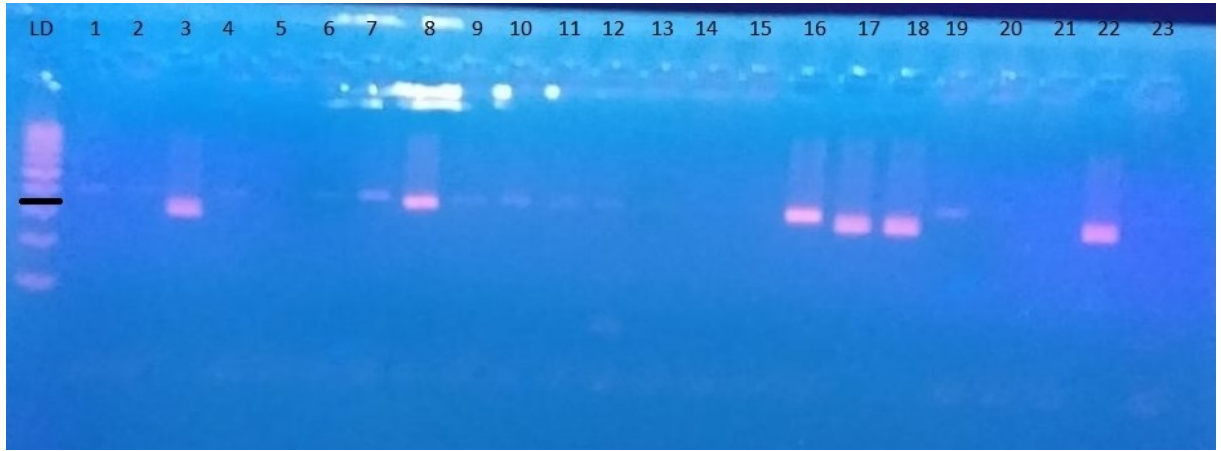
a)



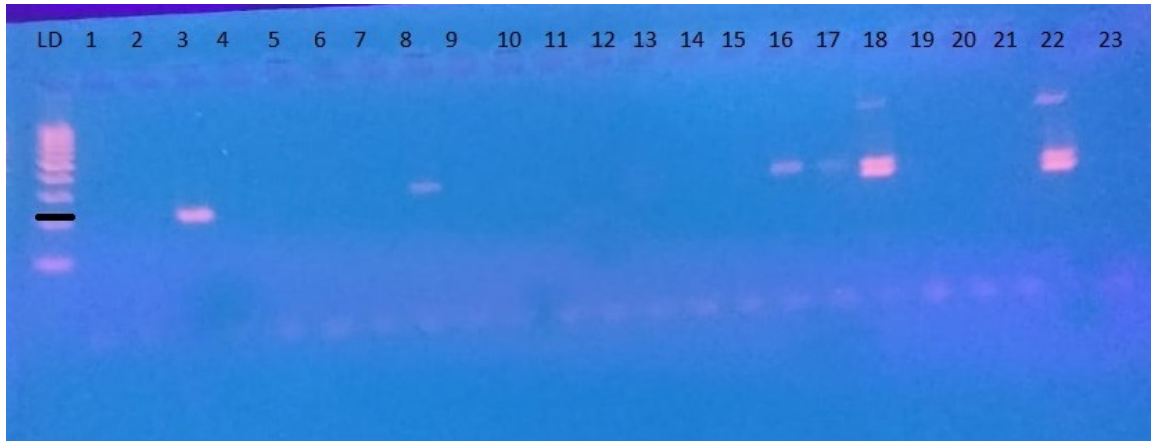
b)



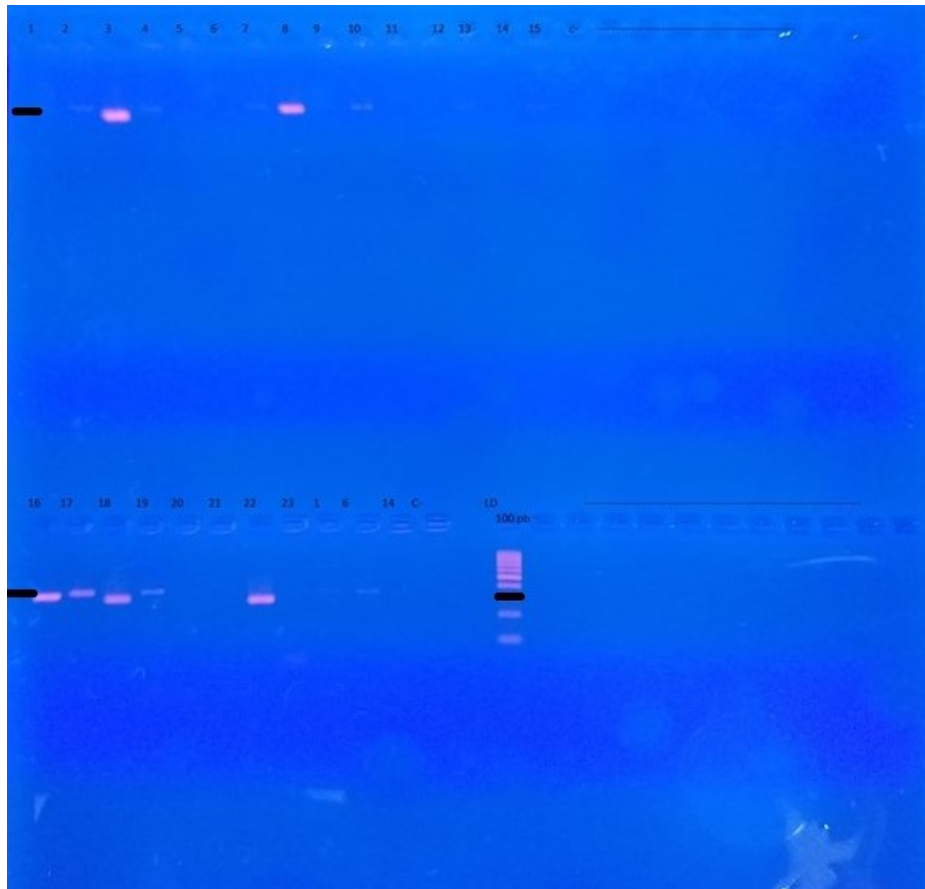
c)



d)



e)



Fonte: Camila Hüpner (2021).

Podemos observar que, de forma geral, as penas que possuíam canhão produziram produtos de PCR mais visíveis e identificáveis que as penas maduras, sem canhão.

Na figura 14.a, temos o resultado da amplificação dos iniciadores UnaCT43, que amplificou em 6 indivíduos com produtos de PCR visíveis. As amostras 3, 18 e 22 foram as que tiveram melhor resultado, possivelmente por conta do canhão presente nas penas no momento da extração. As amostras 8, 16 e 17 também amplificaram fragmentos visíveis, porém menos claros que as amostras anteriores. As outras amostras não amplificaram fragmentos visíveis para o *primer* UnaCT43. Não é possível identificar polimorfismos apenas observando o gel de agarose. Para próximos estudos géis de poliacrilamida, que permitem concentrações maiores e separação de fragmentos de tamanho menor podem ser uma ótima alternativa para a identificação de polimorfismos sem a necessidade de sequenciamento imediato.

O loci de UnaCT43 é polimórfico para Arara-canindé, com 9 alelos diferentes neste loci (CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, 2003). Para PRESTI et al., (2011), que também

analisaram este marcador em espécies de Araras, este loci foi polimórfico, com número de alelos variando entre 3 e 7.

Na figura 14.b, observamos os produtos das PCR realizadas com o microssatélite Ach13, que amplificou apenas 3 amostras, 3, 18 e 22. Todas elas são de indivíduos com penas com canhão. Nenhuma amostra de pena madura amplificou este fragmento. Além disso, não é possível identificar polimorfismos para este loci.

O microssatélite Ach13, desenvolvido para *Ara chloropterus*, possui 15 alelos diferentes para esta espécie, e também amplificou com sucesso em outras 9 espécies de psitacídeos (MARTINS, 2007).

Na figura 14.c, temos os produtos amplificados com PCR do microssatélite Ach14, que obteve os melhores resultados. As amostras 3, 8, 16, 17, 18, e 22 obtiveram fragmentos grandes e visíveis, enquanto as amostras 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12 e 19 obtiveram fragmentos menos visíveis, porém identificáveis. É possível perceber a presença de polimorfismo neste loci, e se assumirmos a interpretação visual de cada alelo, podemos identificar no mínimo 2 alelos diferentes. A frequência alélica foi observada para este loci, assumindo 2 alelos diferentes, pelo método da contagem direta, ou seja, número de vezes que o alelo é observado, dividido pelo número total de alelos averiguados para o marcador.

Se damos nome de Alelo 1 para o alelo mais observado e Alelo 2 para o com frequência menos observada, os valores de $A_1 = 0,687$, e $A_2 = 0,25$.

O microssatélite Ach14 é polimórfico para Arara-vermelha (*Ara chloropterus*), com 15 alelos diferentes observados. Segundo MARTINS (2007), este marcador também amplificou com sucesso em outras 9 espécies de psitacídeos, porém não há informações de caracterização de polimorfismos para outras espécies.

A Figura 14.d demonstra os produtos de PCR do microssatélite HYA1172, com amplificação das amostras 3, 8, 16, 17, 18 e 22.

É possível observar polimorfismo, com indivíduos homocigotos e heterocigotos. O indivíduo 3 é homocigoto para um alelo, os indivíduos 8, 16 e 17 são homocigotos para outro alelo, e os indivíduos 18 e 22 são heterocigotos.

O alelo 1, possui frequência alélica de 0,666 e o alelo 2 possui frequência alélica de 0,333.

Este marcador, segundo FARIA; MIYAKI, (2006), é um loci polimórfico com 2 alelos distintos tanto para a Arara-azul, quanto para a Arara-vermelha e Arara-canindé. Também em (PRESTI et al., 2011), este loci foi testado, porém o número de alelos variou, de 1 alelo apenas na Arararinha-azul, e conflitando com os resultados obtidos por Faria e Miyaki (2006), 3 alelos distintos para a Arara-azul.

Os resultados obtidos neste trabalho para o marcador HYA1172, apesar de não haver conseguido amplificar todas as amostras disponíveis, parecem estar de acordo com os resultados de outros trabalhos.

É importante que se mencione que a identificação visual apenas dos polimorfismos identificados nas eletroforeses resultantes das PCR é um mecanismo incerto e que para que aconteça uma identificação completa e correta da existência ou não de polimorfismos em marcadores microssatélites é necessário que os produtos amplificados por reações de PCR sejam preferencialmente analisados em Sequenciadores, ou por eletroforese de capilaridade (SELKOE; TOONEN, 2006).

Entretanto esses processos são custosos, e como o Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia estava com o sequenciador desativado, não houve orçamento suficiente para o sequenciamento em empresa privada destes resultados.

Finalmente, a figura 14.e possui os produtos amplificados do marcador UnaCT74, divididos em um gel de 2 camadas.

Os fragmentos amplificados correspondem às amostras 3, 8, 16, 17, 18, 19 e 23. As amostras 2, 4, 10 e 6 (na fileira de baixo) parecem ter amplificado fragmentos também, porém a visualização é bem fraca. Podemos inferir pela visualização da eletroforese que existem no mínimo 2 alelos diferentes para este marcador.

Segundo (CAPARROZ; MIYAKI; BAKER, 2003), para Arara-canindé, este loci possui 5 alelos diferentes e também amplificou fragmentos em 3 outras espécies de psitacídeos.

PRESTI e WASKO (2014), revisaram trabalhos que utilizaram microssatélites para análises de diversidade genética e parentesco para estudo de Psitacídeos, e constataram que até então, somente 29 espécies desta família possuem algum tipo de trabalho relacionado ao tema. 20 destas espécies possuem trabalhos com iniciadores heterólogos. Se levarmos em consideração que existem aproximadamente 374 espécies de psitacídeos, existe um grande vazio de trabalhos de análises genéticas destas aves.

De 2014 a 2022 não houve muita mudança neste quadro. Alguns artigos mais recentes foram publicados, como o estudo da diversidade genética de Papagaios-eclétus *Ecléctus roratus*

(ASTUTI, 2020), ou ainda a caracterização de marcadores microssatélites para 7 diferentes espécies de papagaios da família Psittacidae, ameaçados de extinção (JAN; FUMAGALLI, 2016).

Reconhecer a diversidade genética e a situação das populações de espécies ameaçadas é um passo importantíssimo para o melhoramento dos programas de manejo de espécies, tanto *in situ* quanto *ex situ* (FRANKHAM, 2010).

4.4 PROTOCOLO DE RECEBIMENTO, TRIAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA DE PENA

O protocolo de triagem de penas de aves encontra-se no Apêndice C deste trabalho, e foi preparado para auxiliar os alunos do LAPOGE no manuseio e cuidado com amostras de penas recebidas de instituições parceiras, para extração de DNA.

O uso de técnicas menos invasivas para extração de material genético de populações naturais, sejam elas de vida livre ou cativas, teve grande aumento nas últimas décadas, especialmente com o avanço das técnicas moleculares (DE VOLO et al., 2008).

DNA já foi extraído de tecido e sangue de mamíferos (KLEINMAN-RUIZ et al., 2019), de fezes (CARROLL et al., 2018), de pelos (KITPIPIT et al., 2014), e até de cascas de ovos (SHAMBLIN et al., 2011). Obter material de qualidade, que seja útil para os mais diversos protocolos moleculares é essencial, e o cuidado com este material inicia-se no recebimento e/ou coleta deste material.

Portanto, descrever um protocolo que possa ser replicado com eficácia a cada nova extração é essencial para manter o padrão de qualidade dentro e fora do laboratório.

5 CONCLUSÃO

Concluimos com este trabalho que a utilização do método de extração de DNA de Aljanabi e Martinez (1997) é funcional para a extração de DNA de penas de Ararajuba (*Guaruba guarouba*), e seus produtos são satisfatórios para a realização de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase.

A extração produz melhores resultados quando as penas possuem material genético proveniente de células presentes no canhão, e penas já maduras, armazenadas em freezer -20°C, sem álcool 70°, podem não possuir material genético suficiente.

Quando a extração produz resultados positivos, os protocolos de PCR com Iniciadores de microssatélite resultam em produtos visíveis e claros em eletroforese.

Os iniciadores Achl 13, Achl 14, Una 74, Una 43 e Hya1172 produziram resultados visíveis, e parecem ser funcionais em *Guaruba guarouba*.

Para trabalhos futuros, sugere-se a seleção mais específica de penas em crescimento, ou a utilização de sangue para a extração, e também a realização de sequenciamento genético para análise dos loci dos iniciadores selecionados, para identificação de polimorfismos e análise de variabilidade e parentesco.

REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. **Genetics Research International**, v. 2014, p. 1–11, 7 abr. 2014.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. **Blackwell Publishing**, 2007.

ASSOCIAÇÃO MUNDIAL DE ZOOS E AQUÁRIOS. **Building a future for wildlife : the world zoo and aquarium conservation strategy**. [s.l.] World Zoo and Aquarium Association, 2005.

ASTUTI, D. Genetic diversity of Indonesian protected eclectus parrot (*Eclectus roratus*) based on mitochondrial gene sequences. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 591, n. 1, 9 nov. 2020.

BARATA, A. M. et al. **Plantas Aromáticas**. Oeiras, Portugal: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, 2018.

BELLO, N.; FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, A. **Isolation of genomic DNA from feathers** **Brief Communications J Vet Diagn Invest**. [s.l: s.n.].

BIRDLIFE INTERNACIONAL (2022) **Species factsheet: Guaruba guarouba**. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 08/01/2022.

CAPARROZ, R.; LEITE, K; CHINALIA, L.; MIYAKI, C.; COLLEVATTI, R. Characterization of microsatellite in three species of *Amazona* (Psittaciformes) using heterologous iniciadores. **Ornitologia Neotropical**. v 18: p 439- p 444. 2007.

CAPARROZ, R.; MIYAKI, C. Y.; BAKER, A. J. Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 3, p. 441–443, set. 2003.

CARR, N.; COHEN, S. The public face of zoos: Images of entertainment, education and conservation. **Anthrozoos**, v. 24, n. 2, p. 175–189, jun. 2011.

CARROLL, E. L. et al. Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 7, p. 1094–1119, 1 ago. 2018.

CERIT, H.; AVANUS, K. Sex identification in avian species using DNA typing methods. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, n. 1, p. 91–99, mar. 2007.

DA SILVA, H. E. et al. Development of microsatellite markers for Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) and their cross-amplification in other parrot species Genetics. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2015.

DE CASTRO, P. L. et al. Amplificação cruzada de marcadores microssatélites heterólogos em Piracanjuba. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 12, 1 dez. 2017.

DE VOLO, S. B. et al. An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers. **Condor**, v. 110, n. 4, p. 762–766, 2008.

FAN, H. et al. **Conservation genetics and genomics of threatened vertebrates in China** *Journal of Genetics and Genomics* Institute of Genetics and Developmental Biology, , 20 nov. 2018.

FARIA, P. J.; MIYAKI, C. Y. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae (Psittaciformes, Aves). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 231–240, 2006.

FENSTER, C. B. et al. Conservation and genetics. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 91, n. 4, p. 491–501, 2018.

FIENIEG, E.; GALBUSERA, P. The use and integration of molecular DNA information in conservation breeding programmes: a review. **Journal of Zoo and Aquarium Research**, v. 1, n. 2, p. 44–51, 2013.

FRANCISCO, M.; FÁBIO SILVEIRA, L.; PIRATELLI, A. J. **Conservação da Biodiversidade - Dos conceitos às ações - Capítulo 5 Conservação Animal Ex Situ**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/273379070>>.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 29, n. May, p. 305–327, 1995.

FRANKHAM, Richard; BALLOU, Jonathan D.; BRISCOE, David A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge University Press, 2004.

FRANKHAM, R. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 661–663, 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics, Second edition**. 1942p. 2010.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A. ; DAVID A.; BALLOU, J. D. ; JONATHAN D. **Introduction to conservation genetics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2002.

GEBHARDT, K. J.; WAITS, L. P. Cross-species amplification and optimization of microsatellite markers for use in six Neotropical parrots. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 4, p. 835–839, jul. 2008.

GOODWIN, W.; LINACRE, A.; HADI, S. **An Introduction to Forensic Genetics**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011. v. 2

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

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: Where are we now? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 629–636, 2001.

HOLTORF, C. Zoos as heritage: An archaeological perspective. **International Journal of Heritage Studies**, v. 14, n. 1, p. 3–9, jan. 2008.

HONKATUKIA, M., KULMALA, J. and SÖDERBACK, P. Isolation of genomic DNA from Chicken feathers using QuickPick™ gDNA kit. Technical Note TN51000-009. **Bio-Nobile Oy** pp 1-2, 2003.

HORVÁTH, M. B. et al. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. **Journal of Avian Biology - Communications**, v. 36, p. 84–88, 2005.

ICMBIO, I. C. M. DE C. DA B. Livro Vermelho - Aves. **Livro**, v. III, p. 1102, 2018.

ICMBIO; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Sumário Executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação das Aves da Amazônia**. 2016.

IUCN. BirdLife International. Guaruba guarouba. **The IUCN Red List of Threatened Species** **2018**: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22724703A132029835.en>, 2018. Accessed on 08 January 2022.

IUCN/SSC. IUCN Species Survival Commission Guidelines on the Use of Ex Situ Management for Species Conservation. Version 2. p. 1–7, 2014.

IUDZG/CBSG; IUCN/SSC. **Executive Summary, The World Zoo Conservation Strategy : The Role of the Zoos and Aquaria of the World in Global Conservation**. [s.l.] Chicago Zoological Society, 1993.

JAN, C.; FUMAGALLI, L. Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae). **PeerJ**, v. 2016, n. 9, 2016.

JENSEN, T.; PERNASETTI, F. M.; DURRANT, B. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. **Zoo Biology**, v. 22, n. 6, p. 561–571, 2003.

KAREIVA, P.; MARVIER, M. What is conservation science? **BioScience**, v. 62, n. 11, p. 962–969, nov. 2012.

KITPIPIT, T. et al. Forensic animal DNA analysis using economical two-step direct PCR. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 10, n. 1, p. 29–38, mar. 2014.

KLEINMAN-RUIZ, D. et al. Genetic evaluation of the Iberian lynx ex situ conservation programme. **Heredity**, v. 123, n. 5, p. 647–661, 1 nov. 2019.

LARANJEIRAS, T. O.; COHN-HAFT, M. Where is the symbol of Brazilian Ornithology? The geographic distribution of the Golden Parakeet (*Guarouba guarouba*-Psittacidae). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 17, n. 1, p. 1–19, mar. 2009.

LEETON, P.; CHRISTIDIS, L.; WESTERMAN, M. **Feathers from museum bird Skins - A good source of dna for phylogenetic studies** **Condor**, 1993.

LEITE, K. et al. Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation Genetics and Molecular Research. **Genetics and Molecular Research**. V.7, n3. p 819 – p 829. 2008.

LIMA-REZENDE, C. A. et al. In silico identification and characterization of novel microsatellite loci for the blue-and-yellow macaw *ara ararauna* (Linnaeus, 1758) (psittaciformes, psittacidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 68–73, 1 jan. 2019.

MALAGÓ, W. et al. **Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers**. *BMC Biotechnology*. v. 2, n. 19. 2002.

MARTIN-WINTLE, M. S. et al. Improving the sustainability of ex situ populations with mate choice. *Zoo Biology*, v. 38, n. 1, p. 119–132, 2019.

MILLER, W. et al. Optimization methods for selecting founder individuals for captive breeding or reintroduction of endangered species. *Biocomputing*, p. 43–53, 2010.

PRESTI, F. T. et al. Comparative analysis of microsatellite variability in five macaw species (Psittaciformes, Psittacidae): Application for conservation. *Genetics and Molecular Biology*. v. 34, n. 2. P. 348 – p. 352. 2011.

PRESTI, F. T.; WASKO, A. P. A Review of Microsatellite Markers and their Application on Genetic Diversity Studies in Parrots. *Open Journal of Genetics*, v. 04, n. 02, p. 69–77, 2014.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. 1a edição ed. Editora Planta, 2001.

PRIMMER, C. R.; MOLLER, A. P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite-amplification in birds. *Molecular Ecology*, v. 5, p. 365–378, 1996.

PROVOST, K. L.; JOSEPH, L.; SMITH, B. T. Resolving a phylogenetic hypothesis for parrots: Implications from systematics to conservation. *Emu - Austral Ornithology*. v. 118, n. 1. 2018.

RUSSELLO, M. et al. Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes*, v. 1, p. 162–164, 2001.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.

SHAMBLIN, B. M. et al. Loggerhead turtle eggshells as a source of maternal nuclear genomic DNA for population genetic studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 1, p. 110–115, jan. 2011.

SICK, H. Ornitologia Brasileira. **Nova Fronteira**, Rio de Janeiro, Brazil. 2001.

SINHORINI, J. A. Estudo endócrino-reprodutivo, não invasivo de ararajubas, *Guaruba guarouba* (Gmelin, 1788), mantidas em cativeiro / **Tese de doutorado de Juliana Anaya Sinhorini, 2013**. 103f : il.

SOULÉ, M. E. What Is Conservation Biology? **BioScience**. v. 35, n. 11. p. 727 – p. 734. 1985.

STANTON, D. W. G. et al. Genetic structure of captive and free-ranging okapi (*Okapia johnstoni*) with implications for management. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 5, p. 1115–1126, 13 out. 2015.

TABERLET, P.; BOUVET, J. A Single Plucked Feather as a Source of DNA for Bird Genetic Studies. **The Auk**, v. 108, n. 4, p. 959–960, 1991.

TAVARES, E. S. et al. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Systematic Biology**, v. 55, n. 3, p. 454–470, jun. 2006.

TAVARES, E. S.; YAMASHITA, C.; MIYAKI, C. Y. Phylogenetic relationships among some neotropical parrot genera (Psittacidae) based on mitochondrial sequences. **Auk**, v. 121, n. 1, p. 230–242, 2004.

TRIBE, A.; BOOTH, R. Assessing the role of zoos in wildlife conservation. **Human Dimensions of Wildlife**, v. 8, n. 1, p. 65–74, 2003.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M.; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, p. 181, 2017.

URANTÓWKA, A. D.; STRZAŁA, T.; MACKIEWICZ, P. Complete mitochondrial genome of golden conure (*Guaruba guarouba*). **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, v. 2, n. 1, p. 33–34, 1 jan. 2017.

WRIGHT, T. F. et al. A multilocus molecular phylogeny of the parrots (Psittaciformes): Support for a gondwanan origin during the cretaceous. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 10, p. 2141–2156, out. 2008.

ZACARIOTTI, R. L.; BONDAN, E.; DURRANT, B. A importância da conservação ex-situ para a preservação de espécies ameaçadas de extinção e/ou endêmicas. **Herpetologia Brasileira v.2**, p. 33–35, 2013.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DO MÉTODO DA PROTEINASE K – ADAPTADO DE ALJANABI E MARTINEZ (1997)

- 1) Selecionar fragmento de cálamo de ave de 3-5mm;
- 2) Adicionar o fragmento selecionado em microtubo (1,5 mL), individual e identificado
- 3) Adicionar 400 µL de solução tampão de lise pH 8,0 (NaCl 0,4M/L, TRIS-HCl 10 mM/L e EDTA 2 mM/L), 60 µl de SDS 10% e 12 µL de Proteínase K (20 mg/mL).
- 4) Agitar lentamente a amostra e incubar por no mínimo 3 h, no máximo 12 h, a 55 °C.
- 5) Adicionar 300 µl de NaCl 6 M, e agitar em vórtex por 30 s em velocidade máxima
- 6) Centrifugar por 30 min a 13000 RPM
- 7) Preparar novos microtubos devidamente identificados
- 8) Transferir o sobrenadante de cada amostra para os novos tubos (sugestão 400 µl)
- 9) Adicionar ao sobrenadante o mesmo volume de isopropanol gelado
- 10) Agitar cuidadosamente o microtubo
- 11) Armazenar em freezer -20 °C por 12 h.
- 12) Centrifugar novamente, por 10 min, a 11000 RPM
- 13) Adicionar 300 µl de etanol 70% gelado
- 14) Centrifugar novamente, 10 min, 11000 RPM
- 15) Verter o sobrenadante
- 16) Adicionar ao pellet 300 µl de etanol 100%, e em seguida centrifugar novamente (10min, 11000 RPM)
- 17) Verter o sobrenadante e deixar o pellet secar em temp. ambiente
- 18) Depois de seco adicionar ao pellet 40 µl de Água MiliQ e 10 µl de RNase. Se o pellet for muito grande adicionar 90 µl de Água MiliQ e 10 µl de RNase.
- 19) Deixar o pellet secar em estufa ou banho-maria por 37 / 34 °C por 1 ou 2 horas
- 20) Deixar a amostra eluir em bancada por 4 h, e armazenar em freezer -20 °C.

APENDICE B - QUATIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

Número	Tipo de Pena	Concentração [ng/ul]	Média [ng/ul]
1	Madura	80	86,83
		67,5	
		113	
2	Madura	8	25,06
		5,7	
		61,5	
3	Canhão	98	81,83
		76	
		71,5	
4	Madura	20,5	56,83
		75,5	
		74,5	
5	Madura	69	73
		51	
		99	
6	Madura	67,5	82,66
		104,5	
		76	
7	Madura	2,1	20,83
		54,5	
		5,9	
8	Madura	105,5	59,03
		9,1	
		62,5	
9	Madura	43,5	43,33
		31,5	
		55	
10	Madura	5,8	7,96
		8,9	
		9,2	
11	Madura	53	34,96
		49,5	
		2,4	
12	Madura	60,5	55,83
		59,5	
		47,5	
13	Madura	2,2	23,4
		42,5	
		25,5	
14	Madura	66	71,5
		79	

			69,5	
15	Madura		54,5	20
			3,6	
			1,9	
16	Madura		39	36,46
			15,4	
			55	
17	Madura		9,9	26,56
			11,8	
			58	
18	Canhão		14,9	40,3
			30	
			76	
19	Madura		39,5	17,53
			2,6	
			10,5	
20	Madura		79,5	30,36
			9,1	
			2,5	
21	Madura		2,2	2,53
			2,5	
			2,9	
22	Canhão		81	81,16
			80,5	
			82	
23	Madura		4,1	16,63
			3,3	
			42,5	

APÊNDICE C: PROTOCOLO DE TRIAGEM DE PENAS

Protocolo a ser utilizado por alunos do Laboratório de Polimorfismos Genéticos para recebimento e triagem de penas, utilizadas para a extração de DNA como método não invasivo.

1) Ao solicitar as penas, enviar especificações para a entrega de preferência, de penas em crescimento, com canhão.

2) Ao receber as penas, certificar-se de que tudo está devidamente identificado, que não há contaminação, que as penas de cada indivíduo estão embaladas separadamente e que não nenhum problema com as amostras.

3) Separar para a triagem, luvas novas e estéreis, microtubos novos, placas de Petri limpas, bisturi, pinças e tesoura cirúrgica limpa e estéril.

4) Identificar com número, nome e data os microtubos para início do protocolo de extração.

5) Com luvas limpas, abrir com cuidado a embalagem na qual estão depositadas as penas para análise, uma de cada vez, para que não haja acidentes (principalmente relacionados ao voo da pena pelo laboratório), e também para que não aconteça contaminação (Lembrando que para penas maduras, sem canhão, o material genético se encontra na ponta do cálamo, do lado de fora).

6) Depositar uma pena com o auxílio de pinças em uma placa de Petri limpa. Com cuidado, manter presa a pena à pinça, segurando pela base da raque, antes do cálamo, e com muito cuidado, utilizar a tesoura, o mais próximo possível da placa de Petri, para cortar um fragmento transversal do cálamo, com no mínimo 2mm de comprimento.

Caso utilize bisturi para a realização do corte, fique atento ao fragmento cortado, pois ao adicionar pressão à mão para o corte, o fragmento pode voar e se perder na bancada.

7) Adicione o fragmento com o auxílio da pinça ao microtubo correspondente e feche a tampa, para evitar perda de material.

8) Troque a placa de Petri e os utensílios se possível. Caso não seja possível, limpe e esterilize com detergente e álcool 70%, antes de prosseguir para a próxima amostra.

Ao finalizar a utilização das penas, feche todos as embalagens, limpe a bancada, e prepare os materiais necessários para o protocolo de extração de DNA.

Fique atento às barbas e barbudas (penugem) que se soltarão da pena durante o manuseio, para evitar a sujeira nas bancadas do laboratório.

9) Não esqueça de anotar informações relevantes à sua pesquisa, observada durante a triagem, como tamanho das penas, existência de canhão, de sangue, estado de conservação da pena, entre outros detalhes.

10) Armazenar as penas em freezer -20°C com etanol 70 ou 100%, ou em embalagem de papel, em temperatura ambiente, em local seco e fresco.