



**COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DO PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA (*Amazona  
brasiliensis*: PSITTACIDAE, AVES): UMA ABORDAGEM MOLECULAR**



Gislaine Aparecida Fernandes

Orientador: Prof. Dr Renato Caparroz

**Brasília – DF**

**2015**

GISLAINE APARECIDA FERNANDES

**COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DO PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA (*Amazona  
brasiliensis*: PSITTACIDAE, AVES): UMA ABORDAGEM MOLECULAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Renato Caparroz

Brasília – DF

2015



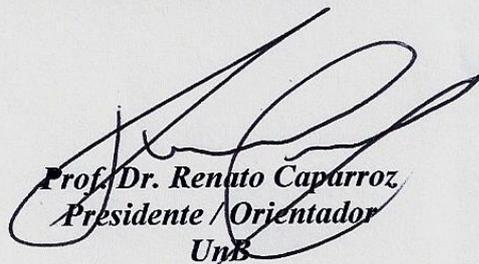
Dissertação de Mestrado

**GISLAINE APARECIDA FERNANDES**

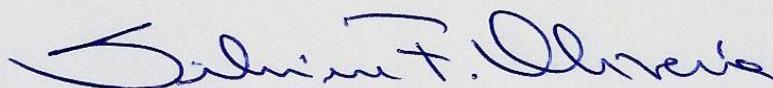
Título:

“Comportamento reprodutivo do Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*:  
PSITTACIDAE, AVES): uma abordagem molecular”

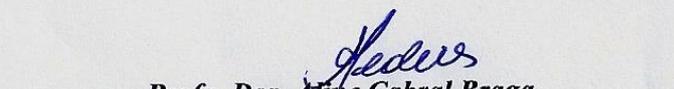
**Comissão Examinadora:**



*Prof. Dr. Renato Capurroz*  
*Presidente / Orientador*  
*UnB*



*Prof. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira* *Membro*  
*Titular Interna Vinculada ao Programa*  
*UnB/IB*



*Profa. Dra. Aline Cabral Braga*  
*Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa*  
*UcB*

*Profa. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães*  
*Membro Suplente*  
*Interno Vinculado ao Programa*  
*UnB/IB*

A minha formação como profissional não seria possível sem a ajuda dos meus pais José Geraldo Fernandes e Georgina Costa Fernandes, que foram os responsáveis pela formação do meu caráter e da minha integridade. A eles que sempre me apoiaram toda vida e principalmente durante minha vida acadêmica e que aprenderam a conviver com a distância. Por esta razão, gostaria de dedicar a vocês esta dissertação.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Professor Orientador, Dr. Renato Caparroz que acreditou em mim e me deu a oportunidade e o desafio de desenvolver este trabalho. Obrigada por toda dedicação, ensinamentos, conselhos e incentivo. Obrigada também pelas críticas que contribuíram para o meu crescimento como profissional e como pessoa. Saiba que esse trabalho em grande parte também é mérito seu.

A minha família, principalmente meus pais José Geraldo Fernandes e Georgina Costa Fernandes por terem me apoiado durante toda minha vida. Obrigada aos meus irmãos Gilberto Junior Fernandes e Genaina Fernandes por estarem sempre do meu lado em todos os momentos e também por todo suporte, incentivo, paciência e amizade.

A SPVS e a equipe do Projeto papagaio de cara-roxa, em especial a Elenise Sipinski (Tise), por terem contribuído com as amostras de tecido ao longo de todos esses anos de monitoramento, ao apoio quanto às informações de campo. Mais uma vez obrigada Elenise Sipinski e também Maria Cecília Abbud e Rafael Sezerban por me receberem tão bem durante a coleta de 2013.

A Kristina Cockle e Cristina Miyaki pelas contribuições, críticas e sugestões durante a qualificação do meu projeto. Este trabalho não seria o mesmo sem as pertinentes sugestões que contribuíram para melhoria do mesmo.

Aos docentes do Laboratório de Genética e Biodiversidade, Fernando Pacheco, Lilian Giugliano e Renato Caparroz por terem disponibilizado o espaço físico para desenvolver este trabalho. Também a todos os colegas de laboratório pelo companheirismo, em especial: Flávia Soares, Thaíz Armond, Cássia Lima, Samira Duarte e Amanda Vaz.

Meus agradecimentos aos amigos: Diogo Nascimento, Eliane Freitas e Rosana Rezende, a vocês que são meus companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que sempre estiveram lado a lado na bancada e fizeram parte da minha formação. A vocês que, com

certeza, vão continuar presentes em minha vida. Rosana a você que é minha parceirona de estrada e de eventos culturais, obrigada por me dar o prazer da sua companhia, eu admiro muito a força e a dedicação que você tem e demonstrou durante a sua jornada. A Eliane (Nina) a quem eu agradeço pela amizade, pela ajuda na bancada, pelas risadas, pela companhia nos bares, pelas caminhadas e as caronas pra casa. Ao Diogo, meu irmão mais velho, muito obrigada pela amizade, pelas 'cervejadas', pelas "quintas *gourmet*", pela parceria e pelo ombro amigo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Agradeço a Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por me acolher como aluna de mestrado, assim como todos os professores que contribuíram para minha formação profissional dentro da universidade.

“A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe. O destino não é frequentemente inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz escolha, escreve sua própria história, constrói seus próprios caminhos.”

Augusto Cury

## RESUMO

As espécies do gênero *Amazona* são consideradas monogâmicas sociais, não sendo identificado até o momento casos de fertilização extra-par (FEP). Outra característica importante em relação ao comportamento reprodutivo das espécies deste gênero é a fidelidade ao ninho, pois os indivíduos geralmente selecionam locais mais seguros para nidificar, como por exemplo, locais com baixos níveis de predação. O fato de que a maioria dos psitacídeos, em particular as espécies deste gênero, não apresenta dimorfismo sexual dificulta a análise de diversos aspectos relacionados ao sistema de acasalamento, exigindo do pesquisador a observação de comportamentos críticos. Uma das alternativas que vem sendo aplicada para superar estas limitações em estudos de comportamento reprodutivo em aves é o uso de marcadores moleculares co-dominantes e altamente polimórficos como os microssatélites. Neste contexto, ainda se conhece pouco a respeito da biologia reprodutiva do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), necessitando uma atenção maior sobre esta questão. Neste trabalho nós contribuímos com mais informações para melhor compreensão acerca da biologia reprodutiva do papagaio-de-cara-roxa a partir da estimativa da relação de parentesco entre ninhegos encontrados em ninhos naturais e artificiais na região da Baía de Paranaguá, no estado do Paraná, com oito *loci* de microssatélite. Os resultados obtidos mostraram que 76% dos ninhegos analisados apresentaram relação de parentesco de irmãos, 20% de meio-irmãos e 4% de não relacionados. Os casos de irmandade foram interpretados como evidência de monogamia do casal, os de meio-irmãos como casos de FEP, enquanto os não-relacionados como casos de competição intra-específica de ninho. Os resultados também mostraram que esta espécie apresenta uma taxa de 83% de reocupação de cavidades, a maior já descrita para o gênero, sendo que a reocupação pelo mesmo casal foi de 71%. Portanto, nós concluímos que *Amazona brasiliensis* não pode ser considerada monogâmica genética já que há evidência de FEP. Por outro lado, apresenta um padrão de fidelidade ao sítio reprodutivo, já que a maior parte dos casais analisados ocuparam a mesma cavidade nas estações reprodutivas seguintes, mesmo havendo perda de ninhada na estação reprodutiva anterior.

**Palavras-chave:** *Amazona brasiliensis*, sistema de acasalamento, fertilização extra-par, fidelidade ao ninho.

## ABSTRACT

The species of the genus *Amazona* are considered social monogamous, not being identified yet cases of extra-pair fertilization (EPF). Another important feature in relation to the reproductive behavior in species of this genus is fidelity to the nest, as a kind usually selects the safest places to nest, for example, sites with low levels of predation. The fact that most parrots, particularly species of this genus, do not show sexual dimorphism complicates the analysis of various aspects related to the mating system, requiring the researcher to observe critical behaviors. One alternative that has been applied to overcome these limitations in reproductive behavior studies in birds is the use of co-dominant and highly polymorphic molecular markers as microsatellites. In this context, little is known about the reproductive Red-tailed amazon biology (*Amazona brasiliensis*), requiring greater attention on this issue. In this work, we contribute more information to better understanding reproductive biology of Red-tailed amazon from the estimate of the kinship relation between nestlings found in natural and artificial nests in the region of Paranaguá Bay, in Paraná with eight microsatellite *loci*. The results showed that 76% of nestlings analyzed showed kinship relation of full-sibs, 20% of half-sibs and 4% unrelated. Cases of full-sibs were interpreted as evidence of couple monogamy, the half-sibs as cases of EPF, while unrelated as cases of intraspecific competition nest. The results also showed that this species has a rate of 83% cavity reoccupation, the largest ever reported to the genus, and the reoccupation by the same couple was 71%. Therefore, we conclude that *Amazona brasiliensis* can not be regarded as genetic monogamous since there is evidence of EPF. However, shows a pattern of the nest site fidelity, since most of analyzed couples occupied the same cavity in the following breeding seasons and the loss in previous breeding season does not seem to influence the cavity reoccupation at next station.

**Keywords:** *Amazona brasiliensis*, mating system, extra-pair fertilization, nest site fidelity.

---

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Quantidade de ninhos e ninhegos utilizados em cada análise.....	20
<b>Tabela 2:</b>	Relação dos ninhos analisados e os respectivos números de ninhegos/amostras de tecido que analisados neste estudo.....	22
<b>Tabela 3:</b>	Caracterização dos <i>loci</i> de microsatélite que foram utilizados no presente trabalho.....	28
<b>Tabela 4:</b>	Relação de parentesco entre os ninhegos de papagaio-de-cara-roxa analisados durante as estações reprodutivas de 1999/2000 a 2013/2014..	30
<b>Tabela 5:</b>	taxa de reocupação de cavidade ao longo das estações reprodutivas.....	31
<b>Tabela 6:</b>	taxa de reocupação de cavidade ao longo das estações reprodutivas.....	33

---

---

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Diversos tipos de cavidades ocupadas por papagaios-de-cara-roxa ( <i>Amazona brasiliensis</i> ) nas ilhas Rasa, Gamelas, Peças e Grande, no Estado do Paraná: a) ninho natural; b) ninho artificial de madeira; c) ninho artificial de PVC.....	21
<b>Figura 2:</b>	Porcentagem das relações de parentesco do tipo FS, HS e U promovidas a partir do ML-RELATE.....	29
<b>Figura 3:</b>	Porcentagem de monogamia e de FEP encontrados em <i>A. brasiliensis</i> .....	29
<b>Figura 4:</b>	Porcentagem de reocupação de cavidade pelo mesmo casal e por casal diferente em <i>Amazona brasiliensis</i> .....	32
<b>Figura 5:</b>	Número de ninhos reocupados pelo mesmo casal ou por casal diferente após evento de sucesso ou insucesso na estação reprodutiva anterior....	32

---

---

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO SDS-PROTEINASE K.....	43
<b>Anexo 2:</b> Relação de todos os indivíduos utilizados neste trabalho e seus respectivos genótipos.....	44

---

---

## LISTA DE SIGLAS

<b>ICMBio</b>	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
<b>LGEMA</b>	Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves
<b>PANs</b>	Planos de Ação Nacionais
<b>MMA</b>	Ministério do Meio Ambiente
<b>IUCN</b>	International Union for Conservation of Nature
<b>SPVS</b>	Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>FEP</b>	Fertilização Extra Par
<b>PP</b>	Perda Parcial de Ninhada
<b>PT</b>	Perda Total de Ninhada
<b>SP</b>	Sucesso Parcial de Ninhada
<b>ST</b>	Sucesso Total de Ninhada
<b>FS</b>	Irmãos
<b>HS</b>	Meio irmãos
<b>U</b>	Não relacionados

---

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 SISTEMA DE ACASALAMENTO.....	14
1.2 OCUPAÇÃO DE CAVIDADE.....	16
1.3 ESPÉCIE EM ESTUDO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 ESPECIFICOS.....	20
3. MÉTODOS.....	20
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	20
3.2 AMOSTRAGEM.....	21
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	23
3.4 AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM.....	23
3.5 ANÁLISES GENÉTICAS.....	24
3.5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCI.....	24
3.5.2 RELAÇÃO DE PARENTESCO.....	25
3.5.3 REOCUPAÇÃO DE CAVIDADE.....	25
3.5.4 FIDELIDADE AO NINHO.....	26
3.5.5 INFLUENCIA NA REOCUPAÇÃO DE CAVIDADE.....	26
4. RESULTADOS .....	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCI.....	27

4.2	RELAÇÃO DE PARENTESCO, FEP E DISPUTA POR CAVIDADE.....	28
4.3	REOCUPAÇÃO DE CAVIDADE.....	31
4.4	FIDELIDADE AO NINHO.....	31
4.5	INFLUENCIA NA REOCUPAÇÃO DE CAVIDADE.....	32
5.	DISCUSSÃO.....	34
5.1	SISTEMA REPRODUTIVO.....	34
5.2	REOCUPAÇÃO DE CAVIDADE E FIDELIDADE AO NINHO.....	37
5.3	INFLUENCIA NA REOCUPAÇÃO DE CAVIDADE.....	38
6.	CONCLUSÃO.....	38
7.	BIBLIOGRAFIA.....	39
8.	ANEXOS.....	43
8.1	ANEXO 1.....	43
8.2	ANEXO 2.....	44

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sistema de acasalamento

Desde a década de 1970 os trabalhos envolvendo fidelidade do casal e ao ninho em aves vem aumentando consideravelmente, segundo levantamento realizado por Griffith e colaboradores (2002). Porém, ainda se tem muitas questões a serem resolvidas, principalmente quando estão envolvidas espécies que são consideradas monogâmicas sociais (Theuerkauf *et al.* 2009). Durante várias décadas, os ornitólogos consideravam a maior parte das espécies de aves como sendo monogâmicas. Contudo, com o advento das técnicas moleculares, esta visão mudou radicalmente quando se encontrou evidência de fertilização extra-par (FEP) em aproximadamente 90% das aves estudadas, sendo que 11% eram de aves consideradas socialmente monogâmicas (Griffith *et al.* 2002).

Em Passeriformes, a taxa de FEP pode ser bem alta. Kempnaers e colaboradores (1999) encontraram 70% de FEP em *Tachycineta bicolor*, uma espécie socialmente monogâmica. No entanto, em outras famílias como, por exemplo, em Sphenisciformes, são observadas taxas baixas ou completa ausência de FEP (Moreno *et al.* 2000). Em Strigiformes, Falconiformes (aves de rapina) e nas espécies marinhas de Procellariiformes, também são observadas taxas baixas de FEP (Quillfeldt *et al.* 2001; Muller *et al.* 2001). Uma espécie de coruja endêmica da ilha Lanyu, em Taiwan, *Otus elegans botelensis*, apresenta frequência alta de cópula extra-par, apesar da fertilização extra-par ser rara nesta espécie. No entanto, esta espécie é considerada sexualmente monogâmica, pois a FEP é extremamente rara (Hsu *et al.* 2006). Bai & Severinghaus (2012) demonstraram que a fidelidade dos casais está fortemente ligada à tendência da fêmea em reutilizar cavidades para nidificação nas quais elas tiveram maior sucesso reprodutivo em estações anteriores. Os autores descrevem ainda que a fidelidade do casal também foi influenciada pela duração da união do casal nas estações reprodutivas sucessivas, ou seja, os casais que reproduziram em duas ou mais estações juntos foram mais fiéis a seus parceiros do que os casais que se juntaram pela primeira vez. Contudo, as taxas baixas de FEP observadas nas espécies destes grupos podem estar associadas à história de vida e a características como o cuidado parental do macho (Birkhead & Møller 1996) e a

expectativa de vida dos reprodutores, onde espécies com maior longevidade apresentariam maior tendência ao comportamento monogâmico (Mauck *et al.* 1999).

Psittaciformes é outro grupo em que as espécies apresentam longevidade alta e também um investimento parental muito grande pelo macho (Masello *et al.* 2002). Neste grupo, alguns trabalhos tem demonstrado que a cópula extra-par não é tão comum quanto em outros grupos de aves (Heinsohn *et al.* 2007; Ekstrom *et al.* 2007; Theuerkauf *et al.* 2009; Klauke *et al.* 2013). Em estudo realizado com *Pyrrhura orcesi*, foi observado taxa baixa de FEP, mesmo sendo esta espécie considerada monogâmica (Klauke *et al.* 2013). Outra espécie de Psittacidae que apresenta FEP é *Electus roratus macgillivrayi*, com confirmação de poliandria (onde uma fêmea possui dois ou mais parceiros sexuais) e alto índice de poliginia (onde o macho possui duas ou mais fêmeas) (Heinsohn *et al.* 2007). Um aspecto interessante é que estas duas espécies possuem um sistema de reprodução cooperativa, sendo que a maioria dos grupos reprodutivos é formada por um casal reprodutor e alguns auxiliares (Brown 1987; Heinsohn *et al.* 2007). Nestas duas espécies, os casos de FEP foram atribuídos aos respectivos auxiliares de cada casal reprodutivo. Desta forma, os casos encontrados de FEP nesta ordem de Aves são geralmente em espécies que possuem sistema reprodutivo cooperativo, as quais representam apenas 5% das espécies conhecidas (Wright *et al.* 2001; Cockburn 2006). Por outro lado, segundo Theuerkauf e colaboradores (2009), esta baixa porcentagem também pode ser o resultado de poucos estudos envolvendo o sistema de acasalamento em psitacídeos em comparação com outros grupos de aves.

Em Psittaciformes socialmente monogâmicos já foi demonstrado que existe cópula extra-par, porém sem evidência de FEP. Spoon e colaboradores (2007) observaram que 10% dos indivíduos de *Nymphicus hollandicus* monitorados em cativeiro tiveram comportamento de cópula extra-par, porém não foi possível comprovar a filiação dos filhotes. Segundo os autores, este comportamento pode estar relacionado tanto com a hipótese de incompatibilidade genética (Colson *et al.* 1972), quanto com a hipótese de “melhores opções” (*better-options hypothesis*) (Davies 1989).

Em outros Psittaciformes socialmente monogâmicos, a ocorrência de FEP não pode ser completamente descartada. Em *Ara chloropterus* foi encontrado que a maioria dos ninhegos

do mesmo ninho apresentou índices de similaridade genética próximos ao esperado entre irmãos, porém em um dos ninhos os índices observados sugerem que os ninhegos não são irmãos (Caparroz *et al.* 2001). De forma semelhante, Caparroz e colaboradores (2010) encontraram que cerca de 9% dos ninhegos de mesma ninhada de arara canindé (*Ara ararauna*) analisados apresentaram índices de similaridade genética abaixo do esperado entre irmãos. No entanto, nestes dois estudos, a baixa similaridade genética observada entre os ninhegos do mesmo ninho pode ser explicada tanto por disputa intraespecífica por cavidade quanto por fertilização extra-par, já que não foi possível a comparação com os indivíduos parentais.

As espécies do gênero *Amazona* são consideradas monogâmicas sociais (Forshaw 1977). No entanto, existe apenas um único trabalho que avaliou este comportamento no papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), não sendo identificada a ocorrência de FEP (Caparroz *et al.* em preparação).

## 1.2 Ocupação de cavidade

O sucesso reprodutivo em aves pode ser influenciado pela seleção de ninhos. Geralmente, os indivíduos selecionam locais mais seguros para nidificar, como por exemplo, locais com baixos níveis de predação (Goodnow & Reitsma 2011). Bonebrake & Beissinger (2010) registraram em seu estudo de monitoramento de ninhos naturais e artificiais com *Forpus passerinus* que há uma competição tanto interespecífica quanto intraespecífica por ninhos de maior qualidade, inclusive com registros de infanticídio. Neste estudo foi verificado que os ninhos localizados sob menor cobertura vegetal tiveram um número maior de filhotes por ninho quando comparados com os ninhos localizados sob dossel fechado. Embora os ninhos com menor cobertura vegetal sejam de alta qualidade, houve um custo competitivo por estes ninhos apresentando maior evento de infanticídio. Alguns trabalhos mostram também que a reocupação de cavidades pode ser baixa devido às altas taxas de predação (Sonerud 1989, Miller 2002) ou altos níveis de ectoparasitas nas cavidades velhas se comparados com as cavidades novas (Mazgajski 2007).

A dinâmica de ocupação de cavidades para nidificação em espécies do gênero *Amazona* ainda é muito pouco conhecido. As espécies deste gênero, assim como a maioria dos

psitacídeos, não constroem seus próprios ninhos. Elas utilizam cavidades pré-existentes para nidificar (Brightsmith 2005). Estas cavidades tornam-se disponíveis a partir da degradação natural dos troncos ou galhos das árvores ou pela ação de escavadores primários como o pica-pau (Seixas & Mourão 2002; Aitken *et al.* 2002; Correa Dias 2011). Esta característica torna estas espécies dependentes da disponibilidade de cavidades para nidificação, o que pode levar a competição por cavidades e sua reocupação pelos mesmos ou por diferentes indivíduos (Tortato & Bonanomi 2012). Dentre os fatores que influenciam a frequência de reocupação de cavidades incluem a qualidade das cavidades, duração da fidelidade ao ninho, grau de competição por cavidades com outros utilizadores de cavidades para nidificar e disponibilidade de novas cavidades (Ingold 1991).

Trabalhos a respeito do sistema de ocupação de cavidade têm demonstrado que a taxa de reocupação em espécies do gênero *Amazona* varia bastante. Em algumas espécies, as taxas de reocupação observadas são baixas, oscilando entre 2% a 13% (Enkerlin-Hoeflich 1995; Renton & Salinas-Melgoza 1999; Koenig 2001). Por outro lado, em outras espécies as taxas são elevadas, variando entre 35% e 74% (Enkerlin-Hoeflich 1995; Koenig 2001; Seixas & Mourão 2002; Berkunsky & Reboresda 2009; White *et al.* 2005; Castillo & Eberhard 2006). Contudo, a maior parte destes trabalhos foi realizada com aves não anilhadas e, portanto, não se pôde determinar se a reocupação foi feita pelos mesmos indivíduos ou se por indivíduos diferentes. Dentre os poucos trabalhos realizados com psitacídeos envolvendo indivíduos anilhados, foi encontrado que as taxas altas de reocupação de cavidades estavam associadas com elevada taxa de fidelidade ao ninho (Snyder *et al.* 1987, Waltman & Beissinger 1992). Em *Amazona*, o único trabalho com indivíduos anilhadas foi feito por Berkunsky & Reboresda (2009) com *Amazona aestiva*, os quais encontraram taxas altas de reocupação de cavidade de 62% e fidelidade ao ninho pela mesma fêmea de 63%.

O fato de que a maioria dos psitacídeos, em particular as espécies de *Amazona*, não apresenta dimorfismo sexual, dificulta a análise de diversos aspectos relacionados ao sistema de acasalamento, exigindo do pesquisador a observação de comportamentos críticos (Carvalho *et al.* 2013). Além disso, o anilhamento de aves adultas deste grupo é um trabalho perigoso e pode causar danos tanto nas aves quanto nos pesquisadores. Desta forma, o estudo de diversos aspectos relacionados ao comportamento reprodutivo em

psitacídeos pode apresentar diversas limitações quanto baseado exclusivamente em observações de campo.

Uma das alternativas que vem sendo aplicada para superar estas limitações em estudos de comportamento reprodutivo em aves é o uso de marcadores moleculares, particularmente os microssatélites (Tautz & Renz 1984; Tautz & Schlötterer 1994; Sobotka 2011). Inclusive, estes marcadores já foram utilizados para verificar a fidelidade ao ninho em algumas espécies de Psittacidae (Heinsohn *et al.* 2007; Theuerkauf *et al.* 2009; Klauke *et al.* 2013). Os microssatélites são marcadores co-dominantes e altamente polimórficos, o que torna estes marcadores bastante informativos em estudos de parentesco (Tautz & Renz 1984; Frankham *et al.* 2008).

Até o momento, apenas Caparroz e colaboradores (em preparação) desenvolveram um trabalho utilizando marcadores microssatélite para avaliar o sistema reprodutivo e a fidelidade ao ninho em *Amazona*. Neste trabalho, os autores encontraram que a taxa de reocupação de cavidade pelo mesmo casal foi de 33%. No entanto, as reocupações não foram em anos consecutivos. Ainda neste trabalho, os autores sustentam que esta espécie além de ser monogâmica social também parece ser monogâmica genética.

### *1.3 Espécie em estudo*

O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é endêmico dos últimos remanescentes da Mata Atlântica. A distribuição geográfica desta espécie se estende desde o litoral sul de São Paulo até o litoral sul do Paraná (Scherer-Neto 1989; Martuscelli 1995; Sipinski *et al.* 2014). É uma espécie considerada monogâmica social (Scherer-Neto 1989; Abbud 2013). Essa espécie ainda é classificada como vulnerável pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN 2014) e até pouco tempo recebia essa mesma classificação pela lista de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente, no Brasil (MMA/IBAMA 2014). No entanto, com a última revisão de 2014, o papagaio-de-cara-roxa foi retirado da lista de espécies ameaçadas de extinção (MMA 2014). Um dos principais fatores que proporcionaram esta ascensão está diretamente ligado ao aumento da população que até um dos primeiros levantamentos era de 813 papagaios (Scherer-Neto 1989). Até 2008 a população de papagaio-de-cara-roxa estava estimada em aproximadamente 6.670

indivíduos na natureza é considerada estável e, porém este número ainda é relativamente pequeno (Sipinski & Bócon 2008).

Nos últimos anos, estratégias de conservação vêm sendo adotadas com o intuito de minimizar o impacto da destruição das áreas naturais e do tráfico ilegal sobre a população do papagaio-de-cara-roxa. A política nacional de conservação de espécies ameaçadas de extinção conduzida pelo Ministério do Meio Ambiente vem adotando como instrumento principal de gestão a elaboração de Planos de Ação Nacionais (PANs). Estes são instrumentos de políticas públicas, pactuadas com a sociedade, que identificam e orientam as ações prioritárias para combater as ameaças que põem em risco populações de espécies e os ambientes naturais e assim protegê-los (ICMBio, 2013). Em 2011, foi publicado o PAN para a conservação dos papagaios ameaçados de extinção, sendo contemplado neste plano o papagaio-de-cara-roxa e outras quatro espécies de *Amazona*. Dentre as ações traçadas conforme a Portaria 130/2010 para atingir o objetivo do Plano em cinco anos, uma delas (ação 3.16) aponta a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a reprodução do papagaio-de-cara-roxa.

Pouco se conhece a respeito da biologia reprodutiva do papagaio-de-cara-roxa, necessitando uma atenção maior sobre esta questão. Desta forma, na presente dissertação, procuramos contribuir com mais informações sobre o sistema de acasalamento e a fidelidade ao ninho nesta espécie, para melhor compreensão acerca de sua biologia reprodutiva. Além disso, as informações obtidas para esta espécie poderão servir para ampliar o conhecimento sobre os aspectos que compõe estes comportamentos em psitacídeos e, em geral, nas Aves. Por fim, os resultados obtidos também poderão auxiliar na elaboração de estratégias de conservação para esta espécie, uma vez que a ação 3.16 do Plano de Ação Nacional (PAN) dos papagaios ameaçados de extinção ressalta a necessidade de estudo sobre a biologia reprodutiva do papagaio-de-cara-roxa (Schunk *et al.* 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho procurou preencher algumas lacunas de conhecimento sobre o comportamento reprodutivo do papagaio-de-cara-roxo com relação a dois aspectos: o sistema reprodutivo e a fidelidade do casal ao ninho.

## **2. Objetivo**

### *2.1 Geral*

O objetivo geral deste trabalho foi compreender alguns aspectos do comportamento reprodutivo do papagaio-de-cara-roxa enfocando o sistema reprodutivo e a fidelidade ao ninho.

### *2.2 Específicos*

- Realizar a caracterização genética da população de *A. brasilienses* na região da Baía de Paranaguá, PR;
- Estimar a taxa de fertilização extra-par e/ou disputa intraespecífica por cavidade;
- Estimar a taxa de reocupação de cavidade;
- Estimar a taxa de reocupação de cavidades pelo mesmo casal;
- Testar se a taxa de reocupação de cavidade diminui pela influência do insucesso na estação reprodutiva anterior.

## **3. MÉTODOS**

### *3.1 Área de estudo*

Os ninhos selecionados para a realização deste estudo estão localizados nas ilhas Rasa, Grande, de Peças e das Gamelas, no município de Guaraqueçaba (25°18'25" S / 48°19'44" O), região da Baía de Paranaguá situada na costa norte do estado do Paraná. Estes ninhos vêm sendo monitorados regularmente, desde a criação do projeto “Conservação do Papagaio-de-cara-roxa”, em 1998, por funcionários e pesquisadores do projeto, coordenado pela bióloga Elenise Sipinski, da ONG Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS).

### 3.2 Amostragem

As amostras de tecido (sangue ou penas em canhão) vêm sendo coletadas de ninhegos encontrados em cavidades naturais ou ninhos artificiais de PVC/Madeira (Figura 1), ao longo de 17 anos de monitoramento. No entanto, para este trabalho foram selecionados 54 ninhos em um período de 15 anos, os quais tinham mais de um filhote por ninho para o teste de monogamia, assim como os mais utilizados ao longo do monitoramento para testar se há fidelidade ao ninho pelo casal em estações reprodutivas sucessivas (Tabela 1 e 2).



**Figura 1.** Diversos tipos de cavidades ocupadas por papagaios-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) nas ilhas Rasa, Gamelas, Peças e Grande, no Estado do Paraná: a) ninho natural; b) ninho artificial de madeira; c) ninho artificial de PVC (Fonte: Abbud 2013).

**Tabela 1.** Número de ninhos, ninhadas e ninhegos utilizados em cada análise. A relação de todos os indivíduos utilizados em cada abordagem e seus respectivos genótipos está disponível no Anexo 2.

Abordagem	Ninhos	Ninhadas	Ninhegos
Caracterização genética da população	41	-	41
Monogamia	43	71	193
Reocupação de cavidade	19	122	287
Fidelidade ao ninho	13	29	55
Influência na reocupação	13	27	52

**Tabela 2.** Relação dos ninhos e os respectivos números de ninhegos/amostras de tecido que foram analisados no estudo de reocupação de cavidade. As siglas em parênteses indicam a categoria de sucesso de cada ninhada (para detalhes veja a seção 3.5.4 de Material e métodos).

Ninho	Estação reprodutiva											Localidade	
	2002-2003	2003-2004	2004-2005	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013		2013-2014
CN 1		3/3	2/0 (PT)	3/1 (PP)	3/3 (ST)		?/1 (?)		1 (?)	1(?)			Ilha Rasa
CN 2		1/1	3/2 (SP)	3/1 (PP)	3/2 (PP)								
CN 8			3/2(PT)	0	3/3 (ST)		3/0 (PT)	0	3/3 (ST)	0	3/0 (PT)	2/2 (ST)	
CN 10			3/2 (PP)	2/2 (ST)	3/3 (ST)								
CN 17				2/2 (?)	3/3 (ST)		2/1 (ST)		0	3/0 (PT)	1/0 (PT)		
CN19				3/2 (ST)	3/3 (ST)		3/2 (ST)	2/0 (PT)	1/0 (ST)	1/0 (PT)	2/2 (?)	2/0 (PT)	
CN 25				0	3/3(PP)		3/0 (PT)	1/1 (ST)	3/3 (ST)	3/3 (ST)	2/0 (ST)	3/3 (ST)	
CN 27				3/0 (PT)	3/2 (PP)		2/2 (ST)	3/0 (ST)	2/2 (ST)	2/0 (PP)	3/0 (PT)	2/1 (PT)	
CN 29				1/0 (PT)	3/0 (?)	1	2/1 (ST)	3/1 (?)	1/0 (PT)	3/3 (ST)	3/0 (PT)	1/1 (PT)	
CN 57							4/1 (PP)	2/1 (PP)	3/3 (ST)	2/0 (PP)	0	2/0 (ST)	
N 4	2/1 (SP)	2/2(ST)	1/0 (PT)	3/1 (PP)	3/3 (ST)		3/2 (?)	3/2 (ST)	2/1 (ST)	0	0	3/3 (ST)	
N 25	1/0 (PT)	2/0	3/2 (PT)	2/1 (?)	2/0 (PT)								
N 82	2/0 (PT)	?/2	0	3/1 (?)	3/2 (PP)		0						
N 99	2/2 (ST)	2/2(PP)	3/0 (PT)	3/0 (PT)	3/0 (PP)		2/1 (PP)	1/0 (PT)	3/0 (ST)	1/0 (?)	0	3/0 (SP)	
N 123	3/0 (PT)	3/3(PP)	2/2 (ST)	3/0 (PT)	3/2 (PP)		1/0 (PT)	2/1 (ST)	5/0 (?)	2/0 (PT)			
N 188			2/2 (ST)	3/1 (?)									
PVC 20							3/1 (PP)	3/2(PP)	2/0 (PP)	2/1 (PP)	2/2 (?)	3/2 (PP)	
CN 4		2/0(ST)	2/0(PT)	3/2 (PP)	3/0 (PT)		3/3 (?)	0	2 (?)	1/0 (PT)	1/0 (PT)		Ilha das Gamelas
CN 9			0	3/1 (PP)	4/4 (ST)		3/3 (?)	2/0 (ST)	3 (?)	2/0 (PT)			

ST= sucesso total; SP= sucesso parcial; PP= perda parcial; PT= perda total; ?= sem informações.

No caso das penas, foram coletadas três a quatro penas da região dorsal dos ninhegos. As amostras de sangue foram coletadas do sangue periférico (0,1ml) de cada ninhego por meio de punção da veia braquial, com o uso de seringas e agulhas descartáveis. As coletas foram feitas com autorização do ICMBio (Licença número 35621-2). Após a coleta, as penas e as amostras de sangue foram transferidas para microtubos contendo 0,5ml de etanol absoluto e mantidos à temperatura ambiente. Após o término do projeto, o restante das amostras de tecido serão depositadas no acervo de tecidos do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA), do instituto de Biociências, da Universidade de São Paulo, sob a coordenação da Dra Cristina Y. Miyaki.

### *3.3 Extração de DNA*

A extração de DNA foi realizada a partir do sangue e do cálcio das penas utilizando o método padrão de digestão com proteinase K/SDS (Anexo 1). As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, utilizando como referência o marcador molecular Lambda a 100 ng/μl (Jena Biosciences).

### *3.4 Amplificação e genotipagem*

Cada ninhego foi genotipado pela amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para oito locos de microssatélite: AgGT07, AgGT08, AgGT12, AgGT21, AgGT22, AgGT29, AgGT72 e AgGT83 (Tabela 3). As amplificações foram feitas segundo condições e parâmetros previamente estabelecidos para a espécie alvo deste estudo por Caparroz e colaboradores (2007) . As amostras foram amplificadas com 10μl de reação contendo 1,5μl de DNA diluído a 20ng/μl, a esta reação foi adicionado 1μl de tampão da enzima 10X (500mM KCl, 100mM TrisHCl pH 8,4, 1% Triton X-100; Phoneutra), 1μl de dNTPs (2,5 μmol de cada dNTP), 1μl de cada par de iniciador, 0,4μl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,1μl da enzima Taq DNA polimerase (5U/μl) e água Mili-Q autoclavada deionizada até completar o volume final. Um dos iniciadores de cada par foi marcado com um elemento fluorescente para análise em

sequenciador automático. As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 7 min; 35 ciclos de: 95°C por 1 min, 1 min para hibridização do iniciador (temperatura de acordo com o iniciador), 72°C por 1 min; e um ciclo final a 72°C por 10 min. O sucesso de amplificação foi aferido em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, utilizando com referência o marcador Ladder 100ng (Invitrogen). Os produtos amplificados foram analisados em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). A identificação do tamanho dos alelos foi feita com o programa Geneious 6.1.6 (Biomatters).

### 3.5 Análises genética

#### 3.5.1 Caracterização dos loci

A caracterização dos *loci* e a estimativa das frequências alélicas da população foram realizadas a partir do programa Identity 4 (Wagner & Sefc, 1999). Para estas análises foi selecionado um ninhego de cada ninho dentro de um intervalo de cinco anos, pois os indivíduos dessa espécie atingem a maturidade sexual por volta dos seis anos de idade. Essas medidas foram tomadas para não ocorrer reamostragem do mesmo alelo e nem sobreposição de geração que são premissas para testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para avaliar se os locos utilizados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg foram utilizados três testes distintos implementados no programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006). Para este teste foram utilizadas 10.000 aleatorizações de Monte Carlo, como descrito por Guo & Thompson (1992) e o teste estatístico “U” como descrito por Raymond e Rousset (1995). Os valores de heterozigose esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) foram obtidos com o programa Identity 4.

O desequilíbrio de ligação entre os locos foi avaliado com o programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). O GENEPOP considera como hipótese nula que os genótipos de um *locus* sejam independentes dos genótipos de outro *locus* e o teste estatístico padrão utilizado neste programa é o G-test, o qual utiliza valores do log de verossimilhança.

A possível ocorrência de alelos nulos e outros erros de genotipagem nos *loci* analisados foi verificada com o programa Identity 4. Contudo, erros associados à genotipagem podem ser devido a presença de mutações nos sítios de ligação dos iniciadores podendo gerar alelos nulos (Jones *et al.* 2010) ou amplificação preferencial de alelos menores, evento denominado *short allele dominance* (Wattier *et al.* 1998), ou também conhecido por *allele dropout*.

### 3.5.2 Relações de parentesco

Para análise de relação de parentesco foram analisados 193 ninhegos de 43 ninhos (Tabela 1), com mais de um filhote por ninhada. As relações de parentesco entre os ninhegos foram estimadas utilizando os valores de máxima verossimilhança do coeficiente de parentesco ( $r$ , Blouin 2003) com o programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006). O ML-RELATE usa uma rotina de calibração do algoritmo *simplex downhill* para encontrar a estimativa de máxima verossimilhança de  $r$ . Uma vez que a superfície de verossimilhança para  $r$  pode ter vários picos, a rotina *simplex downhill* é iniciada a partir de 11 conjuntos de pontos, um dos quais é {não relacionados (U), meio-irmãos (HS), irmãos (FS) e Pais / Filhos (PO)}. Os outros dez são valores aleatórios (Kalinowski 2008). As relações entre os ninhegos são representados matematicamente como a probabilidade de que seus genótipos compartilhem zero, um ou dois alelos idênticos por descendência (Lynch & Walsh 1998; Blouin 2003; Buckleton *et al.* 2005). Uma vez que  $k_0$ ,  $k_1$  e  $k_2$  representam as probabilidades de que dois indivíduos compartilhem zero, um ou dois alelos num determinado *locus*, respectivamente, então dois indivíduos serão:

Irmãos (*Full Sibs* - FS), se  $k_0= 0.25$ ,  $k_1=0.5$  e  $k_2=0.25$ ;

Meio-irmãos (*Half Sibs* - HS), se  $k_0= 0.5$ ,  $k_1=0.5$  e  $k_2=0$ ;

Não relacionados (*Unrelated* - U), se  $k_0= 1$ ,  $k_1=0$  e  $k_2=0$ .

### 3.5.3 Reocupação de cavidade

Para estimar a reocupação de cavidades foram analisados 19 ninhos durante 12 estações reprodutivas, entre 2002 a 2014, com exceção da estação de 2007-2008 devido à escassez de dados do monitoramento neste período. Para esta análise foram consideradas ocupações de cavidade sempre que uma ninhada foi iniciada, ou seja, toda vez que houve postura na cavidade durante cada estação reprodutiva, mesmo que houvesse predação ou ovo não eclodido (Tabela 2).

A taxa de reocupação de cavidade entre os anos consecutivos foi estimada pelo número de cavidades com postura no ano  $n$  e  $n-1$ , dividido pelo número de cavidades com postura no ano  $n-1$  que ainda estavam disponíveis no ano  $n$  como descrito por Berkunsky e Rebores (2009).

#### *3.5.4 Fidelidade ao ninho*

A taxa de fidelidade ao ninho foi estimada da mesma forma que a reocupação de cavidade, porém, foram utilizados 13 dos ninhos da análise de reocupação de cavidade, pois somente para estes ninhos foi possível saber qual casal reocupou a cavidade. Dentre as 79 reocupações, 45 não foram analisadas porque não havia amostra de tecido para as análises genéticas devido à perda dos ovos antes da eclosão ou a perda da ninhada antes do período de coleta. Para esta abordagem foi considerada reocupação pelo mesmo casal quando os ninhegos de uma estação reprodutiva apresentaram relação de parentesco correspondente à FS ou HS com os ninhegos de mesmo ninho, mas de estações reprodutivas sucessivas.

#### *3.5. Influência da perda de ninhada na reocupação de cavidades*

Para analisar a Influência do insucesso ou sucesso da ninhada sobre a fidelidade ao ninho foram cruzadas as informações obtidas do monitoramento dos ninhos ao longo dos anos com os dados genéticos obtidos a partir da genotipagem dos ninhegos. A partir destes dados foi analisado se a taxa de reocupação de ninhos apresenta alguma alteração pela influência do sucesso ou insucesso na estação reprodutiva anterior. Para esta análise, foram

selecionados os mesmos dados da análise de fidelidade ao ninho. No entanto, para cruzar os dados, cada ninhada foi classificada em uma das seguintes categorias (Tabela 2):

- Sucesso total (ST), onde o número de ovos postos é igual ao de filhotes que deixaram o ninho;
- Sucesso parcial (SP), onde o número de ovos postos é diferente do número de filhotes que eclodiram, sendo nesta categoria enquadrado apenas as ninhadas com presença de ovos que não eclodiram (esta categoria foi criada para especificar o insucesso de ovos por fatores intrínsecos);
- Perda parcial de ninhada (PP), onde o número de ovos postos é maior do que o número de filhotes que deixaram o ninho;
- Perda total da ninhada (PT), onde houve postura de ovos, mas nenhum filhote sobreviveu.

A influência do sucesso reprodutivo na reocupação de cavidades foi avaliada pela comparação dos ninhos ocupados em anos consecutivos com sucesso total (ST) e sucesso parcial (SP) na estação anterior com aqueles ninhos ocupados em anos consecutivos, porém com perda parcial (PP) ou total da ninhada (PT) na estação anterior. Esta métrica foi obtida considerando a reocupação do ninho por casais diferentes e pelo mesmo casal. Neste último caso, a definição de mesmo casal foi baseada na relação de parentesco conforme descrito anteriormente.

## **4. RESULTADOS**

### *4.1 Caracterização dos loci*

O número de alelos em cada *locus* variou entre 5 a 12 alelos, apresentando uma média de 8,3 alelos por *locus*. A estimativa das freqüências de alelos nulos foi baixa para a maioria dos *loci* analisados (<0,04), exceto o *locus* AgGT 22, o qual apresentou estimativa de freqüência de 0,180 para presença de alelo nulo. Apesar do programa ML-RELATE acomodar

alelo nulo, este *locus* foi retirado da análise de parentesco. A média da heterozigose esperada foi de 0,66 e da heterozigose observada foi de 0,61. A probabilidade de identidade combinando todos *loci* foi de  $2,11 \times 10^{-9}$  e a probabilidade de exclusão de paternidade combinando todos *loci* foi de 0,99914 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Caracterização dos *loci* de microssatélite que foram utilizados no presente trabalho.

Loco	<i>motif</i>	N	Na	Tamanho (pb)	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	AN	EP	PI
AgGT 07 <sup>®</sup>	(GT) <sub>21</sub>	40	11	261-283	0,81	0,77	0,018	0,63516	0,05
AgGT 08	(GT) <sub>n</sub> (GCGT) <sub>n</sub>	39	5	314-358	0,42	0,46	-0,026	0,19930	0,39
AgGT 12 <sup>®</sup>	(GT) <sub>17</sub>	41	5	296-306	0,37	0,39	-0,011	0,21216	0,41
AgGT 21 <sup>®</sup>	(GT) <sub>21</sub>	41	12	309-335	0,87	0,85	0,009	0,74233	0,02
AgGT 22*	(CA) <sub>22</sub>	41	7	185-203	0,54	0,27	0,180	0,32310	0,25
AgGT 29*	(CA) <sub>12</sub>	41	9	186-218	0,72	0,66	0,037	0,52904	0,10
AgGT 72*	(CA) <sub>18</sub>	41	5	269-287	0,44	0,44	0,004	0,24218	0,34
AgGT 81 <sup>®</sup>	(GT) <sub>20</sub>	12	10	317-345	0,87	0,83	0,020	0,74027	0,03
AgGT 83 <sup>®</sup>	(GT) <sub>21</sub>	41	11	245-269	0,88	0,85	0,012	0,75144	0,02
<b>Média/Total</b>	-	-	8,33	-	0,66	0,61	-	0,99907	$2,11 \times 10^{-9}$

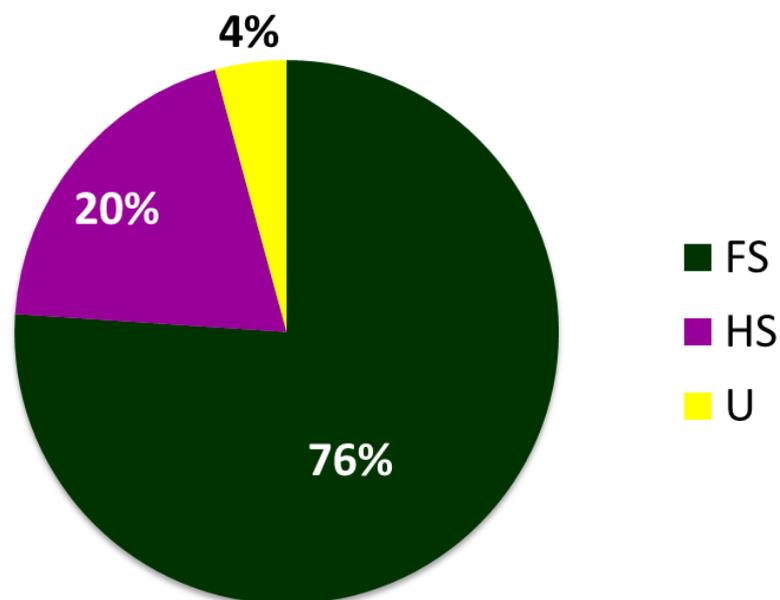
<sup>®</sup>Iniciadores descritos por Russello *et al.* (2001); \*Iniciadores descritos Russello *et al.* (2005). N= número de indivíduos utilizados para cada *locus*. Na= número de alelos; H<sub>E</sub>= Heterozigose esperada; H<sub>O</sub>= Heterozigose observada; AN= estimativa da frequência de alelo nulo e EP= probabilidade de exclusão de paternidade; PI= Probabilidade de Identidade.

#### 4.2 Relações de parentesco, FEP e disputa por ninho

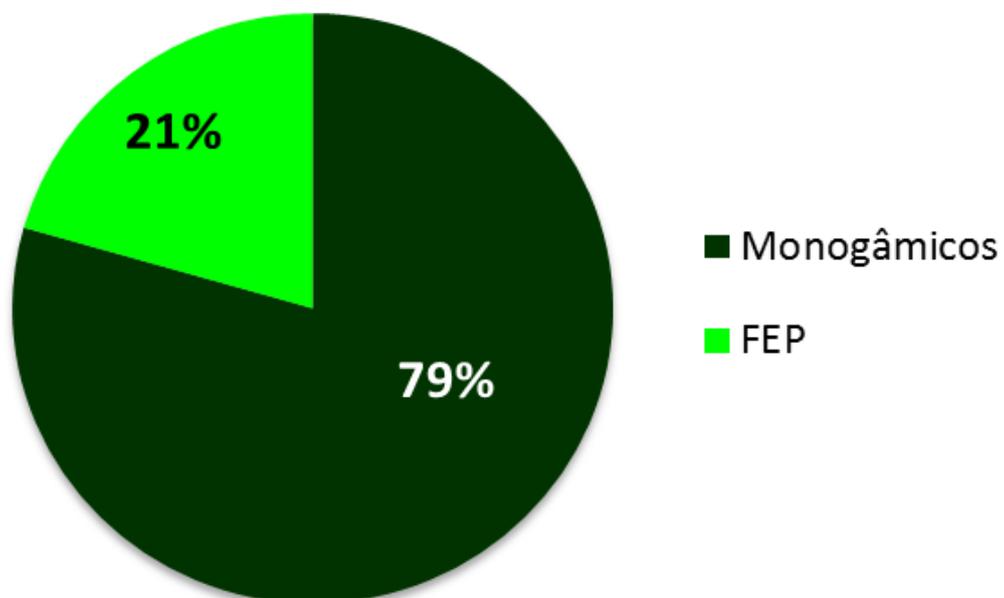
Dentre as 71 comparações da relação de parentesco entre os ninhegos de mesma ninhada, 54 delas (76%) apresentam relação do tipo FS, 14 delas (20%) apresentaram relação do tipo HS e três (4%) do tipo U (Figura 2 e Tabela 4).

Foram considerados casos de FEP quando os ninhegos de um mesmo ninho apresentaram relação de parentesco correspondente a HS, enquanto os casos de disputa por cavidade (competição intraespecífica de ninho) foram considerados quando os ninhegos do mesmo ninho não apresentaram relação de parentesco entre si (U). Portanto, a taxa de

monogamia encontrada nesta espécie foi de 79% dentre os ninhegos analisados e a taxa de FEP encontrada foi de 21% (Figura 3).



**Figura 2.** Porcentagem das relações de parentesco do tipo irmãos (FS), meio-irmãos (HS) e não relacionados (U) entre ninhegos de mesma ninhada de papagaio-de-cara-roxa identificadas a partir do ML-RELATE.



**Figura 3.** Porcentagem de monogamia e de FEP encontrados em *A. brasiliensis*.

**Tabela 4.** Relação de parentesco entre os ninhos de papagaio-de-cara-roxa analisados durante as estações reprodutivas de 1999/2000 a 2013/2014.

Ninho	1999-2000	2000-2001	2001-2002	2002-2003	2003-2004	2004-2005	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	Localidade
CN 1				FS				FS								Ilha Rasa
CN 2						HS										
CN 03							FS									
CN 8						HS		HS				FS			FS	
CN 10						FS	FS	HS								
CN 17							FS	FS								
CN 19							FS	FS	FS					HS		
CN 21								FS								
CN 22								FS								
CN 25								FS				FS	FS		FS	
CN 27								U	HS			HS				
CN 29													FS			
CN 33								HS								
CN 41								FS								
CN 45								FS								
CN 49								FS								
CN 57												FS			FS	
NN 03	FS															
NN 04				FS				FS		U						
NN 25						FS										
NN 75						FS										
NN 82				HS												
NN 83								FS								
NN 99			HS		FS										U	
NN 123					FS	FS		FS								
NN 163					FS											
NN 168						FS										
NN 186						FS										
NN 188						FS										
PVC 20											FS			HS	FS	
<hr/>																
NN 01			FS													Ilha Grande
NN 02					FS											
CN 04					FS											
NN 07			HS													
<hr/>																
NA							FS									Ilha de Peças
NN100			FS													
NN 75							FS									
<hr/>																
NN 02	FS															Ilha das Gamelas
NN 04	FS															
CN 01							HS									
CN 03								FS								
CN 04							FS			HS		FS				
CN 09								FS		FS		FS				

#### 4.3 Reocupação de cavidade

A análise de reocupação de cavidade mostrou que houve taxa de reocupação com média de 83% das cavidades reocupadas ao longo das 12 estações reprodutivas. Os valores referentes a cada estação reprodutiva estão disponíveis na Tabela 5.

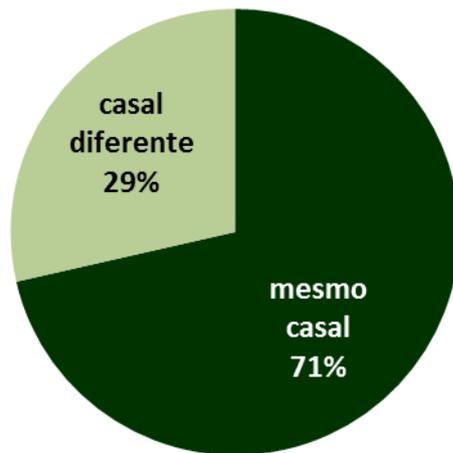
**Tabela 5.** Taxa de reocupação de cavidade ao longo de 12 estações reprodutivas. A estação de 2007-2008 não foi considerada na análise por conta da escassez de dados.

Estação	n	n-1	Reocupação (%)
2002-2004	5	5	100
2003-2005	7	9	78
2004-2006	9	10	90
2005-2007	13	14	93
2008-2010	10	14	71
2009-2011	10	10	100
2010-2012	11	13	85
2011-2013	7	12	58
2012-2014	6	8	75
Média			83

n representa as cavidades reocupadas na estação amostrada e n-1 representa as cavidades ocupadas em n-1 e que ainda estavam disponíveis em n.

#### 4.4 Fidelidade ao ninho

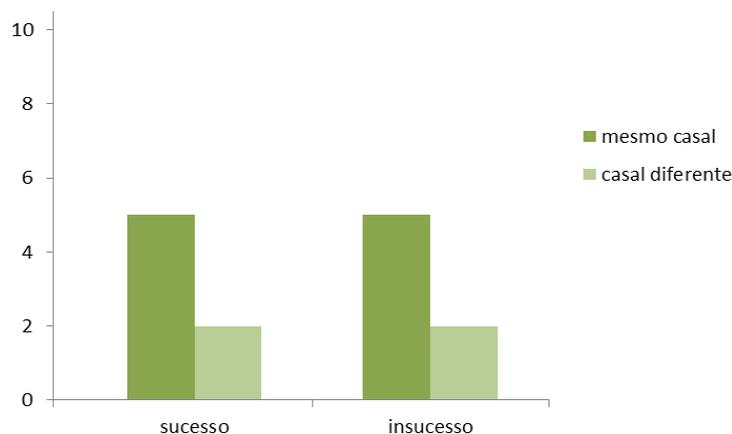
Em alguns casos, as estimativas de relação de parentesco entre os filhotes de estações reprodutivas diferentes não possibilitaram identificar uma clara relação entre os ninhegos, ou seja, se a reocupação foi pelo mesmo casal ou por casal diferente. Em 79 das reocupações, 45 não foram analisadas, pois não havia material coletado devido à perda de ninhada antes do período de monitoramento e em outros 20 não foi possível distinguir com certeza que casal estava ocupando a cavidade. Portanto, a análise de reocupação de cavidade só foi possível de ser realizada em 14 reocupações, as quais foram categorizadas como reocupação pelo mesmo casal e reocupação por casal diferente. Dentre as 14 reocupações foi encontrado que 10 (71%) delas foram realizadas pelo mesmo casal e quatro (29%) foram realizadas por casais diferentes (Figura 4).



**Figura 4.** Porcentagem de reocupação de cavidade pelo mesmo casal e por casal diferente em *Amazona brasiliensis*.

#### 4.5 Influências na reocupação de cavidade

Em relação à influência do insucesso na reocupação de cavidade na estação reprodutiva anterior, observamos que a reocupação de cavidade pelo mesmo casal ocorreu em cinco (50%) dos 10 casos identificados (Tabela 6). A mesma relação foi observada para reocupações de cavidade por casal diferente, onde houve dois em quatro casos identificados de reocupação (50%) precedido de perda de ninhada (Figura 5).



**Figura 5.** Número de ninhos reocupados pelo mesmo casal ou por casal diferente após evento de sucesso ou insucesso na estação reprodutiva anterior.

**Tabela 6.** Relação de ocupação de cavidade ao longo de 12 estações reprodutivas. O contínuo em cinza significa sucessivas reocupações, exceto a estação reprodutiva de 2007-2008 a qual não foi amostrada pela escassez de dados.

Ninho	2002-2003	2003-2004	2004-2005	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	Localidade
CN 1	A1	PT	A1	A1		A1#		?	?				Ilha Rasa
CN 2	A2	A2	A2	B2									
CN8		?		?		PT		?		PT	?		
CN10		A10	?	?									
CN 17			A17	A17		A17			PT	PT			
CN 19			A19	A19		A19	PT	?	PT	*	PT		
CN 25				A25		PT	B25	B25	B25	*	B25		
CN 27			PT	A27		B27	ST	C27	PP	PT	D27		
CN 29			PT	*	*	A29	B29	PT	B29	PT	PT		
CN 57						A57	B57	B57	PP		B57		
NN 04	A4	?	PT	?	?	*	?	?			ST		
NN 25	PT	*	A25	A25	PT								
NN 82	PT	?		?	PP								
NN 99	A99	A99	PT	PT	PP	?	PT	ST	*		?		
NN 123	PT	A123	A123	PT	A123	PT	B123	*	PT				
NN 188		A188	B188										
PVC 20						A20	B20	*	?	?	?		
CN 04	ST	PT	A04	PT		B04		C04	PT	PT			Ilha das Gamelas
CN 09			A09	A09		A09	ST	A09	PT				

As letras (**A, B, C, D**) representam os diferentes casais e os números representam cada ninho específico. O símbolo "?" representa as ninhadas onde não foi possível saber se a ocupação foi feita pelo mesmo casal ou casal diferente. O símbolo \* indica que a cavidade foi ocupada em uma estação reprodutiva, porém não há informações do que ocorreu após a postura. O símbolo # significa que um dos parentais da estação anterior reocupou a dada cavidade.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Sistema reprodutivo

O papagaio de cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é considerada uma espécie socialmente monogâmica (Scherer-Neto 1989), porém não pode ser considerada monogâmia genética já que foi observada uma taxa de FEP de 21%. Griffith e colaboradores (2002) consideram que a verdadeira monogamia genética é quando não ocorre fertilização extra-par.

Dentre as vantagens que uma espécie obtém em ser monogâmica podem ser evidenciado o fato de que este tipo de comportamento reprodutivo leva a um maior sucesso reprodutivo se comparado com espécies poligâmicas, pois dentro da monogamia há parceiro fixo e conseqüentemente um cuidado bi-parental, o que pode aumentar as chances de sobrevivência da prole (Alcock 2009). Em um estudo genético realizado com *Loxia curvirostra*, uma espécie socialmente monogâmica, não foi encontrada qualquer evidência de fertilização extra-par ou parasitismo intra específico de ninho comprovando que esta é uma das poucas espécies tanto monogâmica social quanto monogâmica genética. Não se sabe ao certo os motivos para esta espécie apresentar este comportamento, porém, este comportamento pode estar relacionado ao fato de que esta espécie vive em locais de baixa temperatura e níveis altos de neve durante o período reprodutivo. Estas condições climáticas podem contribuir tanto para o aumento do cuidado bi-parental para o sucesso reprodutivo quanto a necessidade de alocar muito tempo para a manutenção e sobrevivência, reduzindo o tempo disponível para a procura de copula extra-par (Kleven *et al.* 2008).

Os casos de fertilização extra-par em *Amazona brasiliensis* pode mudar o conceito generalizado de que esta espécie, assim como todas as espécies de *Amazona*, é sexualmente monogâmica (Scherer-Neto 1989). No entanto, desde que a aplicação de técnicas moleculares vem sendo utilizada para análise de parentesco, está cada vez mais possível encontrar novos casos de poligamia em Psittacidae, uma vez que já foram encontrados casos de FEP em outras espécies de aves socialmente monogâmicas (Griffith 2002). Existem várias

hipóteses teóricas que explicam porque uma fêmea busca a FEP, entre elas: a hipótese da fertilidade, que considera que uma fêmea apresenta este tipo de comportamento para se proteger contra uma provável infertilidade do seu parceiro social (Wetton & Parkin 1991; Sheldon 1994), sendo que neste caso, as fêmeas não conseguem avaliar a fertilidade dos machos, portanto encontrar outro parceiro fértil ocorre de forma aleatória; e a hipótese da Diversidade Genética, que se baseia na teoria de que as fêmeas procuram FEP para maximizar a diversidade genética entre os seus descendentes. No entanto, nesta última, as fêmeas não conseguem avaliar o grau de similaridade genética entre si e seus parceiros potenciais (Williams 1975; Westneat *et al.* 1990). Outra hipótese é a de compatibilidade genética, onde as fêmeas procuram FEP para maximizar a compatibilidade genética entre si e o pai da prole. Neste caso, as fêmeas conseguem avaliar o grau de similaridade genética entre elas e seus potenciais parceiros através de sinais fenotípicos (Kempnaers *et al.* 1999; Tregenza & Wedell 2000). A hipótese dos Genes Bons sugere que as fêmeas procuram FEP para obter genes bons para sua prole, e as fêmeas podem avaliar a qualidade genética dos seus parceiros potenciais através de sinais fenotípicos (Moller 1988; Hamilton 1990; Westneat *et al.* 1990; Birkhead & Moller 1992). E por fim a hipótese de benefício direto onde as fêmeas procuram FEP para obter recursos (não genéticos) para sua prole, e as fêmeas podem avaliar os recursos mantidos por seus potenciais parceiros (Wolf 1975; Burke *et al.* 1989; Colwell & Oring 1989).

Contudo, dentre estas hipóteses, apenas a hipótese dos “Genes Bons” e a hipótese de “Compatibilidade Genética” receberam suporte empírico robusto e continuam a ser apresentadas como explicação para a ocorrência de FEP na maior parte das aves estudadas (Griffiths *et al.* 2002).

Em Psittacidae, já foram encontradas evidências genéticas de FEP em *Psittacula eques* (Taylor & Parkin 2009) e em *Myiopsitta monachus* (Martínez *et al.* 2013). Porém, em nenhum destes estudos, os resultados observados foram associados a alguma das hipóteses previamente descritas, provavelmente pela falta de informações que permitissem esta associação.

De forma similar, são várias as hipóteses que podem justificar os casos de FEP em *Amazona brasiliensis*, porém nenhuma dessas hipóteses foi testada para esta espécie. Portanto, são necessários mais estudos acerca deste assunto e que possam elucidar esta questão.

Dentre as relações de parentesco foi possível observar também uma taxa de 4% correspondente a indivíduos não relacionados (U) que podem sugerir casos de disputa por cavidade. Uma espécie pode competir por cavidade quando há pouca disponibilidade de cavidades adequadas para nidificar (Bonebrake & Beissinger, 2010). Desta forma, casos de disputa intraespecífica por cavidade também foram observados em outras espécies de Psittacidae (Berkusky & Rebores, 2009; Bonebrake & Beissinger, 2010; Britt, 2011), inclusive em *Amazona aestiva* (Berkusky & Rebores, 2009). Em *Forpus passerinus*, foi encontrado competição intraespecífica por cavidade envolvendo infanticídio. Neste último caso, a competição estava diretamente ligada aos ninhos mais produtivos que eram monopolizadas no início da temporada e, por isso, eram sujeitos a forte competição intraespecífica (Bonebrake & Beissinger, 2010). Em *Amazona brasiliensis*, não foram encontrados registros de infanticídio, porém esta competição pode estar ligada a ninhos de alta qualidade. Desde que o Projeto Papagaio de cara-roxa foi criado, vem ocorrendo melhorias nos locais de nidificação como o monitoramento periódico evitando a retirada dos filhotes por traficantes e a implantação e contínuo aumento de caixas-ninho que aumenta a disponibilidade de cavidade. No entanto, essas melhorias podem ser insuficientes e pode refletir ainda a falta de cavidades naturais, pois esta espécie possui uma aceitação bem alta por ninhos artificiais (Abbud 2013).

Vale ressaltar, no entanto, que estes resultados podem conter erros associados, tanto do tipo I, ou seja, rejeitar a H<sub>0</sub> quando de fato ela é verdadeira, como erro do tipo II, quando se aceita H<sub>0</sub> sendo ela falsa. Portanto, este fato pode ter influência sobre os números estimados. O fato de não ter os indivíduos parentais presentes na análise também pode contribuir para a diminuição da acurácia nos resultados.

## 5.2 Reocupação de cavidade e Fidelidade ao ninho

O fato da inferência das relações de parentesco ser uma abordagem realizada somente com amostras de ninhegos, ou seja, sem os indivíduos parentais, dificultou um pouco a análise de fidelidade ao ninho, pois muitos eventos de ocupação de cavidade foram retirados da análise por não sabermos ao certo que casal ocupou a cavidade. Esta questão pode levar a uma inferência equivocada nas relações de parentesco entre os ninhegos de estações sucessivas, pois não ter os indivíduos parentais pode diminuir a acurácia nas análises.

A reocupação de cavidades pelos casais de *A. brasiliensis* foi a mais alta já descrita na literatura para este gênero (Fernandes-Seixas & Mourão 2002; Koenig 2001; Enkerlin-Hoeflich 1995; Renton & Salinas-Melgoza 1999; Rodriguez Castillo & Eberhard 2006; White *et al.* 2005; Berkunsky & Reboresda 2008). Rodriguez Castillo & Eberhard (2006) encontraram uma taxa de 74% de reocupação de ninhos por *Amazona ochrocephala*. Berkunsky & Reboresda (2008) também encontraram níveis altos de reocupação de cavidade, onde 68% das fêmeas anilhadas de *Amazona aestiva* utilizaram a mesma cavidade por um ou dois anos consecutivos. E ainda, segundo estes autores, essa taxa de reocupação pode estar relacionada ao sucesso na estação anterior, uma vez que o insucesso pode afetar negativamente a escolha da fêmea pela cavidade. Neste estudo, a alta taxa de reocupação pode ser devido à qualidade das cavidades proporcionadas pela espécie vegetal mais utilizada para este fim pelo *A. brasiliensis*. O guanandi (*Calophyllum brasiliense*) é uma espécie arbórea que atinge até 30m de altura, até 60 cm de diâmetro e é resistente ao declínio da qualidade ao longo do tempo (Gatsuk *et al.* 1980). Em *A. aestiva*, a diferença na taxa de reocupação pode estar ligada ao declínio da qualidade do ninho, pois na região do Pantanal, a taxa de reocupação foi de 38% e neste caso as cavidades utilizadas eram de palmeiras (Seixas & Mourão 2002), já na região de floresta decídua na Argentina foi registrada uma taxa de reocupação pra mesma espécie de 62% e os ninhos utilizados estavam situados em quebracho-branco (*Aspidosperma quebracho-blanco*) e quebracho-vermelho (*Schinopsis lorentzii*) (Berkunsky & Reboresda 2008), árvores com características parecidas com o guanandi.

### 5.3 Influência da perda da ninhada na reocupação de cavidade

Os valores encontrados do cruzamento de dados genéticos e de campo parecem não ser significativos em relação à perda de ninhada na estação anterior influenciar um casal na reocupação de uma dada cavidade na estação seguinte, pois os valores foram os mesmos tanto para sucesso e insucesso, independente se a reocupação foi pelo mesmo casal ou por casal diferente.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos dados analisados nós concluímos que:

*Amazona brasiliensis* não pode ser considerada uma espécie monogâmica genética, já que a taxa de FEP foi de 21%, ou seja, bem acima do esperado para uma espécie monogâmica;

*Amazona brasiliensis* reocupa bem as cavidades em estações reprodutivas sucessivas, pois foi observada a maior taxa de reocupação (83%) já descrita para o gênero;

*Amazona brasiliensis* apresenta um padrão de fidelidade ao ninho, uma vez que a maior parte dos casais analisados ocupa a mesma cavidade nas estações reprodutivas seguintes e

A perda de ninhada na estação reprodutiva anterior não parece influenciar a reocupação da cavidade na estação seguinte.

## REFERÊNCIAS

- Abbud MC (2013) Reprodução e conservação do Papagaio-de-cara-roxa *Amazona brasiliensis* (Linnaeus, 1758) (Aves: Psittacidae) no Litoral Norte do Estado do Paraná. Universidade Federal do Paraná.
- Aitken KEH, Wiebe KL, Martin K (2002) Nest-site reuse patterns for a cavity-nesting bird community in interior British Columbia. *Auk*, **119**, 391–402.
- Alcock, J. (2009). *Animal behavior: an evolutionary approach*. 9<sup>o</sup> ed. Sinauer.
- Bai ML, Severinghaus LL (2012) Disentangling site and mate fidelity in a monogamous population under strong nest site competition. *Animal Behaviour*, **84**, 251-259.
- Berkunsky I, Reboreda JC (2009) Nest-site fidelity and cavity reoccupation by Blue-fronted Parrots *Amazona aestiva* in the dry Chaco of Argentina. *Ibis*, **151**, 145-150.
- Birkhead TR, Møller AP (1992) Sperm Competition in Birds. Academic Press, London.
- Birkhead TR, Møller AP (1996) Monogamy and sperm competition in birds. In: Partnerships in Birds (ed. Black JM). Oxford University Press, Oxford.
- Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TREE*, **18**, 503–511.
- Bonebrake TC, Beissinger SR (2010) Predation and infanticide influence ideal free choice by a parrot occupying heterogeneous tropical habitats. *Oecologia*, **163**, 385-393.
- Brightsmith DJ (2005) Competition, predation and nest niche shifts among tropical cavity nesters: phylogeny and natural history evolution of parrots (Psittaciformes) and trogons (Trogoniformes). *Journal of Avian Biology*, **36**, 64–73.
- Brown JL (1987) Helping and communal breeding in birds. NJ: Princeton University Press, Princeton.
- Buckleton J, Triggs CM, Walsh SJ (2005) Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Britt CR (2011) NEST SURVIVAL AND NEST-SITE SELECTION OF SCARLET MACAWS (*Ara macao cyanoptera*) IN THE MAYA BIOSPHERE RESERVE OF GUATEMALA AND CHIQUIBUL FOREST OF BELIZE. New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico
- Burke T (1989) DNA fingerprinting and other methods for the study of mating success. *Trends in Ecology and Evolution*, **4**, 139-144.
- Carvalho CS, Carvalho MA, Collevatti RG (2013) Identificando o sistema de acasalamento em aves. *Genética na Escola*, **8(1)**, 10-17.
- Castillo AR, Eberhard J (2006) Reproductive behavior of the yellow-crowned parrot (*Amazona ochrocephala*) in Western Panama. *The Wilson Journal of Ornithology*, **188**, 225-236.
- Caparroz R, Guedes NMR, Bianchi CA, Wajntal A (2001) Analysis of the genetic variability and breeding behaviour of wild populations of two Macaw species (Psittaciformes, Aves) by DNA fingerprinting. *Ararajuba*, **9(1)**, 43-49.
- Caparroz R, Leite KCE, Chinalia LA, Miyaki CY, Collevatti RG (2007) Characterization of microsatellite loci in three species of *Amazona* (Psittaciformes) using heterologous primers. *Ornitologia Neotropical*, **18**, 439-444.
- Caparroz R, Miyaki CY & Baker AJ (2010) Genetic evaluation of the mating system in the blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*, Aves, Psittacidae) by DNA fingerprinting. *Genetics and molecular biology*, **34(1)**, 161–164
- Caparroz R (em preparação) Sibship reconstruction permits the investigation of aspects of genetic monogamy and nest site fidelity in the Blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittaciformes: Aves).
- Cockburn A (2006) Prevalence of different modes of parental care in birds. *Proceedings of the Royal Society of London B*. **273**, 1375–1383.
- Colwell MA, Oring LW (1989) Extra-pair paternity in the spotted sandpiper: a female mate acquisition tactic. *Animal Behaviour*, **38**, 675-684.
- Coulson JC (1972) The influence of the pair bond in the kittiwake. *Proceeding of the International Ornithological Congress*, **15**, 424-433.
- Correa Dias RIS (2011) Biologia reprodutiva e socialidade no pica-pau-do-campo (*Colaptes campestris campestris*). Dissertação de doutorado apresentada ao Programa de pós Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília.
- Cotterman CW (1941) Relatives and human genetic analysis. *Sci Month*, **53**, 227-34.
- Davies NB (1989) Sexual conflict and the polygamy threshold. *Animal Behaviour*, **38**, 226-234.
- Delhey K, Johnsen A, Peters A, Andersson S, Kempenaers B (2003) Paternity analysis reveals opposing selection pressures on crown coloration in the blue tit (*Parus caeruleus*). *The Royal Society*, **270**, 2057-2063.

- Enkerlin-Hoeflich EC (1995) Comparative ecology and reproductive biology of three species of Amazona parrots in northeastern Mexico. PhD dissertation, Texas A & M University, Kingsville.
- Ekstrom JMM, Burke T, Randrianaina L, Birkhead TR (2007) Unusual sex roles in a highly promiscuous parrot: the Greater Vasa Parrot *Caracopsis vasa*. *Ibis*, **149**, 313-320.
- Forshaw JM, Cooper WT (1977) Parrots of the world. Willoughby: Lansdowne Press.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de genética da conservação. SBG: Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 34-223.
- Gatsuk LE, Smirnova OV, Vorontzova I, Zaugolnova LB, Zhukova LA (1980) Age states of plants of various growth forms: a review. *Journal of Ecology*, **68**, 675-696.
- Goodnow ML, Reitsma LR (2011) Nest-site selection in the Canada Warbler (*Wilsonia canadensis*) in central New Hampshire. *Canadian Journal of Zoology*, **89**, 1172-1177.
- Griffith SC, Owens IPF, Thuman KA (2002) Extrapair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptative function. *Molecular Ecology*, **11**, 2195-2212.
- Guo SW, EA Thompson (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Haig SM, Mace TR, Muluns TD (2003) Parentage and relatedness in polyandrous Comb-crested jacanas using ISSRs. *Journal of Heredity*, **94**, 302-309.
- Hamilton WD (1990) Mate choice near and far. *American Zoologist*, **30**, 341-352.
- Heinsohn R, Ebert D, Legge S, Peakall R (2007) Genetic evidence for cooperative polyandry in reversy dichromatic *Electus* parrots. *Animal Behaviour*, **74**, 1047-1054.
- Hsu YC, Li SH, Lin YS, Philippart MT, Severinghaus II (2006) High frequency of extra-pair copulation with low level of extra-pair fertilization in the Lanyu scops owl *Otus elegans botelensis*. *Journal of Avian Biology*, **37**, 36-40.
- ICMBio (2013) Instituto Chico Mendes. <http://www.icmbio.gov.br/portal/> Acesso dia 23/05/2014.
- Ingold DJ (1991) Nest-site fidelity in Red-headed and Red-bellied Woodpeckers. *Wilson Bulletin*, **103**, 118-122.
- IUCN (2014) The IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org/> Acesso dia 23/05/2014.
- Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratter NL (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology*, **10**, 6-30.
- Kalinowski ST, Wagner AARP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology*, **6**, 576-579.
- Kalinowski ST (2008) User's Manual for ML-Relate. Department of Ecology Montana State University Bozeman, MT 59717.
- Kempnaers B, Congdon B, Boag P, Robertson RJ (1999) Extrapair paternity and egg hatchability in tree swallows: evidence for the genetic compatibility hypothesis? *Behavioural Ecology*, **10(3)**, 304-311.
- Klauck NK, Segelbacher G, Schaefer HM (2013) Reproductive success depends on the quality of helpers in the endangered, cooperative El Oro parakeet (*Pyrrhura orcesi*). *Molecular Ecology*, **22**, 2011-2027.
- Kleven O, Bjerke B-A, Lifjeld JT (2008) Genetic monogamy in the Common Crossbill (*Loxia curvirostra*). *J Ornithol*, **149**, 651-654.
- Koenig SE (2001) The breeding biology of Black-billed Parrot *Amazona agilis* and Yellow-billed Parrot *Amazona collaria* in Cockpit Country Jamaica. *Bird Conservation International*, **11**, 205-225.
- Leite KCE (2007) Análise da estrutura genética e biologia reprodutiva do Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). *Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Brasília*.
- Lynch M, Walsh B (1998) Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Martínez JJ, Aranzamendi MC, Macello JF, Bucher EH (2013) Genetic evidence of extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the monk parakeet. *Frontiers in Zoology*, **10**, 68-74.
- Masello JF, Quillfeldt P (2002) Chick growth and breeding success of the burrowing parrot. *The Condor*, **104**, 574-586.
- Mauck RA, Marschall EA, Parker PG (1999) Adult survival and imperfect assessment of parentage: effects on male parenting decisions. *American Naturalist*, **154**, 99-109.
- Mazgajski TD (2007) Effect of old nest material on nest site selection and breeding parameters in secondary hole nesters – A review. *Acta Ornithol*, **42**, 1-14.
- Miller KE (2002) Nesting success of the Great Crested Flycatcher in nest boxes and in tree cavities: are nest boxes safer from nest predation? *Wilson Bulletin*, **114**, 179-185.

- MMA/IBAMA (2014) Ministério do meio ambiente/ Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais <http://www.ibama.gov.br/> Acesso dia 23/05/2014.
- Moller AP (1988) Female choice selects for male sexual ornaments in the monogamous swallow. *Nature*, **332**, 640-642.
- Moreno J, Boto L, Fargallo JA, de Leon A, Potti J (2000) Absence of extra-pair fertilizations in the chinstrap penguin *Pygosceles antarctica*. *Journal of Avian Biology*, **31**, 580-583.
- Muller W, Epplen JT, Lubjuhn T (2001) Genetic paternity analyses in little owls (*Athene noctua*): Does the high rate of parental care select against extra-pair young? *Journal of Ornithology*, **142**, 195-203.
- Potts WK, Mannig CJ, Wakeland EK (1991) Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature*, **352**, 619-621.
- Quillfeldt P, Schmoll T, Epplen JT, Lubjuhn T (2001) Genetic monogamy in Wilson's storm-petrel. *Auk*, **118**, 245-251.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Renton K, Salinas-Melgoza A (1999) Nesting behavior of lilac-crowned parrot. *Wilson Bulletin*, **111**(4), 488-493.
- Russello M, Calcagnotto D, De-Salle R, Amato G (2001) Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology*, **1**, 162-164.
- Russello M, Lin K, Amato G, Caccone A (2005) Additional microsatellite loci for the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Conservation Genetics*, **6**, 643-645.
- Scherer-Neto P (1989) Contribuição á biologia reprodutiva do Papagaio-de-cara-roxa *Amazona brasiliensis* (Linnaeus, 1758) (Psittacidae, Aves). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; Geneva.
- Schunk F, Somenzari M, Lugarini C, Soares ES, e colaboradores (2011) Plano de ação nacional para a conservação dos papagaios da Mata Atlântica. Série Espécies Ameaçadas nº 20, Brasília, 86-92.
- Seixas GLF, Mourão GM (2002) Nesting success and hatching survival of the Blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal of Field Ornithology*, **73**(4), 399-409.
- Sheldon BC (1994) Male phenotype, fertility, and the pursuit of extra-pair copulations by female birds. *Proceedings of the Royal Society, London, Series B*, **257**, 25-30.
- Sipinski EAB, Bóçon R (2008) Conservação do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no litoral do estado do Paraná. *Biologia da Conservação*, UPF editora, 257-273.
- Snyder NFR, Wiley JW, Kepler CB (1987) The Parrots of Luquillo. Natural History and Conservation of the Puerto Rican parrot. Los Angeles: Western Foundation of Vertebrate Zoology.
- Sobotka DD (2011) Comportamento de casais e estudo de paternidade em uma parcela da população de Bicuinhos-do-brejo (*Stymphalornis acutirostris*-Thamnophilidae-Aves), em Guaratuba, Paraná, Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná.
- Sonerud GA, (1989) Reduced predation by pine martens on nests of Tengmalm's owl in relocated boxes. *Animal Behavior*, **37**, 332-343.
- Sopon TR, Millam JR, Owing DH (2007) Behavioral compatibility, extrapair copulation and mate switching in a socially monogamous parrot. *Animal Behaviour*, **73**, 815-824.
- SOS Mata Atlântica/INPE/ISA (1998). Atlas da Evolução dos Remanescentes Florestais e Ecossistemas Associados no Domínio Mata Atlântica no Período 1990-1995. São Paulo. SOS Mata Atlântica / INPE / ISA. 54p.
- Taylor TD, Parkin DT (2009) Preliminary evidence suggests extra-pair mating in the endangered echo parakeet, *Psittacula eques*. *African Zoo*, **44**, 71-74.
- Tautz, D., & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, **12**(10), 4127-4138.
- Tautz, D., & Schlötterer, C. (1994). Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*, **4**(6), 832-837.
- Theuerkauf J, Rouys S, Mériot JM, Gula R, Kuehn R (2009) Cooperative breeding, mate guarding, and nest sharing in two parrot species of New Caledonia. *Journal of Ornithology*, **150**, 791-797.
- Tortato FR, Bonanomi J (2012) Disputa por cavidade entre *Anodorhynchus hyacinthinus* (Latham, 1790) (Psittacidae) e *Tyto Alba* (Scopoli, 1769) (Tytonidae) na região do Pantanal de Paiguás, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, **20**(1), 22-25.

- Tregenza T, Wedell N (2000) Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: an invited review. *Molecular Ecology*, **9**, 1013-1027.
- Wagner H W, Sefc K M (1999) IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.
- Waltman JR, Beissinger SR (1992) Breeding behavior of the Green-rumped parrotlet. *Wilson Bulletin*, **104(1)**, 65-84.
- Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P, Valero M (1998) Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, **7**, 1569-1573.
- Westneat DF (1990) Genetic parentage in the indigo bunting: a study using DNA fingerprinting. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **27**, 67-76.
- Westneat DF, Sherman PW, Morton ML (1990) The ecology and evolution of extra-pair copulations in birds. In: Current Ornithology, (ed. Power DM), pp. 331-369. Plenum Press, New York.
- Wetton JH, Parkin DT (1991) An association between fertility and cuckoldry in the house sparrow *Passer domesticus*. *Proceedings of the Royal Society, London, Series B*, **245**, 227-233.
- Williams GC (1975) Sex and Evolution. Princeton University Press, Princeton.
- White TH, Abreu-González W, Toledo-González M, Torres-Báez P (2005) From the Field: artificial nest cavities for *Amazona* parrots. *Wildlife Society Bulletin*, **33(2)**, 756-760.
- Wolf LL (1975) 'Prostitution' behaviour in a tropical humming-bird. *Condor*, **77**, 140-144.
- Wright TF, Toft CA, Enkerlin-Hoeflich E, Gonzalez-Elizondo J, Albornoz M, Rodríguez-Ferraro A (2001) Nest poaching in Neotropical Parrots. *Conservation Biology*, **15(3)**, 710-720.

## ANEXO 1

### PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO SDS-PROTEINASE K

➤ Preparação das amostras:

Preparar o mix de extração:

Reagentes	Para cada indivíduo
TNE 1X	300 µl
Tris HCl (pH 7,5)	30 µl
Proteinase K	30 µl
SDS 20%	10 µl
Total	370 µl

Obs: o mix do passo 4 deve ser preparado um dia antes dos procedimentos.

➤ Procedimentos:

1. Macerar o capilar contendo sangue e acrescentar o mix SDS 20%;
2. Inverter cada tubo por **15 seg**;
3. Incubar no termo bloco (ou em banho-maria) a 55°C por **4hs** ou 42°C over night;
4. Deixar esfriar e colocar o mesmo volume de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) (250:240:10);
5. Vortexar cada tubo por **20 seg**;
6. Centrifugar a 12.000 rpm por **10 min**;
7. Retirar o sobrenadante cuidadosamente para não pegar contaminantes e colocar em tubos de 1,5 (previamente enumerados);
8. *Se tiver sujeira repetir o procedimento*;
9. Ao sobrenadante colocar de 2 a 3 volumes de Etanol absoluto para precipitar o DNA (~800 µl);
10. Inverter o tubo levemente até o DNA precipitar (deve ficar um emaranhado branco);
11. Centrifugar por 5 min a 12.000 rpm;
12. Descartar o sobrenadante cuidadosamente;
13. Acrescentar 300 µl de Etanol 70% ao pellet e dar uma leve agitada para resuspendê-lo;
14. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min;
15. Descarte todo o Etanol e deixe o pellet secar por completo;
16. Resuspender o pellet com 50 µl de Tampão de Eluição (TE);
17. Deixe na geladeira de um dia para o outro;
18. Se houver necessidade, deixe no termo bloco (ou em banho-maria) por 30 min a 37°C antes de quantificar.

## ANEXO 2

**Anexo 2:** Relação de todos os indivíduos utilizados neste trabalho e seus respectivos genótipos. Na coluna “Abordagem” está representado o tipo de abordagem na qual cada indivíduo fez parte: CGP-caracterização genética da população; FN-fidelidade ao ninho; IR-influência na reocupação de cavidade; MG-monogamia; RC-reocupação de cavidade.

Ninho	Estação Reprodutiva	nº UCB	Abordagem	AgGT83	AgGT21	AgGT12	AgGT81	AgGT07	AgGT22	AgGT72	AgGT29	AgGT08	Localidade
CN 1	<b>2003-2004</b>	5425	MG/RC	259/263	309/313	296/300		267/269	191/193	271/271	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 1	<b>2003-2004</b>	5426	CGP/MG/RC	257/259	309/313	296/300	331/337		195/195	271/271	186/212		Ilha Rasa
CN 1	<b>2003-2004</b>	5427	MG/RC	257/259	309/313	296/300		267/269	199/199	271/271	186/212	322/322	Ilha Rasa
CN 1	<b>2005-2006</b>	5840	FN/IR/MG/RC	257/261	309/315	298/298		265/269	199/199	271/271	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 1	<b>2006-2007</b>	174	FN/IR/MG/RC	259/261	309/313	296/296		267/269	191/193	271/271	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 1	<b>2006-2007</b>	176	FN/IR/MG/RC	255/257	309/313	296/302		265/269	199/199	271/279	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 1	<b>2006-2007</b>	177	FN/IR/MG/RC	259/261	309/313	296/296		267/269	191/193	271/271	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 1	<b>2008-2009</b>	566	MG/RC	259/267	313/319	296/298	333/337	263/265	193/193	271/279	186/186		Ilha Rasa
CN 1	<b>2010-2011</b>	716	MG/RC	255/257	309/313	296/296	329/339	267/277	199/199	281/281	186/212		Ilha Rasa
CN 1	<b>2011-2012</b>	771	MG/RC	255/257	313/313	296/296	335/337	269/277	199/199	279/279	186/212		Ilha Rasa
CN 2	<b>2003-2004</b>	5431	FN/MG/RC	263/265	315/335	296/296		265/271	189/199	279/279	186/186	322/330	Ilha Rasa
CN 2	<b>2004-2005</b>	5650	FN/IR/MG/RC	253/265	315/335	296/302		265/269	193/199	279/279	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 2	<b>2004-2005</b>	5651	FN/IR/MG/RC	255/265	309/315	296/296		265/271	199/199	279/279	186/186	322/330	Ilha Rasa
CN 2	<b>2005-2006</b>	5841	FN/IR/MG/RC	261/263	309/329	296/302		265/271	191/199	279/279	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 2	<b>2006-2007</b>	173	RC	261/263	315/315	296/296		267/269	189/189	277/279	186/204	322/322	Ilha Rasa
CN 2	<b>2006-2007</b>	175	CGP/RC	261/263	327/333	296/296		261/269	199/199	279/279	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN 03	<b>2005-2006</b>	5856	MG	249/253	309/319	296/296		265/265	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 03	<b>2005-2006</b>	5857	CGP/MG	249/253	309/319	296/296		265/265	199/199	279/279	186/204	322/330	Ilha Rasa
CN8	<b>2004-2005</b>	5652	CGP/MG/RC	245/257	309/323	296/296	329/337	267/269	199/199	279/279	186/202	330/358	Ilha Rasa
CN8	<b>2004-2005</b>	5653	MG/RC	255/255	315/319	296/300	329/337	265/267	187/191	279/279	202/212	330/330	Ilha Rasa
CN8	<b>2006-2007</b>	184	MG/RC	255/261	309/327	296/296	317/337	265/269	185/191	271/279	186/202	322/330	Ilha Rasa
CN8	<b>2006-2007</b>	185	MG/RC	245/257	327/335	296/296	317/345	265/267	185/191	271/277	186/208	322/330	Ilha Rasa
CN8	<b>2006-2007</b>	186	MG/RC	255/261	309/319	296/296	317/337	265/267	185/191	277/279	186/208	322/322	Ilha Rasa

CN8	<b>2010-2011</b>	723	MG/RC	257/261	309/327	296/296	329/337	265/267	185/191	279/279	186/202	Ilha Rasa	
CN8	<b>2010-2011</b>	724	MG/RC	257/261	319/335	296/296	317/337	265/267	185/191	281/281	186/208	Ilha Rasa	
CN8	<b>2010-2011</b>	725	MG/RC	255/261	319/335	296/296	329/345	265/267	185/191	279/279	186/208	Ilha Rasa	
CN8	<b>2013-2014</b>	883	MG/RC	245/259	311/327	298/298	317/337	265/267	199/199	277/279	186/186	Ilha Rasa	
CN8	<b>2013-2014</b>	884	MG/RC	245/257	309/327	296/296	317/317	265/267	199/199	277/279	186/186	Ilha Rasa	
CN10	<b>2004-2005</b>	5655	MG/RC	265/265	315/331	296/302		265/267	185/185	271/279	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN10	<b>2004-2005</b>	5656	MG/RC	265/265	323/329	296/296		267/269	199/199	271/279	186/212	322/330	Ilha Rasa
CN10	<b>2005-2006</b>	5837	MG/RC	253/263	329/331	296/302		265/269	185/185	279/279	186/210	322/322	Ilha Rasa
CN10	<b>2005-2006</b>	5838	MG/RC	253/263	315/323	296/296		265/269	185/185	279/279	186/210	322/322	Ilha Rasa
CN10	<b>2006-2007</b>	191	MG/RC	263/263	315/323	296/302		269/269	185/185	271/279		322/330	Ilha Rasa
CN10	<b>2006-2007</b>	192	MG/RC	253/265	323/329	296/296		267/269	185/185	279/279	186/204	322/322	Ilha Rasa
CN10	<b>2006-2007</b>	193	CGP/MG/RC	263/263	329/331	296/296		267/269	185/185	279/279	208/210	322/322	Ilha Rasa
CN 17	<b>2005-2006</b>	5850	FN/MG/RC	255/267	319/329	296/296	339/343	271/277	199/199	271/279	186/198		Ilha Rasa
CN 17	<b>2005-2006</b>	5851	FN/MG/RC	263/267	319/329	296/296	339/343	265/271	199/199	271/279	212/212		Ilha Rasa
CN 17	<b>2006-2007</b>	196	CGP/FN/IR/MG/RC	263/267	319/329	296/296	317/329	265/271	199/199	271/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 17	<b>2006-2007</b>	197	FN/IR/MG/RC	263/267	319/329	296/296		265/271	185/185	271/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 17	<b>2006-2007</b>	198	FN/IR/MG/RC	263/267	319/329	296/296		265/271	199/199	271/279	186/212	322/322	Ilha Rasa
CN 17	<b>2008-2009</b>	539	MG/RC	255/267	319/319	296/296	329/343	265/271	185/185	271/279	198/212		Ilha Rasa
CN 19	<b>2005-2006</b>	5844	CGP/FN/IR/MG/RC	263/265	313/315	296/302	335/335	265/267	185/189	271/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 19	<b>2005-2006</b>	4845	FN/IR/MG/RC	263/265	313/315	296/302		265/267	199/199	271/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 19	<b>2006-2007</b>	199	FN/IR/MG/RC	263/265	313/315	296/306	339/339	265/265	199/199	271/279	186/210	322/322	Ilha Rasa
CN 19	<b>2006-2007</b>	200	FN/IR/MG/RC	263/265	313/315	296/306		265/267	185/189	271/279	186/210	322/322	Ilha Rasa
CN 19	<b>2006-2007</b>	201	FN/IR/MG/RC	263/265	313/315	296/306		267/267	185/189	271/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 19	<b>2008-2009</b>	542	MG/RC	263/263	313/315	296/306	335/339	267/267	199/199	271/279	186/186		Ilha Rasa
CN 19	<b>2008-2009</b>	543	MG/RC	263/263	315/335	296/300	335/339	265/265	187/191	271/271	186/186		Ilha Rasa
CN 19	<b>2012-2013</b>	792	MG/RC	259/259	309/315	296/296	329/339	269/271	195/199	271/279	210/212		Ilha Rasa
CN 19	<b>2012-2013</b>	793	MG/RC	257/265	313/315	296/300	339/339	265/269	199/199	279/279	210/212		Ilha Rasa
CN 21	<b>2006-2007</b>	202	MG	255/267	315/333	296/306		265/281	185/189	271/279		322/322	Ilha Rasa
CN 21	<b>2006-2007</b>	203	CGP/MG	255/267	319/333	296/306		265/281	199/199	271/279	186/204	322/322	Ilha Rasa

CN 22	<b>2006-2007</b>	204	CGP/MG	263/267	313/315	296/302		265/265	191/199	279/279	204/210	322/322	Ilha Rasa
CN 22	<b>2006-2007</b>	205	MG	257/267	313/315	296/302		265/265	199/199	279/279	212/212	322/330	Ilha Rasa
CN 25	<b>2006-2007</b>	206	MG/RC	255/257	309/333	296/302		267/267	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 25	<b>2006-2007</b>	207	CGP/MG/RC	255/257	309/333	296/302		267/281	199/199	279/279	186/210	322/322	Ilha Rasa
CN 25	<b>2006-2007</b>	208	MG/RC	255/257	309/333		337/339	267/277	197/197	279/279	186/210	322/322	Ilha Rasa
CN 25	<b>2009-2010</b>	609	FN/IR/MG/RC	245/263	309/319	296/300	345/345	265/265	185/191	271/285	186/202		Ilha Rasa
CN 25	<b>2010-2011</b>	707	FN/IR/MG/RC	263/267	315/335	296/296	335/345	265/267	185/189	275/285	186/202		Ilha Rasa
CN 25	<b>2010-2011</b>	708	FN/IR/MG/RC	263/267	309/315	296/300	345/345	265/267	187/193	271/277	186/202		Ilha Rasa
CN 25	<b>2010-2011</b>	709	FN/IR/MG/RC	245/263			345/345				186/186		Ilha Rasa
CN 25	<b>2011-2012</b>	768	FN/IR/MG/RC	245/263	309/315	296/300	345/345	267/269	191/191	271/287	184/184		Ilha Rasa
CN 25	<b>2011-2012</b>	769	FN/IR/MG/RC	245/263	309/315	296/296	335/337	265/267	185/185	271/287	186/202		Ilha Rasa
CN 25	<b>2011-2012</b>	770	FN/IR/MG/RC	263/267	309/315	296/300	335/337	267/267		271/277	186/200		Ilha Rasa
CN 25	<b>2013-2014</b>	899	MG/RC	263/267	315/335	296/296	335/345	265/265	185/189	271/271	186/202		Ilha Rasa
CN 25	<b>2013-2014</b>	900	MG/RC	263/267	315/335	296/300	337/345	265/265	185/191	277/285	186/186		Ilha Rasa
CN 25	<b>2013-2014</b>	901	MG/RC	263/267	309/319	296/296	337/345	265/267	185/189	277/287	186/202		Ilha Rasa
CN 27	<b>2006-2007</b>	209	CGP/MG/RC	255/263	333/335	296/298	339/339	265/267	185/185	271/279	186/208	322/330	Ilha Rasa
CN 27	<b>2006-2007</b>	215	MG/RC	263/265	309/315	296/296		265/267	189/189	277/279	186/204	322/322	Ilha Rasa
CN 27	<b>2008-2009</b>	544	MG/RC	255/259	313/327	296/300	329/351	269/275	193/193	277/279	186/186		Ilha Rasa
CN 27	<b>2008-2009</b>	545	MG/RC	255/267	309/327	296/298	317/337	267/273	187/187	271/279	184/186		Ilha Rasa
CN 27	<b>2010-2011</b>	680	MG/RC	257/259	309/313	296/300	317/337	267/281	197/197	279/279	186/186		Ilha Rasa
CN 27	<b>2010-2011</b>	681	MG/RC	259/259	309/333	298/300	317/329	267/267	197/197	279/279	186/186		Ilha Rasa
CN 27	<b>2013-2014</b>	857	MG/RC	263/267	319/319	296/296	339/343	263/265	185/185	271/279	212/212		Ilha Rasa
CN 29	<b>2008-2009</b>	546	FN/IR/MG/RC	259/267	319/331	296/298	333/337	283/283	199/199	281/281	186/186		Ilha Rasa
CN 29	<b>2009-2010</b>	610	FN/IR/MG/RC	257/263	319/331	296/300	335/339	265/267	199/199	271/279	186/210		Ilha Rasa
CN 29	<b>2011-2012</b>	755	MG/RC	257/263	319/331	296/300	331/345	265/267	199/199	271/279	186/210		Ilha Rasa
CN 29	<b>2011-2012</b>	756	MG/RC	257/259	313/319	296/300	335/339	281/281	199/199	279/279	186/210		Ilha Rasa
CN 29	<b>2011-2012</b>	757	MG/RC	257/259	309/331	296/298	331/345	281/281	199/199	279/279	186/206		Ilha Rasa
CN 29	<b>2013-2014</b>	858	MG/RC	263/267	309/313	296/298	335/339	281/281	199/199	271/279	186/210		Ilha Rasa
CN 33	<b>2006-2007</b>	213	MG	253/267	329/333	296/296		265/269	199/199	277/279	186/202	322/330	Ilha Rasa

CN 33	<b>2006-2007</b>	214	CGP/MG	267/269	309/313	296/306		265/267	199/199	271/279	202/202	322/330	Ilha Rasa
CN 41	<b>2006-2007</b>	219	CGP/MG	253/261	315/331	296/302		267/269	199/199	271/279	186/204	322/322	Ilha Rasa
CN 41	<b>2006-2007</b>	220	MG	253/257	315/331	296/302		267/283	199/199	279/279	186/204	322/330	Ilha Rasa
CN 45	<b>2006-2007</b>	221	CGP/MG	253/257	309/313	296/296		265/267	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 45	<b>2006-2007</b>	222	MG	257/263	309/333	296/296		263/265	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 45	<b>2006-2007</b>	223	MG	255/261	309/333	296/296		263/267	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 49	<b>2006-2007</b>	226	MG	253/255	315/329	296/296		265/267	185/185	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 49	<b>2006-2007</b>	227	MG	253/261	317/331	296/296		261/265	185/185	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 49	<b>2006-2007</b>	228	CGP/MG	253/255	317/329	296/296		263/267	197/197	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN 57	<b>2008-2009</b>	566	FN/IR/MG/RC	259/267	309/319	296/298	333/337	263/265	193/199	271/279	186/186		Ilha Rasa
CN 57	<b>2009-2010</b>	619	FN/IR/MG/RC	259/259	315/319	296/300	339/339	267/269	193/193	279/279	210/212		Ilha Rasa
CN 57	<b>2010-2011</b>	710	FN/IR/MG/RC	255/257	315/319	296/300	339/339	267/269	199/199	271/279	184/208		Ilha Rasa
CN 57	<b>2010-2011</b>	711	FN/IR/MG/RC	259/259	315/315	296/300	339/339	265/267	193/193	271/279	210/212		Ilha Rasa
CN 57	<b>2010-2011</b>	712	FN/IR/MG/RC	221/255	315/319	296/300	339/339	265/267	199/199	279/279	186/202		Ilha Rasa
CN 57	<b>2013-2014</b>	840	MG/RC	259/259	319/329	296/300	339/339	265/267	193/193	279/279	186/202		Ilha Rasa
CN 57	<b>2013-2014</b>	841	MG/RC	259/259	315/329	296/300	339/339	265/267	199/199	271/279	186/202		Ilha Rasa
CN 57	<b>2013-2014</b>	842	MG/RC	257/259	315/319	296/300	339/339	265/267	193/193	271/281	186/202		Ilha Rasa
NN 3	<b>1999-2000</b>	3335	MG	255/263	313/319	296/300		265/267	185/199	271/279	210/212	322/322	Ilha Rasa
NN 3	<b>1999-2000</b>	3336	MG	255/263	313/319	296/300		271/281	185/199	271/279	186/212	322/322	Ilha Rasa
NN 4	<b>1999-2000</b>	3230	RC	263/267	315/319	296/296	335/345	265/267	185/185	279/279	186/202	322/330	Ilha Rasa
NN 4	<b>1999-2000</b>	3231	RC	257/259	313/335	296/298	333/337	265/275	199/199	277/281	186/186		Ilha Rasa
NN 4	<b>1999-2000</b>	3232	RC	263/267	325/329	296/296		265/267	199/199	271/279	186/208	322/322	Ilha Rasa
NN 4	<b>2002-2003</b>	5321	CGP/MG/RC	263/267	319/319	296/296	333/345	265/267	185/185	279/279	186/202		Ilha Rasa
NN 4	<b>2003-2004</b>	5436	MG/RC	255/261	313/315	296/296		265/265	185/197	279/279	186/210	330/330	Ilha Rasa
NN 4	<b>2003-2004</b>	5437	MG/RC	261/263	313/315	296/296	317/335	267/267	197/197	279/279	186/210	322/330	Ilha Rasa
NN 4	<b>2005-2006</b>	5843	MG/RC	255/261	315/319	296/296	333/345	267/267	197/197	279/279	186/210	322/330	Ilha Rasa
NN 4	<b>2006-2007</b>	181	MG/RC	255/267	313/315	296/296	317/335	265/267	197/197	279/279	186/210	322/322	Ilha Rasa
NN 4	<b>2006-2007</b>	182	MG/RC	255/261	315/319	296/296		265/267	197/197	279/279	186/202	322/322	Ilha Rasa
NN 4	<b>2006-2007</b>	183	MG/RC	255/267	315/319	296/296		265/265	197/197	279/279	186/210	322/330	Ilha Rasa

NN 4	<b>2009-2010</b>	656	MG/RC	263/267	313/319	296/296	317/335	265/267	197/197	281/281	186/202	Ilha Rasa
NN 4	<b>2009-2010</b>	657	MG/RC	257/259	313/319	296/298	331/345	281/281	199/199	279/279	186/206	Ilha Rasa
NN 4	<b>2010-2011</b>	706	MG/RC	261/263			333/345	267/269	189/197	279/279		Ilha Rasa
NN 25	<b>2004-2005</b>	5657	FN/IR/MG/RC	263/267	315/319	296/296		265/281	185/199	279/285	186/186 330/334	Ilha Rasa
NN 25	<b>2004-2005</b>	5658	FN/IR/MG/RC	263/267	313/315	296/296		267/281	199/199	279/285	186/186 330/334	Ilha Rasa
NN 25	<b>2005-2006</b>	5854	FN/IR/MG/RC	261/265	315/319	296/302		267/281	199/199	279/285	186/186 330/334	Ilha Rasa
NN 75	<b>2004-2005</b>	5659	MG	259/259	309/335	296/296		267/299	185/185	271/279	186/212 322/330	Ilha Rasa
NN 75	<b>2004-2005</b>	5660	MG	259/259	335/335	296/296		267/299	199/199	271/277	210/212 322/322	Ilha Rasa
NN 82	<b>2003-2004</b>	5441	CGP/MG/RC	255/255	309/323	296/296	337/339	267/269	185/191	277/279	212/212 322/330	Ilha Rasa
NN 82	<b>2003-2004</b>	5442	MG/RC	245/257	309/323	296/296	329/335	265/267	199/199	279/285	186/212 322/330	Ilha Rasa
NN 82	<b>2005-2006</b>	5860	MG/RC	245/255	319/323	296/296	337/339	265/267	185/191	277/285	186/210 322/322	Ilha Rasa
NN 82	<b>2006-2007</b>	230	MG/RC	255/257	315/319	296/296	329/335	269/271	191/191	279/279	186/212	Ilha Rasa
NN 82	<b>2006-2007</b>	231	MG/RC	245/257	315/319	296/296	335/339	267/269	199/199	279/285	202/212	Ilha Rasa
NN 99	<b>2002-2003</b>	5320	FN/IR/MG/RC	257/267	315/329	296/300		265/269	199/199	271/279	186/210 322/330	Ilha Rasa
NN 99	<b>2002-2003</b>	5323	CGP/FN/IR/MG/RC	255/267	315/331	296/300	335/337	261/269	185/199	279/279	186/186 322/330	Ilha Rasa
NN 99	<b>2003-2004</b>	5434	FN/IR/MG/RC	259/267	315/329	296/300	335/337	261/267	199/199	279/279	186/186 330/330	Ilha Rasa
NN 99	<b>2003-2004</b>	5435	FN/IR/MG/RC	259/267	319/329	296/296		261/267	199/199	271/279	186/210 322/322	Ilha Rasa
NN 99	<b>2008-2009</b>	591	MG/RC	255/259	313/315	296/296	335/339	265/267	185/189	279/279	202/210	Ilha Rasa
NN 99	<b>2013-2014</b>	838	MG/RC	259/263	315/319	296/296	331/333	267/281	199/199	279/279	186/202	Ilha Rasa
NN 99	<b>2013-2014</b>	839	MG/RC	259/267		298/298	339/339	265/265	191/191	271/279	186/202	Ilha Rasa
NN 123	<b>2003-2004</b>	5438	FN/IR/MG/RC	255/267	315/327	296/296	339/339	267/267	185/189	279/279	202/218 322/322	Ilha Rasa
NN 123	<b>2003-2004</b>	5439	FN/IR/MG/RC	255/257	319/327	296/296	317/339	265/267	185/185	271/279	186/202 322/330	Ilha Rasa
NN 123	<b>2003-2004</b>	5440	FN/IR/MG/RC	255/257	315/327	296/296	329/339	267/267	199/199	271/279	202/218 322/330	Ilha Rasa
NN 123	<b>2004-2005</b>	5646	CGP/FN/IR/MG/RC	257/267	315/319	296/296	317/329	267/267	199/199	279/279	208/218 322/330	Ilha Rasa
NN 123	<b>2004-2005</b>	5647	FN/IR/MG/RC	255/257	315/315	296/296	339/339	267/267	185/189	271/279	208/218 322/330	Ilha Rasa
NN 123	<b>2006-2007</b>	232	MG/RC	257/267	315/319	296/296	339/339	267/269	185/185	271/279	186/202	Ilha Rasa
NN 123	<b>2006-2007</b>	233	MG/RC	255/257	315/319	296/296	337/349	267/269	189/189	279/279	186/202	Ilha Rasa
NN 123	<b>2009-2010</b>	660	MG/RC	259/259	319/329	296/296	317/317		199/199	279/279	186/206	Ilha Rasa
NN 163	<b>2003-2004</b>	5428	CGP/MG	255/269	309/313	296/296		265/279	189/199	279/279	186/212 322/322	Ilha Rasa

NN 163	<b>2003-2004</b>	5429	MG		309/313	296/296		271/281	185/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa	
NN 168	<b>2004-2005</b>	5661	MG		259/267	319/331	296/296	267/279	185/185	271/279	186/186	322/330	Ilha Rasa	
NN 168	<b>2004-2005</b>	5662	MG		259/267	331/333	296/296	267/269	199/199	279/279	186/212	322/330	Ilha Rasa	
NN 174	<b>2003-2004</b>	5445	CGP		263/267	309/313	296/296	265/265	185/185	271/279	186/212	322/322	Ilha Rasa	
NN 186	<b>2004-2005</b>	5665	MG		263/263	315/317	296/296	267/269	189/189	271/277	186/218	322/322	Ilha Rasa	
NN 186	<b>2004-2005</b>	5666	MG		263/265	315/315	296/300	265/267	185/189	271/277	186/208	322/322	Ilha Rasa	
NN 188	<b>2004-2005</b>	5667	FN/IR/MG/RC		261/265	309/315	296/296	329/337	277/277	185/189	277/279	186/212	322/334	Ilha Rasa
NN 188	<b>2004-2005</b>	5668	FN/IR/MG/RC		265/265	315/315	296/296		277/277	199/199	279/279	212/212	322/334	Ilha Rasa
NN 188	<b>2005-2006</b>	5839	CGP/FN/IR/MG/RC		261/265	319/319	296/300	341/343	281/281	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
PVC 20	<b>2008-2009</b>	570	FN/IR/MG/RC		263/267	313/331	296/296	335/341	269/273	187/187	271/279	186/212		Ilha Rasa
PVC 20	<b>2009-2010</b>	622	FN/IR/MG/RC		255/259	313/329	296/296	337/339	269/271	199/199	273/281	186/186		Ilha Rasa
PVC 20	<b>2009-2010</b>	623	FN/IR/MG/RC		243/259	309/313	296/296	333/337	269/271	199/199	271/279	186/186		Ilha Rasa
PVC 20	<b>2011-2012</b>	767	MG/RC		261/267	315/331	296/296	335/341	269/271	199/199	271/279	186/212		Ilha Rasa
PVC 20	<b>2012-2013</b>	806	MG/RC		259/263	315/333	296/296	317/341	267/271	197/197	279/279	186/186		Ilha Rasa
PVC 20	<b>2012-2013</b>	807	MG/RC		259/261	313/333	296/296	335/341	267/269	197/197	279/279	210/212		Ilha Rasa
PVC 20	<b>2013-2014</b>	824	MG/RC		261/267	313/333	296/296	317/341	267/269	197/197	279/279	186/210		Ilha Rasa
PVC 20	<b>2013-2014</b>	825	MG/RC		261/267	313/331	296/296	317/339	267/271	199/199	279/279	186/212		Ilha Rasa
NN34	<b>2003-2004</b>	5433	CGP		259/267	313/319	296/300		267/277	185/189	271/279	186/208	322/330	Ilha Rasa
NN160	<b>2003-2004</b>	5443	CGP		267/267	313/315	296/300		265/277	185/199	279/279	186/212	322/330	Ilha Rasa
NN94	<b>2004-2005</b>	5645	CGP		255/259	313/313	296/296		269/277	199/199	277/279	186/202	322/330	Ilha Rasa
NN139	<b>2004-2005</b>	5648	CGP		255/263	313/319	296/296		265/269	199/199	271/277	186/186	322/322	Ilha Rasa
NN182	<b>2004-2005</b>	5649	CGP		257/265	319/319	296/296		263/281	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha Rasa
CN36	<b>2006-2007</b>	217	CGP		263/263	331/333	296/296		269/279	185/191	279/279	196/204	322/322	Ilha Rasa
NN 1	<b>2001-2002</b>	4859	MG		257/259	315/329	296/300	329/329	265/267	197/199	271/279	210/212	322/330	Ilha Grande
NN 1	<b>2001-2002</b>	4860	MG		259/263	315/329	296/296	337/339	267/267	197/197	279/279	202/212	322/330	Ilha Grande
NN 1	<b>2001-2002</b>	4861	MG		259/263	315/329	296/300	329/337	267/267	185/199	279/279	186/210	322/330	Ilha Grande
NN 2	<b>2006-2007</b>	171	CGP/MG		257/265	323/333	296/296		265/265	199/203	279/279	186/186	322/322	Ilha Grande
NN 2	<b>2006-2007</b>	172	MG		243/265		296/296		265/265	199/203	271/279	186/186	322/330	Ilha Grande
CN 4	<b>2003-2004</b>	5448	CGP/MG		255/259	315/329	296/296		265/267	185/197	279/279	208/210	330/330	Ilha Grande

CN 4	<b>2003-2004</b>	5449	MG	255/259	315/329	296/296	267/269	197/199	279/279	202/212	322/322	Ilha Grande	
NN 5	<b>2005-2006</b>	5869	CGP	253/261	313/319	296/296	269/281	199/199	279/279	186/204	330/334	Ilha Grande	
NN 7	<b>2001-2002</b>	4862	MG	257/267	315/323	296/296	265/265	199/199	271/279	186/210	322/330	Ilha Grande	
NN 7	<b>2001-2002</b>	4863	MG	245/259	323/335	296/296	265/265	199/199	277/279	186/202	322/322	Ilha Grande	
NA	<b>2004-2005</b>	5642	MG	253/257	331/335	296/300	265/265	199/199			322/330	Ilha de Peças	
NA	<b>2004-2005</b>	5643	CGP/MG	259/267	331/335	296/300	265/265	199/199	271/279	186/210	322/330	Ilha de Peças	
NA	<b>2004-2005</b>	5644	MG	259/267	313/335	296/300	267/281	199/199	271/279	186/210	322/330	Ilha de Peças	
NN100	<b>2001-2002</b>	4866	MG		309/335	296/296	259/263	199/199	279/279	186/212	322/322	Ilha de Peças	
NN100	<b>2001-2002</b>	4867	MG	257/265	335/335	296/296	259/265	185/185	279/279	210/212	322/322	Ilha de Peças	
NN100	<b>2003-2004</b>	5447	CGP/MG	245/259	309/335	296/296	263/265	185/199	277/279	186/188	314/322	Ilha de Peças	
NNB	<b>2002-2003</b>	5322	CGP	257/257	325/333	296/302	261/265	199/199	271/279	186/218	322/330	Ilha de Peças	
NN 75	<b>2005-2006</b>	5870	CGP/MG	255/257	333/333	296/296	267/283	185/185	269/277	210/210	322/322	Ilha de Peças	
NN 75	<b>2005-2006</b>	5871	MG	255/257	309/335	296/296	267/299	199/199	269/277	188/210	322/322	Ilha de Peças	
NN 2	<b>1999-2000</b>	3239	MG	255/263	315/331	296/300	265/277	185/193	279/279	186/212	322/330	Ilha das Gamelas	
NN 2	<b>1999-2000</b>	3240	MG	255/263	315/331	296/300	261/277	199/199	279/279	186/186	322/330	Ilha das Gamelas	
NN 4	<b>1999-2000</b>	3237	MG	267/267	315/339	296/300	265/267	199/199	271/279	186/212	322/330	Ilha das Gamelas	
NN 4	<b>1999-2000</b>	3238	MG	267/267	315/339	296/296	267/275	199/199	279/285	202/210	322/322	Ilha das Gamelas	
NN7	<b>2002-2003</b>	5324	CGP	259/261	309/335	296/296	265/265	199/199	271/277	202/210	322/330	Ilha das Gamelas	
CN 4	<b>2005-2006</b>	5862	CGP/MG/RC	267/269	309/315	296/296	317/339	275/277	199/199	279/287	210/210	322/322	Ilha das Gamelas
CN 4	<b>2005-2006</b>	5863	MG/RC	259/267	313/315	296/296	331/337	265/277	199/199	279/287	210/210	322/322	Ilha das Gamelas
CN 4	<b>2008-2009</b>	595	MG/RC	255/255	315/315	296/296	335/339	269/283	191/201	279/279	186/186	Ilha das Gamelas	
CN 4	<b>2008-2009</b>	596	MG/RC	255/263	315/331	300/306			201/201	279/279		Ilha das Gamelas	
CN 4	<b>2008-2009</b>	597	MG/RC	255/267	315/331	300/306	317/339	267/279	201/201	279/279	186/212	Ilha das Gamelas	
CN 4	<b>2010-2011</b>	742	MG/RC	255/255	309/313	298/298			199/199	271/279	222/222	Ilha das Gamelas	
CN 4	<b>2010-2011</b>	743	MG/RC	269/269	313/329	298/300	317/339	269/279	199/199	271/279	222/222	Ilha das Gamelas	
CN 1	<b>2005-2006</b>	5864	MG	253/253	315/333	296/302	261/267	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha das Gamelas	
CN 1	<b>2005-2006</b>	5865	MG	253/263	331/333	296/296	267/281	199/199	279/279	186/202	322/322	Ilha das Gamelas	
CN 1	<b>2005-2006</b>	5866	CGP/MG	257/267	315/315	296/296	267/281	199/199	279/279	186/202	322/322	Ilha das Gamelas	
CN 3	<b>2006-2007</b>	178	CGP/MG	263/265	309/331	302/306	265/277	199/199	279/279	210/210	322/330	Ilha das Gamelas	

CN 3	<b>2006-2007</b>	179	MG	253/261	315/331	296/302	261/277	199/205	279/279	186/210	322/322	Ilha das Gamelas	
CN 3	<b>2006-2007</b>	180	MG	263/265	309/331	296/296	261/277	199/199	279/279	186/186	322/322	Ilha das Gamelas	
CN9	<b>2005-2006</b>	5868	CGP/FN/IR/MG/RC	259/267	319/329	296/296	333/335	269/269	199/199	277/279	186/210	322/330	Ilha das Gamelas
CN9	<b>2006-2007</b>	187	FN/IR/MG/RC	259/267	319/329	296/296	335/339	267/271	201/201	277/279	186/186		Ilha das Gamelas
CN9	<b>2006-2007</b>	188	FN/IR/MG/RC	263/267	313/319	296/296		269/271	183/183	277/279	186/210	322/330	Ilha das Gamelas
CN9	<b>2006-2007</b>	189	FN/IR/MG/RC	259/267	313/313	296/296	333/335	269/271	199/199	277/279	186/202	322/322	Ilha das Gamelas
CN9	<b>2006-2007</b>	190	FN/IR/MG/RC	259/267	319/329	296/296		269/271	185/185	277/279	202/210	322/322	Ilha das Gamelas
CN9	<b>2008-2009</b>	600	MG/RC	259/267	313/313	296/296	333/335	271/273	201/201	277/279	186/210		Ilha das Gamelas
CN9	<b>2008-2009</b>	601	MG/RC	259/267	313/313	296/300	335/339	267/271	187/201	277/279	202/210		Ilha das Gamelas
CN9	<b>2008-2009</b>	602	MG/RC	263/267	313/319	296/296	335/339	267/271	201/201		186/210		Ilha das Gamelas
CN9	<b>2010-2011</b>	739	MG/RC	263/267	313/319	296/296	333/335	271/273	187/199	277/279	186/186		Ilha das Gamelas
CN9	<b>2010-2011</b>	740	MG/RC	259/267	313/329	296/296	333/335	267/271	187/187	277/279	202/210		Ilha das Gamelas
CN9	<b>2010-2011</b>	741	MG/RC	259/267	319/329	296/296	335/339	267/271	187/187	277/279	186/202		Ilha das Gamelas
CN10	<b>2005-2006</b>	5867	CGP	269/269	309/319	300/302		261/277	199/199	279/279	186/204	322/322	Ilha das Gamelas