Priscila Fernanda Mussi Gonçalves

O potencial do *DNA barcode* na identificação de espécies de aves neotropicais

São Paulo

2009

Priscila Fernanda Mussi Gonçalves

O potencial do *DNA barcode* na identificação de espécies de aves neotropicais

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki

São Paulo

2009

Gonçalves, Priscila Fernanda Mussi

O potencial do *DNA barcode* na identificação de espécies de aves neotropicais

71 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Palavra-Chave Principal: *DNA barcode* 2. Palavra-Chave Secundária: Aves 3. Palavra-Chave Secundária: Psitacídeos

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). **Prof(a). Dr(a).**

_____

Prof(a). Dr.(a). Cristina Yumi Miyaki

À minha família, especialmente a meu
pai, com muito amor

Viver!
E não ter a vergonha
De ser feliz
Cantar e cantar e cantar
A beleza de ser
Um eterno aprendiz...

Luís Gonzaga do Nascimento Júnior
(Caminhos do Coração, “O Que É, O Que É?”, 1982)

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Cristina Yumi Miyaki por acreditar no meu potencial científico, me orientando e me ensinado sempre com muita dedicação e sabedoria.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA): Adriana Oliveira-Marques, Camila Ribas, Cibele Biondo, Fábio Raposo, Fernando d'Horta, Fernando Nodari, Flávia Presti, Gustavo Cabanne, Henrique Batalha Filho, José Patané, Patrícia Hassato, Rodrigo Pessoa, Tania Matsumoto, Thiago Ribeiro entre outros, pelas contribuições, companheirismo, bons momentos e sessões de terapia.

Ao Dr. Allan Baker pela oportunidade de estágio em seu laboratório no *Royal Ontario Museum* em Toronto, Canadá, pela hospitalidade e pelas sugestões e idéias muito enriquecedoras.

À Erika Sendra Tavares pela imensa ajuda técnica e científica dadas sempre com paciência e carinho, pela amizade em momentos em que precisei. Não tem palavras que expressem minha gratidão. Agradeço também ao Rafinha, pela amizade e pelas dicas sobre o cotidiano canadense.

Aos amigos de laboratório do *Royal Ontario Museum* (ROM)*:* Passan, Clayton, Oliver, Nicolle, Yvonna, Sérgio, Rosemary e Kristen pela amizade. E as demais pessoas que fizeram parte da minha estádia em Toronto: Eduardo, Paul, Patrick, Mercedes, Ernesto, Bianca e Mendel.

Aos professores do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências (USP), pelas disciplinas oferecidas à pós-graduação. E aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e da pós-graduação do Instituto de Biociências (USP) e do *Royal Ontario Museum*, pelo suporte.

Às pessoas e instituições que cederam o material biológico utilizado nessa dissertação. À Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo (Fapesp) pelo financiamento da pesquisa e pela concessão da bolsa de mestrado, sem as quais não seria possível a realização do trabalho. Ao *Canadian Barcode of Life Network*, *Genome Canada*, *Ontario Genomics Institute*, Natural *Sciences and Engineering Research Council of Canada* e ao Royal Ontario Museum Governors' Fund pelo financiamento de parte da pesquisa, realizada no *Royal Ontario Museum.* À Lynx Edicións pela permissão de uso das figuras do *Handbook of the Birds of the World* volume 4.

As minhas grandes amigas Aline Arruda, Amanda Alves, Camila Costa, Maria Rita Zaccari e a todas as outras não citadas aqui, por compartilharem todos os bons e maus momentos.

Ao meu amor Caue Coelho, pelo carinho e por fazer todos esses anos juntos muito mais felizes e completos. Durante esse período foi meu porto seguro, minha garantia de sorrir e minha inspiração para sonhar. E a toda sua família pelo carinho.

À minha avó Maria Albano Gonçalves, a Maria Helena Francisco e aos demais membros da minha família pelo incentivo e afeto, mesmo não entendendo muito bem minha profissão. A Julinha, Dara e Kalu, por sempre me receberem com imensa alegria, tornando meus dias mais felizes.

Em especial, à melhor família que alguém poderia ter. Ao meu maravilhoso e eterno pai Humberto Gonçalves, a minha admirável mãe Maria Aparecida Mussi Gonçalves, ao meu irmão Daniel Augusto Mussi Gonçalves e a minha irmã Cinthia Regina Mussi Gonçalves, por sempre acreditarem mais em mim do que eu mesma, pelo grande apoio e amor incondicional. Sempre estarão comigo!

E a Deus, por permitir que tudo isso seja possível! Obrigada!

Índice

Resumo..... I
Abstract..... II
Capítulo 1 - Introdução Geral..... 1
1.1. Identificação de espécies baseada em sequências do DNA mitocondrial..... 2
1.2. Principais aplicações..... 4
1.3. Métodos de análise..... 6
1.4. Limitações..... 7
1.5. Aves neotropicais como modelo de estudo..... 10
1.6. Objetivo..... 11
1.7. Referências..... 12
Capítulo 2 - O potencial do *DNA barcode* na identificação de espécies de aves neotropicais.... 16
2.1. Introdução..... 17
2.2. Material e Métodos..... 18
2.3. Resultados..... 22
2.4. Discussão..... 30
2.5. Conclusão..... 34
2.6. Referências..... 34
Capítulo 3 - Análise dos caracteres diagnósticos do *DNA barcode* de espécies proximamente relacionadas de gêneros de psitacídeos neotropicais (Tribo Arini) 37
3.1. Introdução..... 38
3.2. Material e Métodos..... 38
3.3. Resultado..... 42
3.4. Discussão..... 48
3.5. Conclusão..... 53
3.6. Referências..... 54
Capítulo 4 - Identificação da espécie de embriões apreendidos do tráfico ilegal: aplicação prática do *DNA barcode*..... 57
4.1. Introdução..... 58
4.2. Material e Métodos..... 59
4.3. Resultado..... 61
4.4. Discussão e conclusão..... 66
4.5. Referências..... 67
Capítulo 5 – Considerações finais..... 69
Apêndice I – Tabela com dados das amostras utilizadas

Resumo

O presente trabalho foi organizado em cinco capítulos. No primeiro é apresentada uma breve revisão da bibliografia relacionada ao *DNA barcode,* apontando as aplicações e os limites desse marcador. Os resultados obtidos são apresentados nos três capítulos subsequentes. O segundo capítulo teve como objetivo avaliar o potencial do método de *DNA barcoding* na distinção de 783 amostras de 228 espécies diferentes de aves neotropicais de 16 ordens baseado na diferença dos valores de divergências intra- e interespecíficas. O *DNA barcode* permitiu a diagnose da maioria das espécies tanto utilizando os valores de distância quanto os agrupamentos nas árvores de *Neighbor-joining* (NJ), mostrando ser um marcador muito útil na identificação rápida de aves neotropicais. Além disso, verificamos que ele gera informações que podem ser relevantes a estudos biogeográficos. Foram identificadas espécies proximamente relacionadas que não puderam ser identificadas seguindo essa metodologia, todas pertencentes aos psitaciformes. Assim, o objetivo do capítulo seguinte foi investigar se há caracteres diagnósticos no *coxI* de pares de espécies irmãs de psitacídeos neotropicais (gêneros *Amazona*, *Ara*, *Aratinga*, *Brotogeris* e *Graydidascalus*) e de grupos que não puderam ser identificados nas análises anteriores devido a baixas distâncias interespecíficas ou por não formarem clados reciprocamente monofiléticos nas árvores de NJ (espécies dos gêneros *Amazona, Aratinga, Myiopsitta, Pionites, Pyrrhura* e *Rhynchopsitta*). As espécies irmãs apresentaram de quatro a 39 sítios diagnósticos puros e as espécies proximamente relacionadas apresentaram de um a 11 sítios diagnósticos. Apenas as espécies *Rhynchopsitta pachyrhyncha* e *R. terrisi* e as espécies *Amazona aestiva* e *A. ochrochephala*, não apresentaram caracteres diagnósticos exclusivos e, portanto não puderam ser identificadas. Os resultados mostraram que é possível identificar grande parte das espécies proximamente relacionadas desse grupo de aves utilizando caracteres diagnósticos do *DNA barcode.* O penúltimo capítulo teve como objetivo identificar espécies de embriões de aves apreendidos do tráfico internacional de animais, utilizando o *DNA barcode.* Das 58 amostras totais, 93% foram identificadas, sendo três amostras de *Ara ararauna*, duas de *Triclaria malachitacea* e 49 de *Alipiopsitta xanthops*. As quatro amostras restantes (7%) foram identificadas como *Amazona aestiva* e/ou *Amazona ochrochephala*. Essas espécies formam um complexo já descrito em alguns trabalhos de filogenia molecular, o que inviabiliza qualquer sistema de identificação de espécies ao nível molecular. O *DNA barcoding* parece ser eficaz na correta identificação de espécies de aves e é especialmente útil em casos nos quais dados morfológicos não são acessíveis, como o presente exemplo. Por fim são descritas as principais conclusões de cada capítulo.

Abstract

The present study was organized in five chapters. The first one is a brief review of the literature on DNA barcode, pointing out its applications and limits. The results are presented in the three subsequent chapters. The second chapter aimed to evaluate the potential of the DNA barcoding method in the distinction of 783 samples of 228 different Neotropical birds species from 16 orders, based on the difference of values of intra- and interspecific distances. DNA barcode was able to diagnose most of the species using distance values and Neighbor-joining (NJ) trees. Thus, it is a useful tool for rapid identification of Neotropical birds and it can provide information that may be relevant to biogeography studies. Some closely related species, all psitaciformes, could not be identified. Thus, the following chapter attempted to identify diagnostic characters in the DNA barcode sequences of sister species pairs of Neotropical parrots (genera *Amazona, Ara, Aratinga, Brotogeris* and *Graydidascalus*) and groups of species that could not be identified due to low interspecific distances or lack of monophyly in NJ trees (species of the genera *Amazona, Aratinga, Myiopsitta, Pionites, Pyrrhura, Rhynchopsitta*). The pairs of sister species had four to 39 pure diagnostic sites and closely related species had one to 11 diagnostic sites. Only the pair of species *Rhynchopsitta pachyrhyncha* and *R. terrisi*, and *Amazona aestiva* and *A. ochrochephala* did not have exclusive characters and therefore could not be identified with this method. The results showed that it is possible to identify the majority of the closely related species of this avian group using DNA barcode characters. The next chapter intended to identify the species of bird embryos apprehended from the illegal animal trade using DNA barcodes. From the total of 58 samples, 93% were identified as: three *Ara ararauna*, two *Triclaria malachitacea* and 49 *Alipiopsitta xanthops*. The four remaining samples (7%) were identified as *Amazona aestiva* and/or *A. ochrochephala*. These species form a complex that was already suggested in previous molecular phylogeny studies. Thus, it seems to be impossible to distinguish them based on molecular markers. DNA barcoding seems to be efficient in the identification of species of birds and is especially useful in cases where morphological data is not accessible, as the present example. Finally the main conclusions are described in the last chapter.

Capítulo 1

Introdução geral

A presente Dissertação está organizada em capítulos, sendo o primeiro uma apresentação geral do problema abordado. Os capítulos 2 a 4 estão organizados na forma de manuscritos para posterior submissão para publicação. No capítulo final são apresentadas as conclusões do estudo.

1.1. Identificação de espécies baseada em sequências do DNA mitocondrial

1.1.1. *Visão geral*

Sistemas de identificação molecular se aprimoraram com os avanços dos métodos da biologia molecular (Avise 2004). Marcadores moleculares têm se mostrado bastante efetivos na diagnose de espécies de diversos grupos (Avise 2004, Hebert *et al* 2003, 2004a, 2004b; Armstrong e Ball 2005, Markmann e Tautz 2005, Monaghan *et al* 2005, Kerr *et al* 2007, Roe e Sperling 2007, Smith *et al* 2008a, 2008b).

Muitos desses marcadores são genes do DNA mitocondrial (DNAmit) (Figura 1) pois esta molécula possui características favoráveis que permitem que mesmo espécies proximamente relacionadas sejam discriminadas, como herança materna, alta taxa de mutação de alguns genes e a ausência de recombinação (Rubinoff 2006).

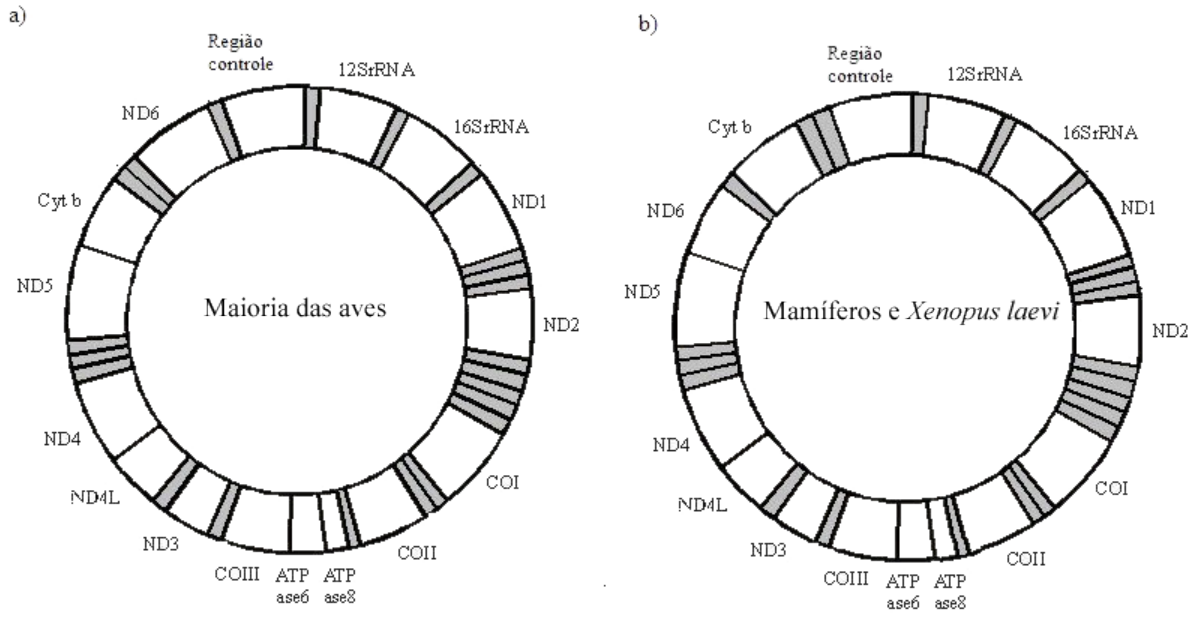


Figura 1. Diagrama esquemático da molécula do DNA mitocondrial de a) maior parte das espécies de aves e b) mamíferos e *Xenopus laevi.* Os genes codificadores de RNA transportadores estão em cinza. A figura foi produzida baseada nos trabalhos de Desjardins e Morais (1990) e de Mindell *et al* (1997).

Outra característica do DNAmit é que o conteúdo e o número de genes é relativamente constante entre os metazoários, garantindo a ortologia dos genes (Russo *et al* 2004). É necessário que genes sejam ortólogos, ou seja, que descendam do mesmo ancestral, para permitir que seja obtida uma correta estimativa de divergência entre eles. Caso genes de origens diferentes sejam comparados, valores superestimados de divergência podem ser encontrados (Russo *et al* 2004).

Alguns fatores podem atrapalhar o estudo de genes ortólogos, como a duplicação do gene de interesse dentro do genoma mitocondrial, heteroplasmia e presença de pseudogenes (Song *et al* 2008). Tais fatores devem ser levados em consideração ao selecionar marcadores em estudos de identificação de espécies (Song *et al* 2008).

Há muita controvérsia em relação à escolha dos genes do DNAmit a serem utilizados na identificação dos táxons (Moritz e Cicero 2004; Meyer e Paulay 2005; Will *et al* 2005). Diversos genes do DNAmit e do DNA nuclear já foram testados em vários grupos de animais e de plantas como potenciais marcadores na diagnose de espécies (Hebert *et al* 2003, Monaghan *et al* 2005, Roe e Sperling 2007, Rach *et a*l 2008). Entretanto, Hebert *et al* (2003) acreditam que a informação contida apenas no gene da subunidade I da citocromo oxidase (*coxI*) do DNAmit seria suficiente para permitir a identificação de táxons animais a nível de espécie e que até poderia ser utilizada no descobrimento de novas espécies.

1.1.2. O código de barras do DNA

Na tentativa de padronizar o marcador utilizado na identificação molecular de espécies animais, em 2003, pesquisadores da Universidade de Guelph (Ontário, Canadá) propuseram a criação de um sistema diagnóstico universal, baseado em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb), a partir da base 58 da extremidade 5' do gene *coxI* (Hebert *et al* 2003). Esse marcador foi denominado *DNA barcode,* pois sequências desse gene funcionariam como um código de barras (Hebert *et al* 2003). A idéia é a mesma do código de barras universal de produtos do mercado varejista, que emprega 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos (Hebert *et al* 2003). No caso do *DNA barcode*, pode haver até quatro possibilidades de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) em cada posição, mas com uma cadeia de sítios mais longa que 11 posições (Hebert *et al* 2003). Conservativamente, a combinação de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos, por exemplo, criaria um bilhão de códigos únicos, um número muito maior do que o de espécies conhecidas (aproximadamente 15 milhões; Hebert *et al* 2003). Isso permitiria que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de *DNA barcode* (Hebert *et al* 2003).

Inicialmente está sendo criado um banco de sequências do *DNA barcode* para todas as espécies existentes. Preferencialmente utilizando amostras depositadas em museus ou outras instituições e previamente identificadas por taxonomistas (Ratnasingham e Hebert 2007). Esse banco de dados, denominado de BOLD (*The DNA Barcode of Life Data System*) permite associar outros tipos de dados às amostras: a) fotos do espécimen (*voucher*); b) informações de campo, como ponto de coleta, coletor e data de coleta; c) número do espécimen e instituição na qual esse material foi depositado; d) dados taxonômicos; e) informações moleculares, como eletroferogramas das sequências, quais *primers* foram utilizados na amplificação e no sequenciamento. Além disso, no BOLD é possível realizar análises das sequências depositadas, como por exemplo, a verificação de códons de parada inesperados e ambiguidade na sequência (Ratnasingham e Hebert 2007). De acordo com um levantamento feito por Frézal e Leblois (2008), de 363.584 sequências (50.039 espécies), 136.338 satisfazem o critério de qualidade máxima proposto pelos autores do projeto.

Esse critério estabelece que as sequências diretas e reversas tenham uma sobreposição mínima de 500 pb e mais do que três indivíduos por espécie sequenciados (Frézal e Leblois 2008).

No BOLD, a identificação de espécies é realizada pela comparação de uma sequência de interesse com sequências lá depositadas. Essa comparação é realizada por métodos de distância genética, segundo o modelo de evolução molecular de Kimura-2-parâmetros (K2P, Kimura 1980). Primeiramente a sequência de interesse é alinhada com as sequências depositadas no BOLD; em seguida é feita uma busca das 100 sequências mais similares com aquela de interesse; uma árvore de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei 1987) é construída a partir deste conjunto de 100 sequências; finalmente, a espécie é atribuída àquela da sequência mais similar a ela (Frézal e Leblois 2008). Segundo dados publicados, a identificação da espécie de insetos, de aves e de mamíferos só pode ser aceita se houver similaridade com alguma sequência do BOLD maior do que 97%, 98% e 98%, respectivamente. Ou seja, caso a diferença seja maior que 3%, 2% e 2%, respectivamente, não é possível identificar a amostra e seria necessário realizar uma análise mais detalhada (Rubinoff 2006).

1.2. Principais aplicações

O uso do *DNA barcode* tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação rápida de espécies de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (Hebert *et al* 2003, 2004a; Kerr *et al* 2007; Ward *et al* 2005, Smith *et al* 2008a). A taxa de evolução molecular do gene *coxI* permite distinguir espécies próximas e também grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (Hebert *et al* 2003, 2004b; Kerr *et al* 2007; Ward *et al* 2005). Segundo Hebert *et al* (2003), outros benefícios esperados com a utilização do *DNA barcoding* são a identificação de espécies crípticas, o descobrimento de novas espécies, a identificação de formas juvenis e adultas de uma mesma espécie e a identificação de espécies a partir de fragmentos de material biológico.

1.2.1. Identificação de espécies

Pode-se citar como exemplo um estudo realizado com formigas, que estimou a diversidade e a riqueza deste grupo em quatro regiões distintas de Madagascar. Os resultados obtidos a partir de dados morfológicos não foram significativamente diferentes dos resultados obtidos com o *DNA barcode.* Nesse mesmo trabalho discute-se a possibilidade de as sequências do gene *coxI* ajudarem a inferir os limites entre as espécies, tornando-se mais uma característica taxonômica a ser utilizada em estudos posteriores (Smith *et al* 2005). Em outro exemplo, Monaghan *et al* (2005) testaram a aplicabilidade do DNA *barcode* em besouros, e observaram grupos de indivíduos que correspondiam a linhagens taxonômicas já descritas.

A identificação de espécies de peixes teleósteos e cartilaginosos provenientes dos mares australianos também foi realizada empregando-se sequências do gene *coxI*. Nesse estudo concluiu-se que o *DNA barcode* pode ser usado com confiança nesses peixes (Ward *et al* 2005). O *DNA barcode* permitiu a identificação correta de 388 espécies de peixes de ordens diferentes (Ward e Holmes 2007). Nesse mesmo estudo foi verificado que a distinção de espécies só foi possível devido à presença de alta taxa de substituição na terceira posição do códon que gera mutações sinônimas

com maior frequência que as não sinônimas, mantendo conservada a cadeia de aminoácidos (Ward e Holmes 2007).

Em um trabalho utilizando anfíbios, as sequências do *coxI* permitiram identificar espécies descritas de regiões geográficas distintas, porém foram relatadas dificuldades nas amplificações com *primers* universais (Vences *et al* 2005). Um estudo mais recente com anfíbios conseguiu identificar 94% das espécies analisadas utilizando *primers* universais, sendo que os problemas nas amplificações foram semelhantes àqueles descritas em outros estudos (Smith *et al* 2008a).

As aves têm sido foco de inúmeras análises taxonômicas e biogeográficas, oferecendo oportunidade para testar a eficácia da identificação baseada no *DNA barcode.* Em aves, o *DNA barcoding* foi utilizado na identificação de 206 espécies norte-americanas e verificou-se que nenhuma sequência do gene *coxI* de uma espécie foi idêntica à de outra espécie. Porém, algumas espécies apresentaram alta variação intra-específica, o que prejudica a análise e os resultados (Hebert *et al* 2004b). Mais recentemente, 643 espécies de 27 ordens diferentes, distribuídas em 71 famílias e 286 gêneros, originárias dos Estados Unidos da América e do Canadá, totalizando 98% da avifauna neártica, foram utilizadas em um trabalho de identificação com o *DNA barcode* (Kerr *et al* 2007). Dessas espécies, 94% formaram clados reciprocamente monofiléticos com alto suporte de *bootstrap*, ou seja, podem ser identificadas. As espécies que não foram identificadas (6%) não apresentaram sequências únicas do *DNA barcode*, o que pode ser conseqüência da hibridação regular de alguns grupos ou pode indicar possíveis espécies crípticas. Esse estudo mostra que o *DNA barcode* pode ser aplicado na identificação de espécies de diversos grupos de aves (Kerr *et al* 2007). Tavares e Baker (2008) testaram a eficácia do *DNA barcode* na identificação de 60 pares de espécies irmãs de 10 ordens de aves, selecionados a partir de filogenias multigênicas com altos valores de suporte. Foi possível distinguir cada espécie de sua espécie irmã devido à presença de substituições fixas diagnósticas nas sequências do *DNA barcode,* evidenciando que esse marcador pode ser usado de maneira rápida e eficiente no diagnóstico de espécies de aves proximamente relacionadas.

Estudos com aves neotropicais poderiam apresentar resultados distintos dos encontrados para as aves norte-americanas, pois as aves neotropicais podem apresentar um maior nível de diferenciação filogeográfica quando comparadas com as espécies de regiões temperadas (Moritz e Cicero 2004). Se essa maior estruturação filogeográfica for refletida no *DNA barcode*, grupos que apresentem tal padrão podem ser identificados e, posteriormente podem ser investigados detalhadamente. Um estudo realizado com aves neotropicais empregando o *DNA barcode* utilizou somente 16 de aproximadamente 200 espécies da família Thamnophilidae (ordem Passeriformes) e, apesar de ter obtido sucesso na identificação de todas as amostras utilizadas, é um estudo preliminar, devido ao baixo número de táxons empregado (Vilaça *et al* 2006). Um estudo mais abrangente, incluindo 500 espécies de aves coletadas na Argentina testou a aplicabilidade do *DNA barcode* em diversos grupos e níveis taxonômicos (Kerr *et al* 2009). Os resultados indicaram que o método é eficaz na delimitação de espécies, permitindo a identificação de 98% das espécies utilizadas, e pode contribuir com a compreensão da diversificação da avifauna neotropical, indicando grupos que merecem mais investigações, como aqueles que não puderam ser identificados (Kerr *et al* 2009).

1.2.2. Identificação inicial de espécies crípticas e de novas espécies

O uso da técnica também resultou em sucesso na identificação inicial de espécies crípticas. Um estudo realizado na Costa Rica utilizando dados morfológicos e comportamentais em conjunto com o *DNA barcoding* indicou que a espécie de borboleta *Astraptes fulgerator* pode ser, na verdade, um complexo de aproximadamente dez espécies crípticas (Hebert *et al* 2004a). Já para os insetos parasitas do gênero *Belvosia* (Diptera: Tachinidae), o *DNA barcoding* também permitiu identificar as espécies e sugeriu a existência de espécies crípticas, o que aumentaria a diversidade desse grupo (Smith *et al* 2006). É claro que esses resultados necessitam ser complementados com mais estudos para realmente confirmar a existência de espécies crípticas e de novas espécies.

Smith *et al* (2008b) testaram o método em 2597 indivíduos de vespas parasitas de seis gêneros, integrando informações morfológicas e ecológicas. As análises morfológicas revelaram 171 espécies, enquanto que o *DNA barcoding* revelou mais 142 espécies, das quais 95% ainda não haviam sido descritas. Os autores examinaram sequências do DNA nuclear para testar hipóteses sobre o limite entre tais espécies. Dessa forma foi possível compreender a diversidade e a biologia desse grupo de organismos de forma mais completa.

1.2.3. Conservação e biossegurança

O método também se mostrou útil na identificação de espécies de insetos invasores ou introduzidos em novos ambientes, já que os resultados foram obtidos rapidamente e com sucesso (Armstrong e Ball 2005). Essa aplicação na biosegurança é bastante importante e promissora para as demais espécies animais e vegetais. Isto porque, depois de padronizada, a técnica poderá ser aplicada globalmente com precisão e rapidez.

O DNA *barcode* pode também contribuir na biologia da conservação, que visa a preservação e o gerenciamento da biodiversidade global (Armstrong e Ball 2005, Rubinoff 2006). Um exemplo de tal aplicação seria a identificação da(s) espécie(s) de embriões de aves apreendidos com traficantes (ver Capítulo 3). Para isso seria necessário ter um banco de dados do DNA *barcode* representativo da diversidade de aves. Tal identificação das espécies permitirá agregar mais um dado que pode ser útil no combate do tráfico ilegal de animais.

1.3. Métodos de análise

Quando sequências alinhadas de genes ortológos são comparadas baseadas em modelos que reflitam sua semelhança, é possível quantificar as diferenças entre elas por meio de valores numéricos (Russo *et al* 2004). Baseado neste princípio, o BOLD estima a distância e a similaridade genética entre pares de sequências a fim de identificar as espécies, utilizado o modelo de evolução de Kimura-2-parâmetros e o algoritmo de *Neighbor-Joining.* De acordo com Nei e Kumar (2000) o modelo de evolução molecular K2P é o melhor modelo a ser adotado quando as distâncias genéticas são baixas. Nesse modelo é considerada a razão de transições e transversões, levando em conta o desvio na direção das substituições mais comuns, as transições (Kimura 1980). Já a vantagem do

algoritmo de *Neighbor-Joining* é não assumir que a taxa de evolução entre as sequências que compõem o conjunto de dados seja constante (Saitou e Nei 1987).

A principal vantagem dos métodos de distância é a rápida obtenção dos resultados. Porém tais métodos são dependentes da amostragem e da variação intra- e interespecífica dos grupos, o que pode levar à atribuição de falsos positivos (Frézal e Leblois 2008). Além disso, pode haver perda de informação utilizando métodos de distância, pois eles reduzem a variação entre sequências a uma única medida, a qual é utilizada na estimativa da árvore final, enquanto os métodos baseados em caracteres discretos, por exemplo, analisam cada sítio separadamente e constroem a árvore final a partir dos próprios caracteres (Russo *et al* 2004).

Diversos métodos alternativos foram propostos para analisar os dados gerados com o *DNA barcode* como: a) métodos filogenéticos clássicos, baseados em algoritmos de distância ou máxima verossimilhança, assumindo modelos mutacionais diferentes (Elias *et al* 2007); b) análises baseadas em caracteres múltiplos (DeSalle *et al* 2005); c) métodos estatísticos baseados em algoritmos sem qualquer suposição ou modelo biológico (Rach *et al* 2008) e d) métodos genealógicos baseados na teoria da coalescência utilizando modelos genéticos e algoritmos de máxima verossimilhança (Abdo e Golding 2007). Ainda há discussão sobre qual seria o método mais eficiente para atribuir uma espécie a uma sequência de interesse nas análises do *DNA barcode*, se a utilização de ferramentas biológicas, populacionais e/ou filogenéticas ou métodos estatísticos.

Dependendo do objetivo final da utilização do *DNA barcode* é importante verificar se o conceito de espécie empregado é consistente com o método de análise utilizado (Frézal e Leblois 2008). A identificação de espécies baseado no *DNA barcode* é consistente com qualquer conceito de espécie que os taxonomistas possam usar para estabelecer o nome de uma espécie. Por outro lado, o descobrimento de potenciais novas espécies exige um conceito de espécie e de um sistema que o corrobore (Rach *et al* 2008). Métodos de identificação baseados em caracteres, por exemplo, são consistentes com o conceito filogenético de espécie, enquanto que métodos de distância não são (Frézal e Leblois 2008). O método proposto por Rach *et al* (2008), utiliza um programa chamado CAOS (*Characteristic Attribute Organization System*), que busca caracteres diagnósticos nas sequências de nucleotídeos do *DNA barcode*. Cada base da sequência é considerada um caráter, e de acordo com os autores, as informações obtidas a partir dessa sequências de caracteres poderiam ser utilizadas para destacar a existência de novas unidades taxonômicas.

A eficácia da atribuição de uma espécie também depende da capacidade de estimar a probabilidade de falsos positivos (Frézal e Leblois 2008). Alguns métodos baseados na teoria da coalescência estimam a probabilidade e o grau de confiança de uma amostra pertencer a uma determinada espécie, o que pode contribuir com a precisão da ferramenta de diagnose (Abdo e Golding 2007). Porém, tais métodos exigem um tempo computacional elevado e um grande conjunto de dados, aproximadamente 10 sequências por espécie, o que nem sempre está disponível (Frézal e Leblois 2008).

1.4. Limitações

1.4.1. O marcador

Há muita controvérsia em relação ao uso desse único fragmento do DNAmit na identificação das espécies (Moritz e Cicero 2004). Uma das críticas em relação ao gene *coxI* é que este pode não ser informativo suficiente para descrever a grande diversidade biológica e, consequentemente essa sequência padronizada pode não contribuir com o desafio de identificar táxons e aumentar a taxa de descrição da diversidade biológica (Will e Rubinoff 2004). Isso porque o DNAmit pode apresentar algumas limitações que restringem a possibilidade de realizar inferências sobre o limite entre as espécies, como a herança materna; hibridação, retenção de polimorfismo ancestral (que poderiam subestimar o número de espécies); heteroplasmia e cópias nucleares do *coxI,* que, ao contrário, poderiam levar à superestimativa do número de táxons estudados (Moritz e Cicero 2004; Song *et al* 2008). O gene *coxI* tem se mostrado bastante efetivo na identificação de diversas espécies animais, mas pode falhar em alguns grupos proximamente relacionados, sendo necessário a utilização conjunta de regiões nucleares.

Outros grupos vêm utilizando o *coxI* e obtendo sucesso na diagnose das espécies, como por exemplo no estudo realizado com espécies de alga vermelha dos gêneros *Mazzaella, Dilsea* e *Neodilsea*, provenientes do Pacifico Norte e, a espécie *Asteromenia peltata,* amostrada nos oceanos Pacifico, Atlântico e Indico (Saunders 2005). Porém em plantas o gene *coxI* tem uma taxa de evolução muito mais lenta do que a observada nos animais, sendo inapropriado para a identificação de espécies. Ainda é incerto qual o melhor marcador para as plantas, mas é esperado que seja um sistema multilocos, com regiões intergênicas não codificantes e sequências de plastídios e do DNA nuclear utilizadas em conjunto (Kress *et al* 2005; Chase *et al* 2007; Frézal e Leblois 2008).

1.4.2. Biodiversidade

Durante a construção do banco de dados de sequências do gene *coxI* é preciso ter cuidado na seleção dos indivíduos representantes de um determinado táxon. A situação ideal seria que tais indivíduos cobrissem a maior parte da diversidade genética existente dentro do grupo, diminuindo a chance de haver erros de identificação. Para isso vários indivíduos de diversas localidades deveriam ser amostrados.

Esse sistema de identificação baseado no DNA é dependente da completa cobertura da diversidade de táxons. Assim, pode haver problemas associados à amostragem inadequada ou incompleta. Por exemplo, se sequências de somente parte dos táxons de um determinado grupo estiverem depositadas no banco de dados, a identificação da espécie de uma amostra pertencente a esse grupo pode não ser realizada ou, pior, será apontada uma espécie próxima, induzindo a falsos positivos (Armstrong e Ball 2005, Frézal e Leblois 2008). Meyer e Paulay (2005), por exemplo, estimaram a taxa de erro associada à identificação de espécie de grupos bem estudados e verificaram que o *DNA barcoding* é mais robusto na diagnose de espécies bem amostradas.

1.4.3. Taxa de evolução do gene

Sabe-se que a taxa de evolução de genes mitocondriais pode variar dentro e entre grupos de espécies relacionadas (Frézal e Leblois 2008). Isto pode resultar na sobreposição dos níveis de variação intra- e interespecíficos de alguns táxons, o que atrapalha a identificação de um indivíduo pertencente a esse grupo (Moritz e Cicero 2004). Apesar de Hebert *et al* (2003) sugerirem que há uma lacuna entre as variações intra- e interespecíficas, ou seja, que os valores de distância intra-específica são menores que os valores de distância interespecífica para o gene *coxI*, Moritz e Cicero (2004) afirmam que a sobreposição é bastante frequente quando muitos táxons proximamente relacionados são incluídos no estudo, prejudicando a eficácia do método (Figura 2).

A sobreposição pode ocorrer quando as espécies formam clados parafiléticos, devido à hibridação de espécies, pouco tempo de divergência entre os táxons ou podem indicar a presença de uma única espécie (Meyer e Paulay 2005). A amostragem de diversos indivíduos de uma espécie de diferentes localidades deve aumentar a diversidade de haplótipos, diminuindo o efeito de mutações estocásticas individuais, as quais poderiam causar erro nas estimativas de divergência e possível sobreposição destes valores (Roe e Sperling 2007). Smith *et al* (2008a), trabalhando com anfíbios, encontraram sobreposição entre os níveis de divergência intra- e interespecíficos. Os autores acreditam que essa sobreposição seja consequência da possível hibridação dos grupos ou taxonomia mal resolvida.

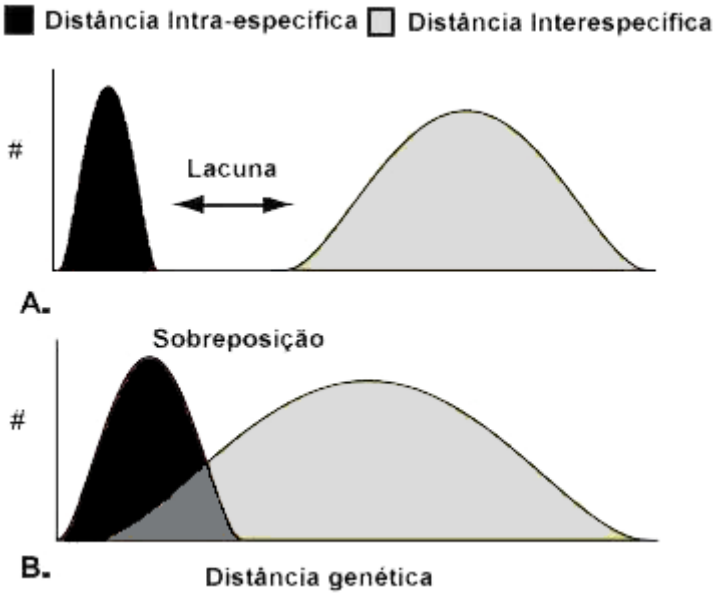


Figura 2. Distribuição de valores de distância genética. Distância intra-específica em preto e distância interespecífica em cinza. (A) Cenário ideal para o uso do *DNA barcode*, sem sobreposição dos valores de distâncias intra- e interespecíficas. (B) Cenário problemático para o uso do *DNA barcode;* com sobreposição dos valores de distâncias intra- e interespecíficas. Figura modificada de Meyer e Paulay (2005)

1.4.4. Estrutura geográfica intra-específica

Altas taxas de divergência intra-específica podem ser consequência de existência de diferentes populações geograficamente isoladas (Hebert *et al* 2003). Uma das críticas em relação ao *DNA barcode* é se o marcador seria capaz de identificar indivíduos de uma mesma espécie

pertencentes a populações geograficamente isoladas e geneticamente estruturadas (Frézal e Leblois 2008). Em outras palavras, o método teria que ser capaz de reconhecer grupos de indivíduos que ainda trocam material genético e grupos cujo fluxo gênico foi interrompido por um período de tempo suficiente para que uma nova espécie seja estabelecida (Savolainen *et al* 2005, Frézal e Leblois 2008). Tal questionamento é agravado pelo fato de limites entre populações e espécies serem dinâmicas.

O critério usado para estabelecer o que é uma espécie influencia como o limite entre as espécies será reconhecido (Knowles e Carstens 2007). Estudos mostram que dados genéticos podem corroborar o limite entre as espécies sugerido por outros trabalhos quando há uma boa amostragem (Knowles e Carstens 2007). Porém, a utilização de dados genéticos para inferir o limite entre as espécies pode falhar ao não considerar os diversos processos genéticos que podem estar envolvidos na especiação, como por exemplo, a ocorrência de hibridação (Rubinoff 2006, Knowles e Carstens 2007).

1.5. Aves neotropicais como modelo de estudo

1.5.1. Aves neotropicais

A região neotropical abrange parte do México e todas as Américas Central e do Sul (Figura 3). Ela apresenta grande variedade de biomas, que vão desde florestas úmidas a desertos. Possui fauna e flora diversificada, sendo a área com o maior número de espécies do planeta. No caso das aves, das 150 famílias existentes, 90 ocorrem no neotrópico, sendo 28 dessas famílias endêmicas dessa região (Stotz *et al* 1996).

Além dessa alta diversidade, espécies tropicais tendem a apresentar estrutura populacional complexa e por isso foram consideradas um desafio para o *DNA barcoding* (Moritz e Cicero 2004). Entretanto, estudos com a avifauna neotropical contradizem esse ceticismo demonstrando que o *DNA barcode* pode diagnosticar um grande número de espécies e contribuir com informações sobre os padrões de divergência dessa região (Vilaça *et al* 2006, Kerr *et al* 2009). Mas ainda há dúvidas sobre a eficácia do *DNA barcode* em todos os grupos de aves neotropicais.

Figura 3. Mapa da região neotropical. Fonte: InfoNatura (**www.natureserve.org**)

1.5.2. Psittaciformes

A ordem Psittaciformes (Aves) possui cerca de 25% de espécies ameaçadas (BirdLife International 2008) e ocorre da América do Norte à América do Sul, na África, na Índia, em ilhas do Pacífico, na Austrália e em regiões da Ásia (Forshaw 1989). Atualmente este grupo compreende cerca de 350 espécies, divididas em duas famílias: Cacatuidae e Psittacidae (del Hoyo *et al* 1997). A família Psittacidae inclui duas subfamílias: Loriinae e Psittacinae.

A tribo Arini, pertencente à subfamília Psittacinae, inclui somente espécies neotropicais. Esta tribo inclui aproximadamente 149 espécies e 30 gêneros (del Hoyo *et al* 1997). Estudos de filogenia molecular (Miyaki *et al* 1998; Tavares *et al* 2004, 2006; de Kloet e de Kloet 2005; Wright *et al* 2008) corroboram dados morfológicos que apontam o monofiletismo da tribo Arini. Esse grupo apresenta diversos padrões de distribuição, sendo algumas espécies ou grupos altamente endêmicos, como ocorre com táxons do gênero *Pyrrhura*, enquanto outros são amplamente distribuídos, como é o caso de muitas espécies do gênero *Ara* (del Hoyo *et al* 1997).

Como esse grupo ainda não foi utilizado em estudos com o *DNA barcode*, ainda não é certo se o *DNA barcoding* poderá identificar as espécies de psitacídeos da tribo Arini, principalmente as espécies proximamente relacionadas.

1.6. Objetivo

A presente dissertação tem como principal objetivo avaliar a aplicabilidade do *DNA barcode* na identificação de espécies de aves neotropicais. Para isso serão analisadas as sequências do gene *coxI* estimando seus níveis de variabilidade intra- e inter-específicas.

Dentro deste contexto, os objetivos específicos são:

1- Obter sequências do gene *coxI* do DNA mitocondrial para espécies de aves neotropicais de diferentes grupos e depositá-las no banco de dados BOLD.
2- Avaliar o potencial do método na identificação de espécies de aves neotropicais de diferentes grupos.
3- Avaliar o potencial do método na identificação de espécies próximas. Para isso serão utilizadas amostras de aves pertencentes a gêneros de psitacídeos neotropicais (tribo Arini). Os gêneros selecionados foram: *Amazona*, *Ara*, *Aratinga, Brotogeris, Graydidascalus, Myiopsitta, Pionites, Pyrrhura* e *Rhynchopsitta*
4- Identificar as espécies de embriões de aves apreendidos do tráfico ilegal.

A partir destes dados visa-se responder as seguintes questões:
- É possível distinguir um grande número de espécies de aves neotropicais utilizando um pequeno fragmento do DNA mitocondrial?
- Esta técnica pode distinguir espécies muito próximas?
- As sequências parciais do *coxI* serão úteis nesse grupo aves que ainda não foram utilizadas em estudos com esse marcador?

1.7. Referências

Abdo Z. e Golding B. 2007. A step toward barcoding life: a model –based, decision-theoretic method to assign genes to preexisting groups. Syst. Biol., 56, 44-56.

Armstrong K. F. e Ball S. L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. Phil. Trans. R. Soc. B, 360, 1813–1823.

Avise J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, 2° ed. Sunderland: Sinauer Associates.

BirdLife International 2008. The BirdLife checklist of the birds of the word, with conservation status and taxonomic sources. Vol.1 (www.birdlife.org/datazone/species/taxonomy.html).

Chase M. W., Cowan R. S., Hollingsworth P. M., van den Berg C., Madrinan S., Petersen G., Seberg O., Jorgsensen T., Cameron K. M., Carine M., Pedersen N., Hedderson T. A. J., Conrad F., Salazar G. A., Richardson J. E., Hollingsworth M. L., Barraclough T. G., Kelly L. e Wilkinson M. 2007. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. Taxon, 56, 295–299.

de Kloet R. S. e de Kloet S. R. 2005. The evolution of the spindling gene in birds: sequence analysis of an intron of the spindling W and Z gene revealed four major divisions of the Psittaciformes. Mol. Phylogenet. Evol., 36, 706-721.

del Hoyo J., Elliott A. e Sargatal J. (eds.) 1997. *Handbook of the Birds of the World*, v. 4, Sangrouse to Cuckoos. Barcelona: Lynx Edicións.

DeSalle R., Egan M. G. e Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. Phil. Trans. R. Soc. B., 360, 1905-1916.

Desjardins P. e Morais R**.** 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. J. Mol. Biol., 212, 599-634.

Elias M., Hill R. I., Willmott K. R., Dasmahapatra K. K., Andew V. Z., Brower A. V. Z., Mallet J., Chris D., Jiggins C. D. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical

butterflies. Proc. R. Soc. Lond. B., 274, 2881-2889.

Forshaw J. M. 1989. *Parrots of the World*. 3a ed. Willoughby: Lansdowne Press.

Frézal L. e Leblois R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. Inf. Gen. Evo., 8, 727-736.

Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. e Waard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. London B., 270, 313–321.

Hebert P. N. D., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H. e Hallwachs W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 14812-14817.

Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S. e Francis C. M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. Plos Biol., 2, 01-06.

Kerr K. C. R., Lijtmaer D. A., Barreira A. S., Hebert P. D. N. e Tubaro P. L. 2009. Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. PlosOne, 4, 1-6.

Kerr K. C. R., Stoeckle M. Y., Dove C. J., Weigt L. A., Francis C. F. e Hebert P. D. N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Mol. Ecol. Notes, 7, 535-543.

Kimura M. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16, 111-120.

Knowles L. L. e Carstens B. C. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. Syst. Biol., 56, 887-895.

Kress W.J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A. e Janzen D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 8369–8374.

Markmann M. e Tautz D. 2005. Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. Phil. Trans. R. Soc. B., 360, 1917–1924.

Meyer C. P. e Paulay G. 2005. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. Plos Biol., 3, 01-10.

Mindell D. P., Sorenson M. D., Huddleston C. J., Miranda Jr. H. C., Knight A., Sawchuck S. J. e Yuri T. 1997. Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. Pp. 213–247 *in* Mindell D. P., ed. *Avian Molecular Evolution and Systematics*. San Diego: Academic Press

Miyaki C. Y., Matioli S., Burke T. e Wanjntal A. 1998. Parrot evolution and paleogeographic events: mitochondrial DNA evidences. Mol. Biol. Evol.,15, 544-551.

Monaghan M. T, Balke M., Gregory T. R. e Vogler A. P. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. Phil. Trans. R. Soc. B., 360, 1925–1933.

Moritz C. e Cicero C. 2004. DNA Barcoding: promise and pitfalls. Plos Biol., 2, 1529-1531.

Nei M. e Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press.

Rach J., DeSalle R., Sarkar I. N., Schierwater B. e Hadrys H. 2008. Character-based *DNA barcoding* allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. Proc. R. Soc. B., 275, 237-247.

Ratnasingham S. e Hebert P. D. N 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Mol. Ecol. Notes, 7, 355-364.

Roe A. D. e Sperling F. A. H. 2007. Patterns of evolution of mithochondrial cytochrome *c* oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. Mol. Phylogenet. Evol. 44, 325-345.

Rubinoff D. 2006. Utility of mithochondrial DNA barcodes in species conservation. Conserv. Biol., 4, 1026-1033.

Russo C. A. M., Miyaki C. Y. e Pereira S. L. 2004. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. Pp. 108-116 *in:* Matioli S. R., ed. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora.

Saitou N. e Nei M.1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4, 406-425.

Saunders G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Phil. Trans. R. Soc. B., 360, 1879-1888.

Savolainen V., Cowan R. S., Vogler A. P., Roderick G. K. e Richard L. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. Phil. Trans. R. Soc. B, 360, 1805-1811.

Smith M. A., Fisher B. L. e Hebert P. D. N. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyper diverse arthropod group: the ants of Madagascar. Phil. Trans. R. Soc. B, 360, 1825–1834.

Smith M. A., Poyarkov N. A. e Hebert P. D. N. 2008a. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. Mol. Ecol. Notes, 8, 235-246.

Smith M. A., Rodriguez J. J., Whitfield J. B., Deans A. R., Janzen D. H., Hallwachs W. e Hebert P. D. N. 2008b. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 34, 12359-12364.

Smith M. A., Woodley N. E., Janzen D. H., Hallwachs W. e Hebert P. D. N. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 3657-3652.

Song H., Buhay J. E., Whiting M. F. e Crandall K. A. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 36, 13486-13491.

Stotz D. F., Fitzpatrick J. W., Parker III T. A. e Moskovits D. K. 1996. *Neotropical Birds – Ecology and Conservation*. Chicago: The University of Chicago Press.

Tavares E. S. e Baker A. J. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. Evol. Biol., 8, 1-27.

Tavares E. S., Baker A. J., Pereira S. L. e Miyaki C. M. 2006. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Syst. Biol., 55, 454-470.

Tavares E. S., Yamashita C. e Miyaki C. Y. 2004. Phylogenetic relationships among some Neotropical parrot genera (Psittacidae, Aves) based on mitochondrial sequences. Auk, 121, 230–242.

Vences M., Thomas M., Bonett R. M. e Vieites D. R. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. Phil.Trans. R. Soc. B, 360, 1859–1868.

Vilaça S. T., Lacerda D. R., Sari E. H. R. e Santos F. R. 2006. Identificação baseada em DNA aplicada a espécies de Thamnophilidae (Passeriformes): primeiro *barcodes* de pássaros Neotropicais. Rev. Bras. Ornitol., 14, 7-13.

Ward R. D. e Holmes B. H. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome *c* oxidase I (*cox1*) in fishes. Mol. Ecol. Notes, 7, 899-907.

Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R. e Hebert P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, 360, 1847–1857.

Will K. W., Mishler B. D., Wheeler Q. D. 2005. The perils of DNA barcoding and need for integrative taxonomy. Syst. Biol., 54, 844–851.

Will K. W. e Rubinoff. D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. Cladistics, 20, 47–55.

Wright T. F., Schirtzinger E. E., Matsumoto T., Eberhard J. R., Graves G., Sanchez J. J., Capelli S., Müller H., Scharpegge J., Chambers G. K. e Fleischer R. C. 2008. A multi-locus molecular phylogeny of the parrots (Psittaciformes): Support for a Gondwanan origin during the Cretaceous. Mol. Biol. Evol., 25, 2141-2156.

Capítulo 2

O potencial do *DNA barcode* na identificação de espécies de aves neotropicais

2.1. Introdução

Recentemente a sequência de DNA de um segmento do gene citocromo oxidase I do DNAmit vem sendo empregada na identificação de espécies animais (Hebert *et al* 2003). Esse marcador foi denominado *DNA barcode,* pois essas sequências funcionariam como códigos de barras exclusivos para cada espécie (Hebert *et al* 2003). Apesar do uso desse marcador apresentar alta taxa de sucesso na diagnose rápida de diversos grupos taxonômicos (Hebert *et al* 2003, 2004b; Kerr *et al* 2007; Smith *et al* 2008a, 2008b, Ward *et al* 2005), há muita controvérsia em relação ao uso deste único fragmento na identificação das espécies, que vai desde o gene utilizado aos métodos de análises empregados (Moritz e Cicero 2004).

Uma das críticas mais frequentes refere-se à possibilidade de sobreposição dos níveis de variação intra- e interespecíficos obtidos a partir deste gene, o que dificultaria identificar com precisão a espécie de uma amostra (Moritz e Cicero 2004). Os defensores do método afirmam que há uma lacuna entre as variações intra- e interespecíficas, porém Moritz e Cicero (2004) afirmam que a sobreposição é bastante frequente quando muitos táxons proximamente relacionados são incluídos no estudo, prejudicando a eficácia do método. Meyer e Paulay (2005) testaram o método utilizando uma ampla amostragem de um grupo diversificado de gastrópodes e encontraram ampla sobreposição das distâncias intra-específicas com as distâncias interespecíficas e uma taxa de erro mínima de 17% na diagnose de potenciais novas espécies.

Espécies neotropicais foram consideradas um desafio para o *DNA barcoding* devido à alta diversidade observada nessa região (Moritz e Cicero 2004). Dentro desse contexto, as aves estão entre os grupos de vertebrados neotropicais mais diversificados, sendo que 60% das famílias existentes ocorrem no neotrópico e aproximadamente 30% dessas famílias são endêmicas dessa região (Stotz *et al* 1996). Além dessa alta diversidade, espécies tropicais tendem a apresentar estrutura populacional complexa, o que poderia dificultar a identificação das espécies com o *DNA barcode* (Moritz e Cicero 2004).

Entretanto, dois estudos com alguns grupos da avifauna neotropical mostraram que o *DNA barcode* pode diagnosticar um grande número de espécies e pode contribuir com informações sobre os padrões de divergência dessa região (Vilaça *et al* 2006, Kerr *et al* 2009). Mas ainda há duvidas se o *DNA barcode* poderá diagnosticar todas as espécies conhecidas e se o nível de sobreposição dos valores de distâncias intra- e interespecíficas nesse grupo altamente diversificado poderá atrapalhar os resultados. Dessa forma, mais estudos devem ser feitos para testar se tal método se aplica efetivamente a todos os grupos de aves neotropicais, incluindo todos os níveis taxonômicos, espécies dentro de um mesmo grupo e espécies irmãs de grupos taxonômicos bem definidos de diversas regiões geográficas (Moritz e Cicero 2004).

No presente trabalho foram utilizadas amostras de aves neotropicais de diferentes ordens, incluindo espécies proximamente relacionadas, a fim de avaliar o potencial do método na distinção das espécies desses táxons baseado nos valores de divergências intra- e interespecíficas.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Amostragem

Foram selecionadas amostras de aves neotropicais de 16 ordens, totalizando 1020 amostras (Tabela 1 – Apêndice I). Em uma dessas ordens (Psittaciformes) há 15 amostras de sete gêneros diferentes não neotropicais que também foram incluídas nas análises. A maioria dessas amostras está depositada na coleção do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) da Universidade de São Paulo e uma pequena parte (74 amostras) pertence à coleção do Museu Paranaense Emílio Goeldi (MPEG). Também foram incluídas 158 sequências do *Barcode of Life Database* (BOLD – www.barcodinglife.org) cujos espécimes estão depositados no Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN). As amostras do LGEMA e do MPEG tiveram seus *coxI* sequenciados. Essas sequências foram depositadas no BOLD. No entanto, nas análises de distâncias intra- e interespecíficas foram consideradas somente espécies com mais de um representante. Ou seja, das 1020 sequências (que representam 464 espécies), 783 (que representam 228 espécies) foram utilizadas nessas análises.

Tabela 1. Número total de espécies existentes por ordem de aves analisadas (N sp total), número de espécies representadas dentre as amostras seqüenciadas (N sp seq), número de amostras sequenciadas (N seq), número de amostras analisadas (N anal) e número de espécies representadas dentre as amostras analisadas (N sp anal)

Ordem	N sp total	N sp seq	N seq	N anal	N sp anal
Apodiformes	443	18	32	21	6
Caprimulgiformes	120	9	12	5	2
Charadriiformes	356	2	5	4	1
Columbiformes	308	3	5	3	1
Coraciiformes	219	3	7	6	2
Cuculiformes	164	4	6	4	2
Falconiformes	314	24	46	33	11
Galbuliformes	53	16	27	16	5
Galliformes	284	3	3	-	-
Gruiformes	207	2	5	4	1
Passeriformes	5867	250	470	317	97
Piciformes	359	16	26	15	5
Psittaciformes	367	102	349	333	88
Strigiformes	215	3	7	6	2
Tinamiformes	46	4	5	2	1
Trogoniformes	40	5	15	14	4
Total	9362	464	1020	783	228

2.2.2. Extração do DNA e sequenciamento

O DNA de parte dessas amostras foi extraído pelo método padrão de digestão com proteinase K e purificação com fenol-clorofórmio. O protocolo resumido inclui a mistura de 300 microlitros (μl) de TNE (50 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de EDTA, pH 7,5), 30 μl de Tris-HCl

(1mM, pH 8), 8 μl de SDS (25%), 20 μl de Proteinase K (20 mg/ml) e aproximadamente 3 mm^3 de sangue ou outro tecido. A mistura foi incubada por 10-16 horas a 55ºC. O DNA foi purificado com fenol:clorofórmio e precipitado com etanol absoluto (Bruford *et al* 1992). Amostras do DNA extraído foram quantificadas em gel de agarose 1%, com DNA padrões de concentrações conhecidas de 62, 125 e 250 nanogramas (ng)/μl. Amostras de DNA com alta concentração foram diluídas em água deionizada estéril para uma concentração final de 40 ng/μl.

O restante das amostras teve o DNA extraído seguindo o protocolo de extração em placas "Glass Fiber Plate" (Ivanova *et al* 2006). Inicialmente foi feita uma mistura de 0,5 ml de Proteinase K (20 mg/ml) e 5 ml do tampão de lise de vertebrado (20 ml de NaCl a 100mM, 10 ml de Tris-HCl 50 mM/pH 8,0, 4 ml de EDTA 10 mM/pH 8,0 e 1,0 g de SDS 0,5%). Essa mistura foi distribuída em uma placa de extração de 96 amostras, em seguida foi adicionado aproximadamente 3 mm^3 de tecido ou sangue em cada poço da placa. A placa foi incubada por 6 horas a 56ºC e depois passou por uma série de lavagens e centrifugações. Inicialmente adicionou-se 100 μl de uma solução mista (50 ml de etanol 96% e 50 ml do tampão padrão: 354,6 g de GuSCN 6M, 20 ml de EDTA 20mM/ph 8,0, 50 ml de Tris-HCl 10mM/pH 6,4 e 20 ml de Triton X-100 4%) em cada poço da placa. Essa mistura foi transferida para a Placa "Glass Fiber" (Pall Corporation) que possui um filtro seguido de um orifício pelo qual passa a solução filtrada e que foi acoplada sobre outra placa comum de 96 amostras. Essas placas foram centrifugadas por 10 minutos e, em seguida a placa de baixo foi descartada e substituída por uma nova. Depois se adicionou 180 μl do tampão de lavagem de proteínas (70 ml de etanol 96% e 26 ml de tampão padrão). Logo após a centrifugação das placas por 5 minutos, novamente a placa de baixo foi trocada e foi adicionado 450 μl do tampão de enxágüe (300 ml de etanol 96%, 23,75 ml de NaCl 50mM, 4,75 ml de Tris-HCl 10mM/pH 7,4 e 0,475 ml de EDTA 0,5mM/pH 8,0). As placas foram centrifugadas por 5 minutos e o conjunto de placas foi desmontado. A placa de baixo foi descartada e a placa de cima foi incubada por 30 minutos a 56 ºC. Essa placa foi então colocada sobre uma placa comum e adicionou-se 50 μl de água deionizada estéril. Em seguida centrifugou-se esse conjunto por 5 minutos para que o DNA preso ao filtro da placa "Glass Fiber" passasse para a placa comum. Depois a placa "Glass Fiber" foi descartada e o produto extraído foi diretamente usado nas amplificações. Esse protocolo foi executado durante o estágio no *Royal Ontario Museum* (ROM), Canadá.

As amplificações da região do gene citocromo oxidase I foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com diversas combinações dos seguintes *primers*:

- BirdR1 (reverso): 5'-ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG-3' (Hebert *et al* 2004b),
- LTyr (direto): 5'-TGTAAAAAGGWCTACAGCCTAACGC-3' (Oliver Haddrath, com. pessoal),
- COIH7557 (reverso): 5'-GGCGGATGTGAAGTATGCTCGGG-3' (presente trabalho),
- COI748H (reverso): 5'-ACRTGNGAGATRATTCCRAANCCNG-3' (Rebecca Elbourne, com. pessoal),
- COI908aH2 (reverso): 5'-GTRGCNGAYGTRAARTATGCTCG-3' (Rebecca Elbourne, com. pessoal),
- COIART (direto): 5'-AACAAACCACAAAGATATCGG-3' (Erika Tavares, com. pessoal),
- COI2CR (reverso): 5'-GAAGAATCAGAANAGGTGTTG-3' (Oliver Haddrath, com. pessoal).

A reação de amplificação tinha volume final de 10 µl, adotando-se o seguinte protocolo: 1 µl de dNTPs (10 mM total), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 1 µl de tampão, 0,1 µl de *Taq* polimerase (5U/µl, Amersham Biosciences), 40 ng/µl de DNA e água MilliQ para completar 10 µl finais.

Para a maioria das espécies de psitaciformes a amplificação foi feita principalmente com os *primers* COIH7557 e LTyr, originando um fragmento de aproximadamente 960 pb e realizada nas seguintes condições: 5 minutos a 95ºC; 40 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 63ºC e 40 segundos a 72ºC; finalizando com 10 minutos a 72°C (Tabela 2). Quando as amplificações com esse par de *primers* não apresentava produto suficiente, os *primers* BirdR1 e LTyr foram utilizados para amplificação de um fragmento de 826 pb sob as seguintes condições: 5 minutos a 95ºC; 14 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 64ºC (abaixando 1°C por ciclo) e 40 segundos a 72ºC; 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C e 40 segundos a 72°C; finalizando com 10 minutos a 72°C.

Durante o estágio no ROM (Canadá), as demais espécies de aves e algumas espécies de psitacídeos foram amplificadas sob as seguintes condições: 2 minutos a 95ºC; 40 ciclos de 45 segundos a 94ºC, 45 segundos a 50ºC e 1 minuto a 72ºC; finalizando com 7 minutos a 72°C. Primeiramente a amplificação era realizada com os *primers* LTyr e COI908aH2 e caso a amplificação não tivesse produto suficiente ou falhasse, outros conjuntos foram utilizados (Tabela 2).

Tabela 2. P*rimers* A: conjuntos de *primers* principais para amplificação; *primers* B: conjuntos de *primers* utilizados caso o conjunto de *primers* A apresentasse problema para amplificação; protocolo de purificação utilizado em cada caso.

Ordem	***primers* A**	***primers* B**	**Purificação**
Psittaciformes	LTyr e COIH7557	LTyr e BirdR1	PEG
Psittaciformes (estágio no ROM)	LTyr e COI908aH2	LTyr e BirdRI COIART e COI908aH2 LTyr e COI2CR LTyr e COI748H LTyr e BirdRI	Corte de banda do gel
Demais ordens de aves (estágio no ROM)	LTyr e COI908aH2	COIART e COI908aH2 LTyr e COI2CR LTyr e COI748H	Corte de banda do gel

Como todas as amostras da espécie *Brotogeris cyanoptera* e de alguns indivíduos das espécies *B. chrysopterus*, *B. tirica*, *B. chiriri* e *B versicolurus* apresentaram picos duplos nas sequências, *primers* específicos foram desenvolvidos para esse gênero no presente estudo:

- COIbrotoIntF1 (direto): 5'- GCACCCTCTACCTAATTTTCGGCGCATG- 3'
- COIbrotoIntF2 (direto): 5'-TTGGAAACTGACTAGTCCCCCTCATAATCGG- 3'
- COIbrotoIntF3 (direto): 5'-TTTCCTCCATCCTAGGGGCAATCAACTT- 3'
- COIbrotoIntR1 (reverso): 5'-GTGACGATCACATTGTAGATTTGGTCGTCTC- 3'
- COIbrotoIntR2 (reverso): 5'-TACACTGTTCAGCCTGTTCCCACTCCGG- 3'
- COIbrotoIntR3 (reverso): 5'-ACAGCTGTGATTAGGACTGATCAGACGA- 3'
- COIbrotoIntR4 (reverso): 5'-TAGTAAGCTACTACATGTGAAATGATTC- 3'

A amplificação dessas amostras foi feita com o conjunto LTyr e COIbrotoIntR4, nas condições acima descritas para o conjunto COIH7557 e LTyr. O restante dos *primers* foi utilizado no sequenciamento.

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%. Sua purificação foi realizada com polietilenoglicol (PEG 8000 20%, NaCl 2,5 M; Tabela 2). Este protocolo consistiu em adicionar 1 μl de PEG para cada μl de produto de PCR, incubar por 15 minutos a 37°C e centrifugar o material por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o tubo lavado com álcool 80% gelado. No final, adicionou-se o mesmo volume inicial de água deionizada estéril. No ROM, a purificação foi feita cortando-se a banda do gel de agarose e centrifugando essa banda dentro de uma ponteira com filtro (Tabela 2).

Em seguida, os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o kit "*Big Dye Terminator Cycle Sequencing*" (Applied Biosystem). Nessa reação didesoxinucleotídeos marcados com fluorescência são incorporadas. O protocolo utilizado foi: 0,5 μl de "Big Dye", 1 μl de um *primer* (10μM), 1,5 μl de água MilliQ, 2,0 μl de tampão e 4 μl de produto de PCR purificado. Outro protocolo utilizado com sucesso foi 1,0 μl de "Big Dye", 1μl de um *primer* (10μM), 2,0 μl de água MilliQ, 2 μl de tampão e 4μl de produto de PCR purificado.

Para a maioria dos psitaciformes os *primers* utilizados no sequenciamento foram LTyr e COIH7557. Somente quando não havia sobreposição confiável das sequências obtidas, o *primer* BirdR1 foi utilizado. Para as demais espécies de aves, os *primers* mais usados foram COI748H em conjunto com o LTyr e somente quando a sobreposição não fosse confiável ou a reação falhasse, outros *primers* foram utilizados.

As reações de seqüenciamento foram incubadas a: 96ºC durante 1 minuto; 35 ciclos de 96ºC por 10 segundos, 50ºC por 10 segundos, 60ºC durante 4 minutos. O produto final da reação de sequenciamento foi precipitado com isopropanol 75% ou com EDTA 125 Mm e acetato de sódio 3M. Em seguida, as reações passaram por eletroforese em sequenciador automático modelo ABI 377 ou ABI 3100 (Applied Biosystem).

Os eletroferogramas das sequências obtidas foram visualizados utilizando-se os programas *Sequence Navigator* e *Sequence Analysis* (Applied Biosystems). No programa *CodonCode Aligner* 1.4.1 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, EUA) as sequências obtidas foram alinhadas e editadas, obtendo-se um sequência consenso para cada indivíduo. No programa *BioEdit* 7.0.9.0 (Hall 1999) foi realizado o alinhamento, a edição manual de todas as sequências consenso das espécies usadas e a verificação de ambiguidades e de códons de parada inesperados.

No BOLD há um projeto denominado "*Neotropical parrots*", criado para que as sequências de psitacídeos neotropicais obtidas no presente estudo pudessem ser depositadas e outro projeto chamado "*Birds LGEMA-IBUSP*" para que as sequências do restante de aves neotropicais fossem depositadas. Para submeter as sequências nesse banco de dados foi necessário criar um arquivo tipo *fasta* para cada sequência obtida, acessar o projeto correspondente e copiar esses arquivos no *site*. Dessa forma, todas as sequências de amostras previamente identificadas, obtidas no presente trabalho foram depositadas nesse bando de dados. Também foram depositados os *primers* utilizados na amplificação e no seqüenciamento e os eletroferogramas obtidos a partir do sequenciador ABI 3100, pois só é possível depositar eletroferogramas com o arquivo no formato .phd, gerados somente

por esse sequenciador. Além disso, foram depositadas para cada amostra informações de campo, número do espécime e instituição na qual cada amostra material esta depositado. Para proteger aos dados antes da publicação do artigo científico, quem cria um projeto controla a permissão ao acesso a todos os dados do mesmo. No entanto, mesmo sequências não públicas, como as que foram geradas neste estudo, são utilizadas em buscas realizadas no BOLD por qualquer pesquisador que pretende identificar a espécie da sua amostra. Caso essa amostra possua alta similaridade com alguma sequência não pública, a única informação disponível em relação a essa seqüência depositada no BOLD é limitada ao nome cientifico da espécie. Todas as demais informações, como localidade de coleta e coleção onde o espécime está depositado não são disponibilizadas a esse usuário.

2.2.4. Cálculo das distâncias intra- e interespecíficas

A diversidade intra-específica e as divergências inter-específicas das espécies com mais de um representante foram calculadas utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros (K2P, Kimura 1980) no programa *MEGA* 4.0 (Tamura *et al* 2007). Neste mesmo programa uma árvore de *Neighbor-Joining* foi construída para todo o conjunto de dados e quando necessário foram construídas árvores utilizando parte dos dados, utilizando o modelo K2P e o método de *bootstrap* para obter o suporte dos agrupamentos (Felsenstein 1985). Essas árvores parciais foram construídas para o conjunto de espécies que apresentaram altas distâncias intra-específicas e para os psitaciformes para permitir realizarmos análises mais detalhadas.

A diversidade intra-específica foi obtida pela média aritmética das distâncias aos pares entre indivíduos de cada espécie. O número de indivíduos por espécie variou de dois a 11, sendo a maioria (14%) de dois indivíduos. Para estimar as divergências entre as espécies, foram formados grupos de indivíduos da mesma espécie e compararam-se todos os possíveis pares formados de grupos diferentes. Dessa forma, as divergências interespecíficas foram obtidas pelo cálculo da média aritmética dos valores de distância de todos os possíveis pares de grupos. Nas comparações de pares de sequências de tamanhos diferentes a sequência mais curta era utilizada como referência, e, portanto, as extremidades à mais foram excluídas da análise.

A partir dos valores das distâncias, gráficos de distribuição das variações intra- e interespecíficas foram construídos no *Microsoft Office Excel* para visualizar os resultados de todos os conjuntos de dados.

2.3. Resultados

2.3.1. Diversidade de aves neotropicais

Para as 1020 sequências, a composição média das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) do DNA *barcode* foram de 26,2%, 25,5%, 31,7% e 16,6%, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os valores encontrados para genes mitocondriais de outros grupos de aves e para o *DNA barcode* de outros animais (Tavares *et al* 2006,

Ward *et al* 2007). O tamanho das sequências variou de 563 a 996 pb, incluindo toda a região do *DNA barcode*.

Dessas 1020 sequências, 783 (de espécies com mais de um representante) foram utilizadas nas análises de distância intra- e interespecíficas. Para este conjunto de dados a composição média das bases nitrogenadas A, T, C e G do *DNA barcode* foi de 26,3 %, 25,3 %, 31,7 % e 16,7%, respectivamente. Esses valores também estão de acordo com os valores encontrados para genes o *DNA barcode* de outras aves. O intervalo de tamanho das sequências foi o mesmo do conjunto total de dados. A diversidade intra-específica dessa amostra variou de 0 (zero) a 7,9%, sendo a média e o desvio padrão de 0,9% ± 1,4%. O maior valor de diversidade intra-específica foi encontrado na espécie *Tolmomyias assimilis* (7,9%, três indivíduos). A divergência interespecífica variou de 0,1% a 26,9% e a sua média e o desvio padrão encontrados de 18% ± 3,2%. O gráfico de distribuição da frequência desses valores mostra sobreposição das variações intra- e interespecíficas (Figura 1). Mais de 50% dos valores de diversidade intra-específica são menores do que 1%, e da mesma forma mais de 50% dos valores de divergências interespecíficas são maiores que 20%.

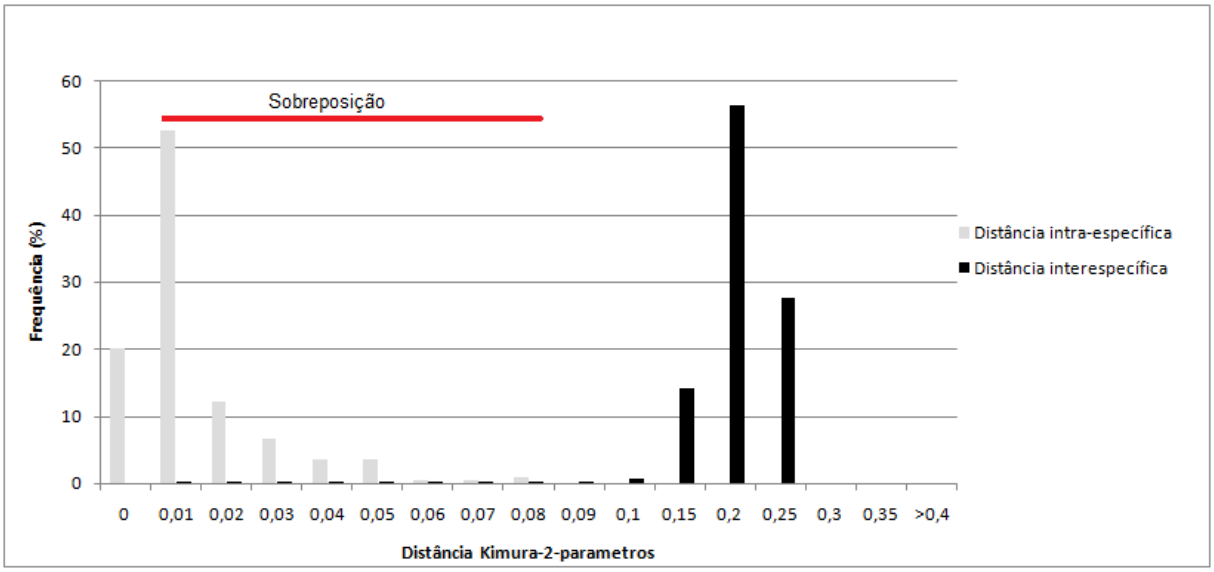


Figura 1. Distribuição dos valores de distâncias intra- e interespecíficas de aves neotropicais. O traço em vermelho indica a região em que ocorre sobreposição desses valores.

Considerando o valor mínimo de 2% de divergência entre as espécies, proposto por Hebert *et al* (2004b), para todo conjunto de nossos dados, 92,5% das espécies utilizadas no presente estudo poderiam ser identificadas. Em relação aos agrupamentos nas árvores de *Neighbor-joining* de todas as amostras analisadas, 98,7% das espécies de aves neotropicais estudadas podem ser identificadas por formarem grupos reciprocamente monofiléticos com bom suporte. A grande maioria das espécies de aves neotropicais analisadas, exceto o grupo dos psitaciformes (informações descritas adiante), apresenta agrupamentos com valores de *bootstrap* maiores que 95%. *Micrastur gilvicollis* e *Myrmotherula longipennis* também formaram clados reciprocamente monofiléticos, mas com suporte menor que 90%. Já *Conopophaga lineata* e *C. aurita* não formaram clados reciprocamente monofiléticos.

Valores de diversidade intra-específica maiores que 2% foram encontrados em 34 espécies do total de 228 (Tabela 1). As 17 espécies com pelo menos três indivíduos foram analisadas mais detalhadamente. Esse número mínimo foi adotado para permitir obter resultados mais robustos. Os locais de coleta das amostras foram identificados e pudemos observar padrões recorrentes de relações entre indivíduos de localidades distintas (Figura 2).

Tabela 1. Espécies e seus valores de divergência intra-específica maiores que 2%. N – número de indivíduos analisados. * - espécies que foram analisadas quanto à distribuição geográfica de suas amostras (padrão de acordo com a Figura 2); na – não analisado; nm – não reciprocamente monofiléticos.

Espécie	N	Maiores distâncias intra-específicas	Padrão de distribuição
*Malacoptila rufa**	4	0,021	C
*Phaeomyias murina**	3	0,021	C
Chloroceryle aenea	2	0,022	na
Deconychura longicauda	2	0,023	na
Deconychura stictolaema	2	0,023	na
*Xiphorhynchus guttatus**	3	0,023	B
*Myiobius barbatus**	4	0,024	C
Formicarius colma	2	0,025	na
*Thamnophilus aethiops**	8	0,026	B
Myrmoborus myotherinus	2	0,028	na
Amazona autumnalis	2	0,029	na
Dacnis cayana	2	0,029	na
*Glyphorynchus spirurus**	4	0,03	A
*Hylophylax poecilinotus**	6	0,03	B
Myrmeciza atrothorax	2	0,033	na
*Thamnomanes caesius**	4	0,033	A
Myrmotherula hauxwelli	2	0,034	na
*Jacamerops aureus**	3	0,035	C
*Turdus leucomelas**	6	0,037	B
*Dendrocincla fuliginosa**	3	0,038	C
*Micrastur gilvicollis**	3	0,039	A
Crypturellus tataupa	2	0,04	na
Thryothorus longirostris	2	0,046	na
*Hylophilus ochraceiceps**	3	0,047	C
Schiffornis turdina	2	0,048	na
*Conopophaga aurita**	3	0,049	nm
Cyphorhinus arada	2	0,049	na
Hemitriccus minor	2	0,049	na
Hylophylax naevius	2	0,049	na
Terenotriccus erythrurus	2	0,049	na
*Phaethornis superciliosus**	4	0,052	C
*Conopophaga lineata**	3	0,068	nm
Myrmotherula longipennis	2	0,078	na
*Tolmomyias assimilis**	3	0,079	C

No primeiro padrão recorrente (Figura 2A) são observados dois clados principais: um consiste no agrupamento de um ou mais indivíduos provenientes do centro-oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e o outro, no agrupamento das amostras coletadas na região noroeste (Amazônia e Rondônia). As espécies que possuem tal padrão são: *Thamnomanes caesius, Glyphorynchus spirurus* e *Micrastur gilvicollis*. Essas espécies possuem distribuições geográficas bastante semelhantes (InfoNatura, www.natureserve.org), abrangendo grande parte da região noroeste da América do Sul e, com exceção de *Micrastur gilvicollis,* parte da costa brasileira.

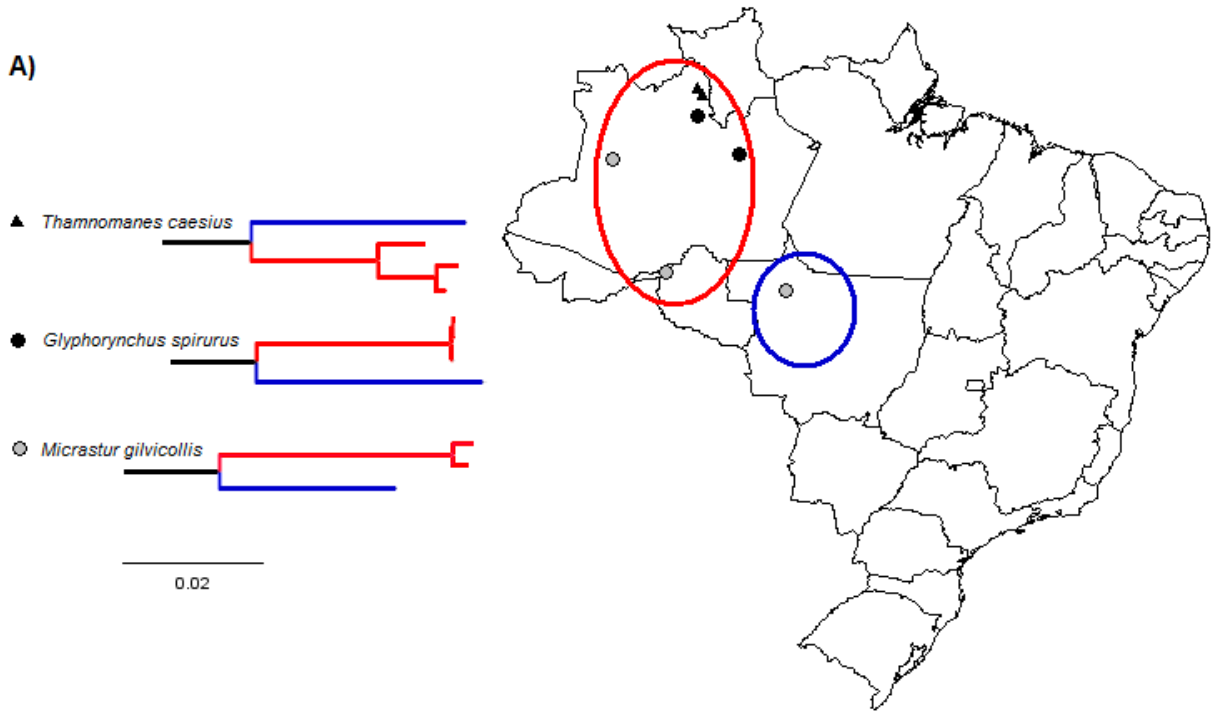


Figura 2. Trechos da árvore de *Neighbor-joining* de espécies de aves neotropicais com valores de divergência intra-específica maiores que 2% e, três ou mais indivíduos amostrados. Os valores de *bootstrap* de todos os agrupamentos são maiores que 95%. A) e B) Mapas do Brasil indicando algumas espécies com o mesmo padrão de distribuição geográfica de suas linhagens; C) Mapa da América do Sul indicando espécies e as distribuições de suas linhagens. As cores dos ramos e os círculos nos mapas destacam as regiões de origem dessas amostras: vermelho para região noroeste do Brasil, azul para região centro-oeste, verde para região norte, amarelo para região sudeste, roxo para região nordeste e rosa para Argentina. Nos mapas, os símbolos diferentes representam locais de coleta de cada espécie, identificadas nas legendas. Espécies diferentes podem ter sido coletadas no mesmo local, o que resultou na sobreposição de alguns símbolos.

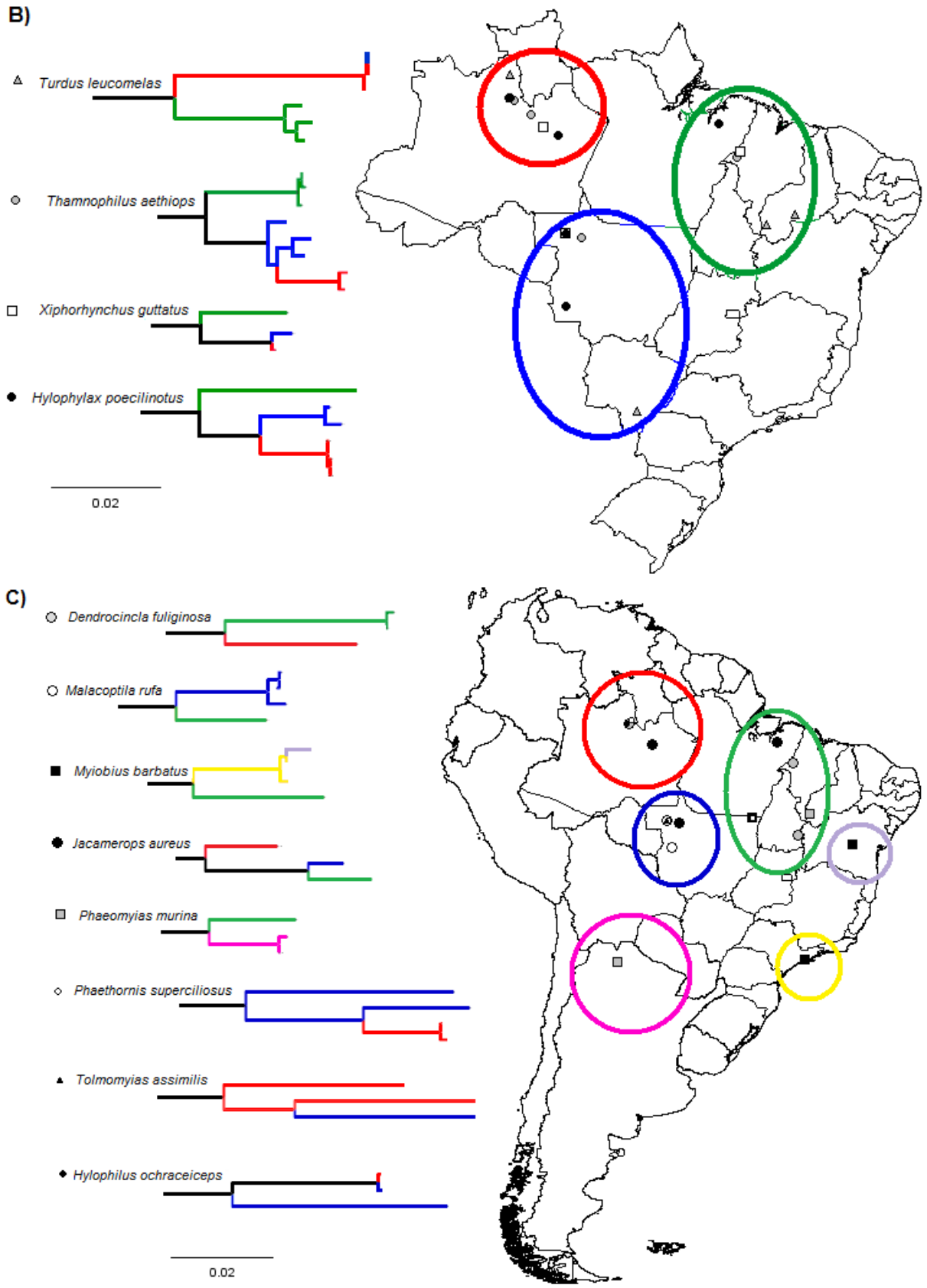


Figura 2. Continuação.

O segundo padrão comum de distribuição geográfica das amostras (Figura 2B) apresentou três linhagens principais: uma de indivíduos do centro-oeste, outra de amostras coletadas na região

noroeste e uma de aves do leste da Amazônia (Pará, Maranhão, Piauí e Tocantins; aqui denominada como norte). Nesse caso, as duas linhagens a oeste se agrupam como irmãs. As espécies que apresentam tal padrão são: *Turdus leucomelas, Thamnophilus aethiops, Xiphorhynchus guttatus* e *Hylophylax poecilinotus*. As distribuições dessas espécies também são bastante semelhantes (InfoNatura, www.natureserve.org). As espécies *Hylophylax poecilinotus,Thamnophilus aethiops* e *Xiphorhynchus guttatus* são encontradas na região noroeste da América do Sul. A espécie *X. guttatus* também pode ser encontrado em parte da costa brasileira. Já a distribuição de *Turdus leucomelas* cobre toda costa norte, nordeste e sudeste da América do Sul e região central do Brasil.

Um terceiro grupo de espécies (*Dendrocincla fuliginosa, Malacoptila rufa, Jacamerops aureus, Myiobius barbatus, Phaeomyias murina*, *Phaethornis superciliosus, Tolmomyias assimilis* e *Hylophilus ochraceiceps*; Figura 2C) não apresentou distribuições geográficas coincidentes de suas linhagens. Notar que, apesar de amostras de *Phaethornis superciliosus, Tolmomyias assimilis* e *Hylophilus ochraceiceps* ocorrerem nas regiões geográficas descritas para o primeiro padrão elas não formam clados reciprocamente monofiléticos e, portanto, não possuem esse padrão comum às três primeiras espécies descritas (Figura 2A). As distribuições de todas essas espécies são bastante coincidentes (InfoNatura, www.natureserve.org), abrangendo grande parte da região noroeste da América do Sul. *Myiobius barbatus* também pode ser encontrado em parte da costa brasileira e nas regiões nordeste e centro-oeste do Brasil. *Phaeomyias murina* também pode ser encontrado na região nordeste e centro-oeste do Brasil e parte da Argentina.

Os representantes de *Conopophaga lineata* não formaram um clado monofilético como os de *Conopophaga aurita* formaram, mas com baixo suporte (Figura 3). Além disso, *C. aurita* aparece contido em *C. lineata*. Por este motivo, os pontos de coleta dos indivíduos destas espécies foram plotados separadamente em outro mapa contendo suas áreas de distribuição para permitir melhor análise desse resultado.

Apesar de terem sido observados diversos padrões de distribuição geográfica, foi possível identificar seis regiões que se destacaram: região noroeste do Brasil (Amazônia e Rondônia), região centro-oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), região norte (Pará, Maranhão, Piauí e Tocantins), região sudeste (São Paulo), região nordeste (Bahia) e Argentina.

2.3.2. Diversidade da ordem Psittaciformes

As menores divergências interespecíficas (menos de 3%) foram todas encontradas em 34 pares de espécies de psitacídeos (Tabela 4). Por este motivo, foi realizada uma análise somente com amostras desse grupo. Do total de amostras de psitacídeos sequenciadas (349), 333 foram utilizadas na análise por representarem espécies com mais de um indivíduo, incluindo as espécies do grupo não neotropical. A composição média de bases nitrogenadas A, T, C e G da região do *DNA barcode* foi 26,4%, 24,4%, 31,9% e 17,3%, respectivamente. Esses valores também estão de acordo com os valores encontrados para o *DNA barcode* de outras aves. O tamanho das sequências variou de 590 a 996 pb, incluindo toda a região do *DNA barcode*.

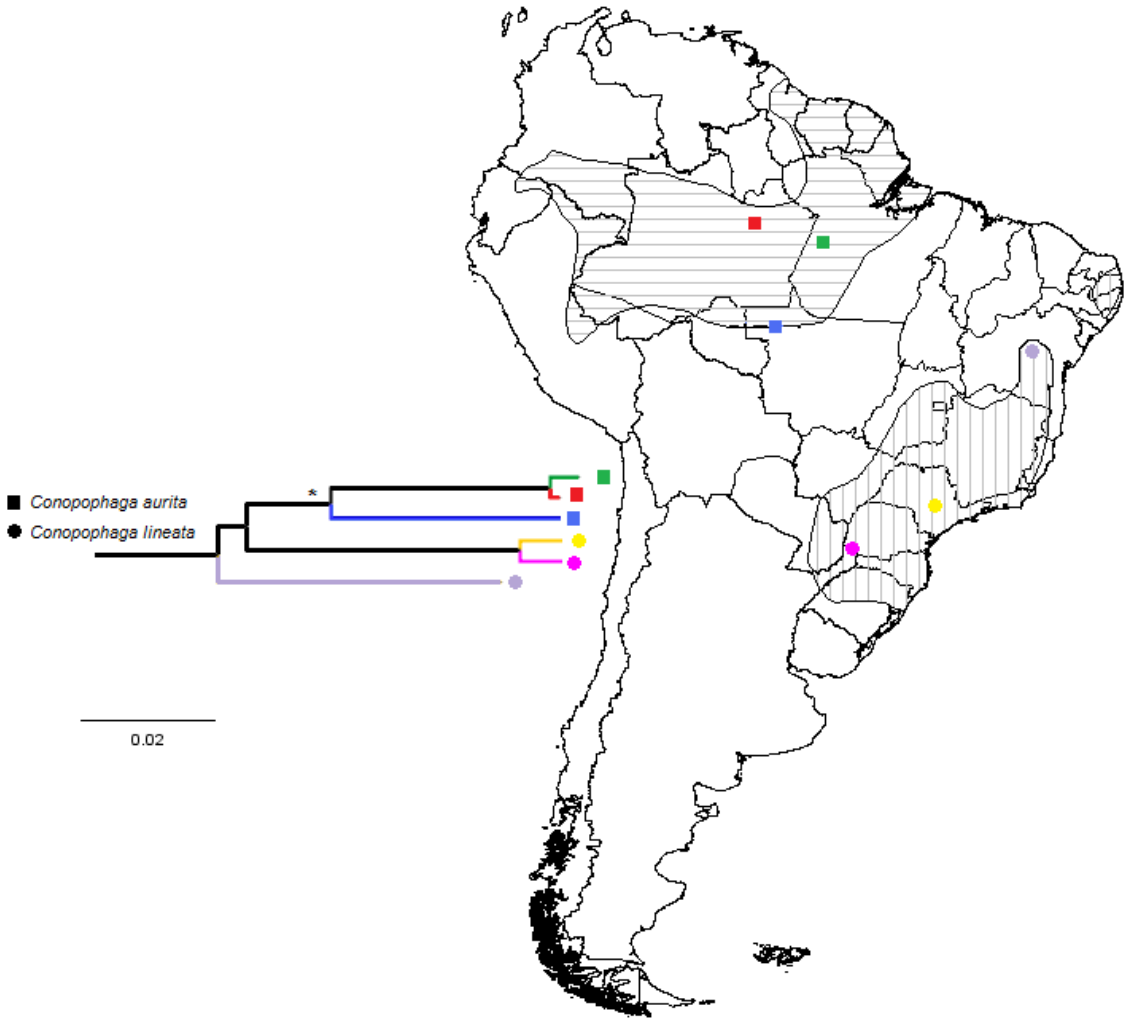


Figura 3. Trecho de árvore de *Neighbor-joining* de duas espécies do gênero *Conopophaga*, com valores de divergência intra-específica maiores que 2%. Os valores de *bootstrap* dos agrupamentos são maiores que 95%, exceto no nó indicado por asterisco que corresponde a 85%. As cores dos ramos e dos símbolos ilustram as localidades de origem dessas amostras: vermelho para região noroeste do Brasil, azul para região centro-oeste, verde para região norte, amarelo para região sudeste, roxo para região nordeste e rosa para Argentina. No mapa da América do Sul, os símbolos mostram o local de coleta de cada espécie. As regiões hachuradas ilustram as áreas de distribuição de *Conopophaga lineata* (linhas verticais) e de *Conopophaga aurita* (linhas horizontais).

Tabela 4. Pares de espécies com divergência interespecífica menor que 3%. Abaixo da linha tracejada estão os pares de espécies que poderiam ser identificados segundo o critério de 2% de divergência proposto por Hebert *et al* (2004b) e acima da linha tracejada, aqueles cuja identificação não poderia ser feita.

Espécie A	Espécie B	Distância interespecífica
Rhynchopsitta pachyrhyncha	*Rhynchopsitta terrisi*	0,001
Aratinga auricapillus	*Aratinga jandaya*	0,004
Myiopsitta luchsi	*Myiopsitta monachus*	0,005
Amazona aestiva	*Amazona ochrocephala*	0,006
Aratinga auricapillus	*Aratinga pintoi*	0,006
Amazona auropalliata	*Amazona oratrix*	0,007
Aratinga jandaya	*Aratinga pintoi*	0,007
Brotogeris chiriri	*Brotogeris versicolurus*	0,007
Pyrhurra picta	*Pyrrhura leucotis*	0,009
Pyrrhura melanura	*Pyrrhura egregia*	0,011
Brotogeris cynoptera	*Brotogeris chrysopterus*	0,015
Pionites leucogaster	*Pionites melanocephalus*	0,016
Amazona aestiva	*Amazona auropaliata*	0,017
Amazona auropaliata	*Amazona ochrocephala*	0,017
Pyrrhura melanura	*Pyrrhura perlata*	0,019
Amazona aestiva	*Amazona oratrix*	0,02
Amazona oratrix	*Amazona ochrocephala*	0,02
Pyrhurra picta	*Pyrrhura pfrimeri*	0,02
Pyrrhura pfrimeri	*Pyrrhura leucotis*	0,02
Pyrhurra picta	*Pyrrhura roseifrons*	0,022
Pyrrhura roseifrons	*Pyrrhura leucotis*	0,022
Amazona collaria	*Amazona ventralis*	0,023
Pyrrhura egregia	*Pyrrhura perlata*	0,024
Pyrrhura melanura	*Pyrrhura rhodocephala*	0,024
Pyrrhura perlata	*Pyrrhura frontalis*	0,024
Pyrrhura roseifrons	*Pyrrhura pfrimeri*	0,024
Primolius maracana	*Primolius auricolis*	0,025
Pyrrhura perlata	*Pyrrhura rhodocephala*	0,025
Pyrrhura rhodocephala	*Pyrrhura frontalis*	0,025
Pyrrhura egregia	*Pyrrhura rhodocephala*	0,028
Pyrrhura melanura	*Pyrrhura frontalis*	0,028
Aratinga erythrogenys	*Aratinga holochlora*	0,029
Aratinga erythrogenys	*Aratinga mitrata*	0,029
Pyrrhura frontalis	*Pyrrhura egregia*	0,03

A divergência interespecífica variou de 0,1% a 18,5%. A diversidade intra-específica variou de 0 a 2,9%, sendo o maior valor encontrado na espécie *Amazona autumnalis*. As duas amostras utilizadas dessa espécie pertencem a subespécies diferentes, *A. a. diadema* e *A. a. lilacina.* No gráfico de distribuição da frequência dos valores de distâncias intra- e interespecíficas de psitacídeos (Figura 4) pode ser observada uma sobreposição. A média e o desvio padrão obtidos para a diversidade intra-específica foi de 0,3% ± 0,4% e para divergência interespecífica foi de 12,3% ±

2,5%. Mais de 60% dos valores de diversidade intra-específica são menores do que 1%, enquanto que mais de 70% dos valores de divergências interespecíficas são maiores que 15%.

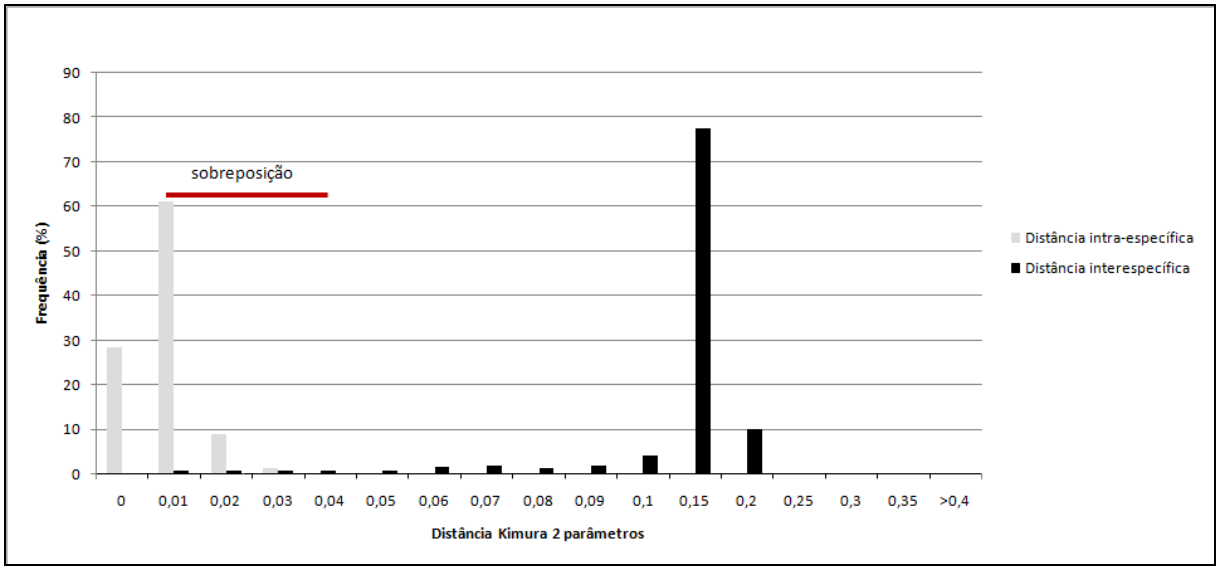


Figura 4. Distribuição dos valores de distâncias intra- e interespecíficas. O traço em vermelho mostra a região em que ocorre a sobreposição desses valores.

Nas árvores de *Neighbor-joining,* a maioria das amostras pertencentes à mesma espécie se agrupou em clados reciprocamente monofiléticos com alto suporte de *bootstrap* (>95). As exceções foram: 1) *Rhynchopsitta pachyrhyncha, Rhynchopsitta terrisi, Amazona aestiva, Amazona ochrocephala*, *Amazona oratrix* e *Pyrrhura perlata* que não formaram grupos monofiléticos*;* 2) *Amazona auropalliata, Aratinga auricapilus, A. pintoi, A. jandaya, Myiopsitta luchsi, M. monachus, Pyrrhura melanura, P. egregia* e *P. leucotis* que formaram grupos monofiléticos, mas com baixo suporte de *bootstrap* (<90%).

Como a grande maioria das amostras analisadas pertence ao grupo neotropical (15 amostras do total de 783), foi realizado um teste retirando as amostras dos psitacídeos não neotropicais e todas as análises foram repetidas. Esse teste foi realizado a fim de verificar o quanto essas amostras não neotropicais influenciavam os resultados. Foi observado que a retirada dessas amostras não alterou os resultados.

2.4. Discussão

2.4.1. Distâncias genéticas

Os resultados encontrados para a amostra de 228 espécies de aves neotropicais mostraram que existe sobreposição dos valores de distância intra- e interespecífica (Figuras 1 e 4), ou seja, não há uma clara lacuna como Hebert *et al* (2003) esperavam. Isso prejudica a identificação de pares de espécies cujos valores de distância interespecífica se encontram dentro dessa região, mas não impede que a maior parte das espécies seja identificada.

Segundo Hebert *et al* (2004b), o valor mínimo de divergência entre as sequências do *DNA barcode* usadas na identificação de espécies deveria ser dez vezes maior do que a variação intra-específica média do grupo estudado. Considerando todas as aves neotropicais analisadas no presente estudo, o valor mínimo de divergência entre espécies seria 9% (dez vezes 0,9%) e esse valor não permitiria identificar a maioria das espécies. Entretanto, considerando somente os psitacídeos, tal valor seria de 3% (dez vezes 0,3%), que é semelhante ao que foi proposto por Hebert *et al* (2004b) para diagnosticar espécies de aves norte-americanas (2,7%). A maior distância intra-específica média do conjunto de todas as aves neotropicais utilizadas nesse estudo em relação àquela encontrada somente nos psitacídeos pode estar associada a algumas hipóteses. A amostragem de psitacídeos foi mais completa, inclusive com táxons que provavelmente se divergiram recentemente e, portanto não teriam tido tempo suficiente para acumularem tantas diferenças em suas sequências. A ausência de estrutura populacional e a baixa variabilidade genética relatadas em algumas espécies de psitacídeos poderiam resultar em baixos valores de diferenças intra-específicas (Wright *et al* 2005, Leite *et al* 2008), porém como ainda são poucas as espécies investigadas, mais estudos são necessários para verificar se esse é um padrão comum à ordem.

Ainda, essa diferença entre a distância intra-específica média das aves neotropicais e os psitacídeos também pode estar relacionada à presença de estrutura populacional mais marcada nas espécies de aves neotropicais de outras ordens. Isso é congruente com os nossos dados que indicam algumas espécies com altos valores de distâncias intra-específicas. Outra hipótese é que essas espécies com altos valores de distâncias intra-específicas podem constituir complexos de espécies crípticas. Espécies crípticas são consideradas morfologicamente idênticas, mas não intercruzam e diferem em outras características, como por exemplo, na variação genética (Futuyma 2003). Diversos estudos baseados no *DNA barcode* sugeriram a existência de espécies crípticas em táxons de borboletas, insetos e vespas (Hebert *et al* 2004a, Smith *et al* 2006, Smith *et al* 2008b). Para confirmar se existem espécies crípticas em determinados grupos de aves neotropicais seria necessário realizar estudos filogenéticos detalhados, de preferência com a inclusão de sequências do DNA nuclear. Assim seria possível avaliar o limite entre as espécies. Além disso, seria importante agregar outros dados independentes, como a ecologia e a morfologia do grupo.

Entretanto, assumindo o valor mínimo de 2% de divergência entre as espécies, proposto por Hebert *et al* (2004b), para todo conjunto de nossos dados, 92,5% das espécies utilizadas no presente estudo poderiam ser identificadas. Ou seja, com exceção de espécies com distâncias intra-específicas maiores do que esse valor e divergências interespecíficas menores que esse valor, a maioria das amostras pode ser diagnosticada com o *DNA barcode* sem que a sobreposição dessas distâncias interfira no resultado. Dentre essas amostras que não poderiam ser identificadas, 4,3% das espécies apresentaram alta diversidade intra-específica, ou seja, maiores que 2%. Os 3,2% restantes corresponde a pares de espécies com baixa divergência.

2.4.2. Distâncias intra-específicas

A análise de espécies com três ou mais indivíduos que apresentaram altos valores de diversidade intra-específica mostrou que há alguma congruência entre os agrupamentos de

indivíduos obtidos baseados nos dados do *DNA barcode* e sua ocorrência geográfica (Figuras 2 e 3). Essa análise inicial pode ser bastante útil para apontar espécies que podem ser boas candidatas para futuros estudos biogeográficos. Isso pode ser mais uma evidência de que os dados gerados com o *DNA barcode* de aves neotropicais fornecem informações importantes para se entender os padrões de diversificação da região neotropical como apontado por Kerr *et al* (2009). Nesse estudo foram utilizadas 500 espécies da avifauna argentina das quais 5,4% (21 espécies) apresentaram alguma estruturação populacional. Os autores identificaram casos de: A) linhagens alopátricas com áreas de distribuição das populações coincidentes com a estrutura observada; B) linhagens alopátricas com áreas de distribuição das espécies aparentemente contínua; C) linhagens parapátricas e D) linhagens simpátricas.

No presente estudo foram identificadas cinco regiões geográficas principais. Algumas espécies apresentaram aparente estrutura populacional que coincide com essas regiões. Há espécies com distribuições geográficas semelhantes que apresentam distribuições distintas de suas linhagens baseadas no *DNA barcode*. Os padrões de distribuição geográfica aqui observados e aqueles relatados por Kerr *et al* (2009) podem ajudar a direcionar novos estudos mais detalhados que visem compreender os padrões de diversificação e a diversidade de aves neotropicais existentes, destacando grupos que mereçam mais investigações. A estruturação observada nesses mesmos grupos também pode indicar potenciais novas espécies ou espécies ainda em divergência, e a utilização de mais locos, estudos ecológicos, comportamentais e morfológicos poderiam ser realizados para esclarecer a história evolutiva desses grupos.

As espécies com altos valores de diversidade intra-específica com menos de três representantes precisam ser melhor amostradas para permitir realizar qualquer inferência em relação às suas estruturas geográficas. Entretanto, muitas dessas espécies, como por exemplo, *Hylophylax naevius*, apresentam o mesmo padrão de estrutura observado nos grupos ilustrados na Figura 2. É importante ter diversos indivíduos amostrados de localidades distintas para que seja possível diagnosticar espécies com estrutura populacional complexa ou uma nova unidade taxonômica. Mesmo para as espécies que apresentaram padrões semelhantes de distribuição seria necessário ter uma maior amostragem para que outras conclusões pudessem ser feitas, pois nem todas as regiões de ocorrência dessas espécies foram representadas.

2.4.3. Distâncias interespecíficas

As espécies com baixa divergência interespecífica, 3,2% do total de amostras, não puderam ter sua espécie atribuída segundo o critério de 2% de divergência mínima entre as espécies descrito por Hebert *et al* (2004b). Isso pode ser consequência de diversos processos evolutivos, como hibridação ou pouco tempo de divergência entre as espécies, ou seja, não houve tempo suficiente para as linhagens acumularem mutações nas sequências do *DNA barcode* que permita a diagnose dessas espécies. É importante ressaltar que todas essas amostras pertencem ao grupo dos psitaciformes. Este é o grupo de aves melhor representado no presente trabalho, 42,5% de todas as espécies neotropicais analisadas. Sendo assim, apresenta um grande número de espécies proximamente relacionadas. Isso pode ter resultado na baixa divergência interespecífica observada.

Foi realizada uma análise excluindo os psitaciformes e considerando apenas as demais aves neotropicais, o resultado mostrou que 99% dos valores de divergências interespecíficas são maiores do que 9%. Isso porque as espécies comparadas não são tão proximamente relacionadas, como são as espécies dos psitaciformes analisadas.

Alguns autores já haviam levantado o problema de utilizar um único valor de distância para identificação de espécies, principalmente daquelas proximamente relacionadas (Moritz e Cicero 2004, Meyer e Paulay 2005, Rubinoff 2006). Assim, foi sugerido que um valor universal para delimitar os táxons não deve ser considerado como um critério objetivo para estabelecer o limite entre as espécies (DeSalle *et al* 2005). Algumas alternativas foram propostas para diagnosticar as espécies de maneira mais robusta, como a utilização de caracteres diagnósticos e métodos estatísticos, que consideram genética de populações e a teoria da coalescência (Frézal e Leblois 2008). Em aves, tal análise foi aplicada em pares de espécies irmãs de diversas ordens e possibilitou a identificação de todas as espécies utilizadas (Tavares e Baker 2008). Nossos dados também foram analisados utilizando essa metodologia e isso está descrito no próximo capítulo.

2.4.2. Árvores de Neigbor-joining

Considerando o agrupamento nas árvores de *Neigbor-joining*, 98,7% das espécies de aves neotropicais estudadas podem ser identificadas por formarem grupos reciprocamente monofiléticos. Aqui estamos também considerando as espécies que formaram clados com baixo suporte de *bootstrap* (*Conopophaga aurita*, *Micrastur gilvicollis*, *Myrmotherula longipennis, Aratinga auricapilus, A. pintoi, A. jandaya, Myiopsitta luchsi, M. monachus, Pyrrhura melanura, Pyrrhura egregia* e *Pyrrhura leucotis*).

As espécies *Conopophaga lineata, Rhynchopsitta pachyrhyncha, Rhynchopsitta terrisi, Amazona aestiva, A. ochrocephala, A. auropalliata* e *A. oratrix* (que correspondem a aproximadamente 1% do total de amostras analisadas) não formaram clados reciprocamente monofiléticos nas árvores de *Neigbor-joining*. Portanto, com os métodos de análise aqui utilizados, tais espécies não podem ser identificadas utilizando o *DNA barcode.* Este fato poderia ser resultado de processos como retenção de polimorfismo ancestral ou hibridação, por exemplo. Para averiguar essas hipóteses, seria necessário, por exemplo, adicionar análises de genes nucleares e de seus caracteres diagnósticos.

Foram analisadas quatro amostras da espécie *Pyrrhura perlata*. Duas dessas amostras se agruparam com baixo suporte de *bootstrap* com a espécie *P. frontalis* (distância interespecífica de 4,9%) e as outras duas agruparam-se a outro clado formado pelas espécies *Pyrrhura melanura* e *P. egregia*, com bom suporte de *bootstrap*. De acordo com Ribas *et al* (2006) o gênero *Pyrrhura* apresenta três principais linhagens evolutivas: uma incluindo a espécie *P. cruentata*, endêmica da Floresta Atlântica, a segunda compreendendo o complexo *picta-leucotis* e o terceiro grupo incluindo as demais espécies. Nesse mesmo estudo filogenético foi verificado que a espécie *P. perlata* é irmã de *P. lepida* e esse clado é irmão de *P. frontalis*. A espécie *P. egregia* não foi utilizada no estudo de Ribas *et al* (2006) e, portanto, as relações entre ela, *P. melanura* e *P. perlata* não puderam ser avaliadas. Assim, apesar do baixo suporte de *bootstrap*, não é possível descartar que a espécie de *P.*

perlata possa ser grupo relacionado a *P. frontalis* o que estaria de acordo com o resultado obtido por Ribas *et al* (2006). Em relação ao outro grupo de *P. perlata* que parece ser uma unidade taxonômica distinta, pode ter havido erro de identificação na coleta do material ou no manuseio das amostras. Além disso, essas amostras foram coletadas em cativeiro, ou seja, sem procedência na natureza conhecida, o que limita ainda mais qualquer inferência em relação a esse grupo.

Os métodos baseados em árvores de distância utilizam o monofiletismo recíproco dos grupos para delimitação das espécies. Esses métodos também apresentam limitações, mesmo quando as árvores são bem suportadas. Isso porque o agrupamento dos haplótipos não garante que o grupo pertença a uma unidade taxonômica distinta (Rosenberg 2007).

2.5. Conclusão

A sobreposição dos valores de distância intra- e interespecífica não impediu que o *DNA barcode* diagnosticasse a maioria das espécies, mostrando ser uma ferramenta muito útil na identificação rápida de aves neotropicais. Esse grupo de aves bastante diversificado e com esperada estrutura populacional complexa parece não ser um desafio para o *DNA barcode*, contrariando o ceticismo em relação ao uso do marcador nas aves neotropicais.

Alem disso, ter um banco de dados padronizado com sequências do *DNA barcode* de todos os táxons existentes possibilita utilizar as informações de tais sequências para diversos fins. No presente estudo o método forneceu informações que podem ser relevantes a estudos biogeográficos de ave neotropicais, contribuindo na compreensão da diversidade dessa região.

Foram identificadas espécies proximamente relacionadas que não puderam ser identificadas, o que pode ser uma limitação desse marcador ou da metodologia utilizada. É possível que a análise de caracteres diagnósticos das sequências do *DNA barcode* e/ou a utilização de outros marcadores mitocondriais e nucleares de tais espécies possam complementar as informações aqui obtidas e mostrar que elas realmente constituem unidades taxonômicas distintas.

2.6. Referências

Bruford M. W., Hanotte O., Brookfield J. F. Y. e Burke T. 1992. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel A. R. (ed) *Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*. Oxford: University Press, 225-269.

DeSalle R., Egan M. G. e Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. Phil. Trans. R. Soc. B., 360, 1905-1916.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39, 783-791.

Frézal L. e Leblois R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. Inf. Genet. Evo., 8, 727-736.

Futuyma D. J. 2003. *Biologia Evolutiva*. Riberão Preto: FUNPEC Editora, 116-121.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., 41, 95-98.

Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. e Waard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. London B., 270, 313–321.

Hebert P. N. D., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H. e Hallwachs W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 14812-14817.

Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S. e Francis C. M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. Plos Biol., 2, 01-06.

Ivanova N. V., deWaard J. R. e Hebert P. D. N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. Mol. Ecol. Notes, 6, 998–1002.

Kerr K. C. R., Lijtmaer D. A., Barreira A. S., Hebert P. D. N. e Tubaro P. L. 2009. Probing evolutionary patterns in Neotropical birds through DNA barcodes. PlosOne, 4, 1-6.

Kerr K. C. R., Stoeckle M. Y., Dove C. J., Weigt L. A., Francis C. F. e Hebert P. D. N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Mol. Ecol. Notes, 7, 535-543.

Kimura M. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16, 111-120.

Meyer C. P. e Paulay G. 2005. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive samplig. Plos Biol., 3, 01-10.

Moritz C. e Cicero C. 2004. DNA Barcoding: promise and pitfalls. Plos Biol., 2, 1529-1531.

Ribas C. C., Joseph L. e Miyaki C. Y. 2006. Molecular systematics and patterns of diversification in *Pyrrhura* (Psittacidae), with special relevance to the *picta-leucotis* complex. Auk, 123, 660-680.

Rosenberg N. A. 2007. Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. Evolution, 61, 317-323.

Rubinoff D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. Conserv. Biol., 4, 1026-1033.

Smith M. A., Poyarkov N. A. e Hebert P. D. N. 2008a. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. Mol. Ecol. Notes, 8, 235-246.

Smith M. A., Rodriguez J. J., Whitfield J. B., Deans A. R., Janzen D. H., Hallwachs W. e Hebert P. D. N. 2008b. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 34, 12359-12364.

Smith M. A., Woodley N. E., Janzen D. H., Hallwachs W. e Hebert P. D. N. 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 3657-3652.

Stotz D. F., Fitzpatrick J. W., Parker III T. A. e Moskovits D. K. 1996. *Neotropical Birds – Ecology and Conservation*. Chicago: The University of Chicago Press.

Tamura K., Dudley J., Nei M. e Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol., 24, 1596-1599.

Tavares E. S. e Baker A. J. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. Evol. Biol., 8, 1-27.

Tavares E. S., Baker A. J., Pereira S. L. e Miyaki C. M. 2006. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Syst. Biol., 55, 454-470

Ward R. D. e Holmes B. H. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. Mol. Ecol. Notes, 7, 899–907.

Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R. e Hebert P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, 360, 1847–1857.

Capítulo 3

Análise de caracteres diagnósticos no *DNA barcode* de espécies proximamente relacionadas de psitacídeos neotropicais (tribo Arini)

3.1. Introdução

A identificação realizada por meio do *DNA barcode* (sequência do gene mitocondrial *coxI*) se baseia na utilização de valores de distância intra- e interespecíficos (Hebert *et al* 2003, Meyer e Paulay 2005). A eficácia desse método depende da amostragem completa de táxons presentes no banco de dados e é susceptível a falsos positivos, quando, por exemplo, a amostragem taxonômica é incompleta (Frézal e Leblois 2008). Outro fator limitante é que os níveis de divergências interespecíficos podem variar entre os táxons e a adoção de um valor único de distância interespecífica pode não permitir distinguir alguns grupos (Ward *et al* 2005).

A dúvida em relação à distância genética como uma medida válida para delimitar espécies levou ao desenvolvimento de métodos alternativos, como os baseados em caracteres (DeSalle *et al* 2005, DeSalle 2007, Frézal e Leblois 2008, Kelly *et al* 2007, Waugh *et al* 2007). Esses métodos são semelhantes aos empregados pela taxonomia tradicional, sendo baseados na verificação da presença ou ausência de um caráter diagnóstico (Wong *et al* 2009). No caso do *DNA barcode* os caracteres diagnósticos são sítios com sequência fixa em uma espécie, mas diferente em outras espécies (Wong *et al* 2009). Alguns autores denominaram esses caracteres de caracteres atribuídos, substituições fixas diagnósticas ou nucleotídeos diagnósticos (Rach *et al*. 2008, Tavares e Baker 2008, Wong *et al* 2009). Estudos aplicando essa metodologia obtiveram sucesso na identificação de espécies de insetos, moluscos, tubarões e aves (Kelly *et al*. 2007; Rach *et al*. 2008, Tavares e Baker 2008, Wong *et al* 2009).

A ordem Psittaciformes (Aves) é um modelo interessante para testar o potencial de identificação de espécies proximamente relacionadas de aves neotropicais baseado nos caracteres diagnósticos do *DNA barcoding*. Essa ordem possui um grupo com espécies exclusivamente neotropicais, a tribo Arini para a qual ainda não foi avaliada a aplicabilidade do *DNA barcode*. Esse grupo de aves foi alvo de diversos estudos filogenéticos moleculares (Miyaki *et al* 1998; Russello e Amato 2004; Eberhard e Bermingham 2004, 2005; Ottens-Wainright *et al* 2004; Ribas e Miyaki 2004; Tavares *et al* 2004, 2006; de Kloet e de Kloet 2005; Ribas *et al* 2005, 2006). Assim, é possível utilizar informações dessas filogenias, como a monofilia dos táxons e a relação de espécies irmãs, na interpretação e análise dos dados gerados com o *DNA barcoding.*

Dentro desse contexto, o presente trabalho visa identificar caracteres diagnósticos nos *DNA barcodes* de pares de espécies irmãs de psitacídeos neotropicais a fim de verificar se tais caracteres permitem a distinção das mesmas. Além disso, vamos buscar identificar caracteres diagnósticos exclusivos de grupos de espécies que não puderam ser identificados na análise do capítulo anterior por apresentarem baixas distâncias interespecíficas ou por não formarem clados reciprocamente monofiléticos nas árvores de *Neighbor-joining*.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Amostragem

A seleção das espécies irmãs foi baseada em inferências já conhecidos de estudos filogenéticos multigênicos com bom suporte. Todas as amostras utilizadas aqui pertencem à coleção do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Informações sobre essas e outras amostras se encontram no Apêndice I. A análise de caracteres diagnósticos foi realizada em dois conjuntos de táxons. No primeiro grupo foram selecionadas espécies irmãs dos gêneros *Amazona*, *Ara*, *Aratinga* e *Brotogeris* e o par de espécies irmãs *Alipiopsitta xanthops* e *Graydidascalus brachyurus* (Tabela 1). Esses pares de espécies irmãs foram escolhidos por apresentarem pelo menos três indivíduos por espécie. Para o segundo conjunto foram selecionadas espécies dos gêneros *Amazona, Aratinga, Myiopsitta, Pionites, Pyrrhura* e *Rhynchopsitta* (Tabela 2) que apresentaram baixas distâncias interespecíficas ou não formaram clados reciprocamente monofiléticos nas árvores de *Neighbor-joining* nas análises do capítulo anterior (Capitulo 2).

Tabela 1. Comparação de pares de espécies irmãs. N é número de indivíduos por espécie e D é a distância interespecífica. As referências utilizadas para seleção inicial das espécies irmãs estão indicadas.

Espécie	N	Espécie	N	D	Referência
Amazona farinosa	4	*Amazona kawalli*	5	3,5%	Russello e Amato (2004)
Alipiopsitta xanthops	5	*Graydidascalus brachyurus*	3	6,7%	Russello e Amato (2004)
Ara chloropterus	3	*Ara macao*	5	3,8%	Oliveira-Marques (2006)
Aratinga aurea	8	*Aratinga cactorum*	4	6,0%	Ribas e Miyaki (2004)
Brotogeris chiriri	3	*Brotogeris versicolurus*	7	0,7%	Ribas *et al* (2009)
Brotogeris chrysoptera	7	*Brotogeris cyanoptera*	8	1,5%	Ribas *et al* (2009)

Tabela 2. Comparação de pares de espécies com divergência interespecífica menor que 2%, valor mínimo de divergência proposto por Hebert *et al* (2004) e/ou não formaram clados reciprocamente monofiléticos nas árvores de *Neighbor-joining*. N é número de indivíduos por espécie e D é a distância interespecífica. As referências nos casos em que os pares de espécies são irmãs estão indicadas.

Espécie	N	Espécie	N	D	Referência
Amazona aestiva	9	*Amazona ochrocephala*	11	0,6%	
Amazona aestiva	9	*Amazona auropaliata*	2	1,7%	
Amazona aestiva	9	*Amazona oratrix*	2	2,0%	
Amazona auropaliata	2	*Amazona ochrocephala*	11	1,7%	
Amazona auropalliata	2	*Amazona oratrix*	2	0,7%	Russello e Amato (2004)
Amazona oratrix	2	*Amazona ochrocephala*	11	2,0%	
Aratinga auricapillus	5	*Aratinga jandaya*	5	0,4%	Ribas e Miyaki (2004)
Aratinga auricapillus	5	*Aratinga pintoi*	4	0,6%	
Aratinga jandaya	5	*Aratinga pintoi*	4	0,7%	
Myiopsitta luchsi	3	*Myiopsitta monachus*	3	0,5%	Russello e Amato (2004)
Pionites leucogaster	8	*Pionites melanocephalus*	7	1,6%	
Pyrhurra picta	5	*Pyrrhura leucotis*	4	0,9%	
Pyrhurra picta	5	*Pyrrhura pfrimeri*	2	2,0%	
Pyrrhura pfrimeri	2	*Pyrrhura leucotis*	4	2,0%	
Pyrrhura melanura	2	*Pyrrhura perlata*	4	1,9%	
Pyrrhura melanura	2	*Pyrrhura egregia*	2	1,1%	
Rhynchopsitta pachyrhyncha	2	*Rhynchopsitta terrisi*	2	0,1%	

3.2.2. Extração de DNA, seqüenciamento e análise das seqüências

O DNA foi extraído pelo método de digestão com proteinase K e purificação com fenol-clorofórmio (Bruford *et al* 1992). Algumas amostras tiveram o DNA extraído seguindo o protocolo de extração em placas "Glass Fiber Plate" (Ivanova *et al* 2006).

Amplificações da região do gene *coxI* foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com duas combinações de *primers*:

- BirdR1 (reverso): 5'-ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG-3' (Hebert *et al* 2004),
- LTyr (direto): 5'-TGTAAAAAGGWCTACAGCCTAACGC-3' (Oliver Haddrath, com. pessoal),
- COIH7557 (reverso): 5'-GGCGGATGTGAAGTATGCTCGGG-3' (presente trabalho),

A reação de amplificação tinha volume final de 10 µl, adotando-se o seguinte protocolo: 1 µl de dNTPs (10 mM total), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5U/ µl, Amersham Biosciences), 1 µl de tampão, 40 ng de DNA e água Milli Q para completar 10 µl finais.

A maioria das reações foi realizada com os *primers* COIH7557 e LTyr, originando um fragmento de aproximadamente 960 pb e realizada nas seguintes condições: 5 minutos a 95ºC; 40 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 63ºC e 40 segundos a 72ºC; finalizando com 10 minutos a 72°C. Quando as amplificações com esse par de *primers* não apresentavam produto em quantidade suficiente, os *primers* BirdR1 e LTyr foram utilizados para amplificação de um fragmento de aproximadamente 820 pb sob as seguintes condições: 5 minutos a 95ºC; 14 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 64ºC (abaixando 1°C por ciclo) e 40 segundos a 72ºC; 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C e 40 segundos a 72°C; finalizando com 10 minutos a 72°C.

Algumas amostras foram amplificadas e sequenciadas durante um estágio no *Royal Ontario Museum* (ROM, Canadá) utilizando, além dos *primers* descritos acima, os seguintes *primers:*

- COI748H (reverso): 5'-ACRTGNGAGATRATTCCRAANCCNG-3' (Rebecca Elbourne, com. pessoal),
- COI908aH2 (reverso): 5'-GTRGCNGAYGTRAARTATGCTCG-3' (Rebecca Elbourne, com. pessoal),
- COIART (direto): 5'-AACAAACCACAAAGATATCGG-3' (Erika Tavares, com. pessoal),
- COI2CR (reverso): 5'-GAAGAATCAGAANAGGTGTTG-3' (Oliver Haddrath, com. pessoal).

No ROM a maioria das reações foi realizada com os *primers* LTyr e COI908aH2 sob as seguintes condições: 2 minutos a 95ºC; 40 ciclos de 45 segundos a 94ºC, 45 segundos a 50ºC e 1 minuto a 72ºC; finalizando com 7 minutos a 72°C. Primeiramente a amplificação foi realizada com esse conjunto de *primers* e caso a amplificação não tivesse produto suficiente ou falhasse, outros conjuntos eram utilizados, seguindo as mesmas condições de amplificação.

Como todas as amostras da espécie *Brotogeris cyanoptera* e alguns indivíduos das espécies *B. chrysopterus*, *B. tirica*, *B. chiriri* e *B. versicolurus* apresentaram picos duplos nas sequências, *primers* específicos foram desenvolvidos para esse gênero no presente estudo:

- COIbrotoIntF1 (direto): 5'- GCACCCTCTACCTAATTTTCGGCGCATG- 3'

- COIbrotoIntF2 (direto): 5'-TTGGAAACTGACTAGTCCCCCTCATAATCGG- 3'
- COIbrotoIntF3 (direto): 5'-TTTCCTCCATCCTAGGGGCAATCAACTT- 3'
- COIbrotoIntR1 (reverso): 5'-GTGACGATCACATTGTAGATTTGGTCGTCTC- 3'
- COIbrotoIntR2 (reverso): 5'-TACACTGTTCAGCCTGTTCCCACTCCGG- 3'
- COIbrotoIntR3 (reverso): 5'-ACAGCTGTGATTAGGACTGATCAGACGA- 3'
- COIbrotoIntR4 (reverso): 5'-TAGTAAGCTACTACATGTGAAATGATTC- 3'

A amplificação dessas amostras foi feita com o conjunto LTyr e COIbrotoIntR4, nas condições acima descritas para o conjunto COIH7557 e LTyr. O restante dos *primers* foi utilizado no sequenciamento.

Os produtos de PCR obtidos a partir dessas amplificações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com polietilenoglicol (PEG 8000 20%, NaCl 2,5 M) ou cortando-se a banda do gel de agarose e centrifugando-a através de uma ponteira com filtro. Em seguida, os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de seqüenciamento utilizando os *primers* descritos e o kit "Big Dye Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems). Para a maioria das amostras os *primers* utilizados no sequenciamento foram LTyr e COIH7557. Somente quando não havia sobreposição confiável das sequências obtidas, o *primer* BirdR1 foi utilizado. Para as espécies sequenciadas no ROM, os *primers* mais usados foram COI748H em conjunto com o LTyr e somente quando a sobreposição não fosse confiável ou a reação falhasse, os outros *primers* descritos foram utilizados. O produto final da reação de seqüenciamento foi precipitado com isopropanol 75% ou com EDTA 125 Mm e acetato de sódio 3M. As seqüências então foram lidas em seqüenciador automático modelo ABI 377 ou ABI 3100 (Applied Biosystems).Os eletroferogramas das seqüências obtidas foram visualizados utilizando-se os programas Sequence Navigator e Sequence Analysis (Applied Biosystems). No programa CodonCode Aligner 1.4.1 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, EUA) as seqüências obtidas foram alinhadas e editadas, obtendo-se um seqüência consenso para cada indivíduo. No programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999) foi realizado o alinhamento, análise e edição manual de todas as seqüências consenso das espécies usadas.

3.2.3. Cálculo das distâncias intra- e interespecíficas e construção de árvores

A diversidade intra-específica e a divergência inter-específica foram calculadas utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P, Kimura 1980) no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al* 2007). Nesse mesmo programa uma árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) foi construída utilizando uma matriz de 536 caracteres com todos os táxons listados nas tabelas 1 e 2, utilizando o modelo K2P e aplicando-se 1000 réplicas de *bootstrap*, para obter o suporte dos agrupamentos (Felsenstein 1985).

3.2.4. Análise dos caracteres diagnósticos

Para identificar os sítios diagnósticos entre pares de espécies e obter uma figura ilustrativa dessa comparação foram realizados os seguintes passos. No programa BioEdit as sequências completas dos grupos e pares de espécies comparados foram visualizadas, com seus respectivos

sítios variáveis destacados. No programa PAUP* 4.0 (Swofford 2003) foram selecionados somente os sítios variáveis de cada par de espécies irmãs, de pares de espécies do mesmo gênero e de grupos de espécies do mesmo gênero que apresentaram baixas distâncias interespecíficas ou que não formaram clados reciprocamente monofiléticos nas árvores de NJ nas análises do capítulo anterior. Ou seja, foi obtida uma nova matriz de sequências alinhadas contendo somente os sítios variáveis. Para facilitar a visualização dos sítios diagnósticos, essa matriz foi transformada em figura no programa McClade 4.06 (Maddison e Maddison 2003). Em seguida, os sítios diagnósticos puros (encontrados em um táxon, mas ausentes em outro) foram identificados e selecionados utilizando programas de edição de figuras.

Para grupos de espécies do mesmo gênero que apresentaram baixas distâncias interespecíficas ou não formaram clados reciprocamente monofiléticos nas árvores de NJ a comparação dos sítios diagnósticos foi feita da seguinte forma: árvores de NJ foram construídas no programa MEGA e serviram como guias. A partir dessas árvores as espécies ou grupo mais basal foram identificados. Os sítios variáveis previamente selecionados no programa McClade e que fossem exclusivos desse grupo em relação aos demais foram identificados e quantificados. Em seguida, a mesma análise foi feita com o próximo grupo mais basal e assim sucessivamente até que todas as espécies tivessem sido verificadas.

3.3. Resultados

3.3.1. Pares de espécies irmãs

Para os seis pares de espécies irmãs com pelo menos três indivíduos representantes (Tabela 1) e que resultaram em agrupamentos monofiléticos nas árvores de *Neighbor-joining*, as distâncias interespecíficas variaram de 0,7 a 6,7%. O número de substituições fixas diagnósticas também variou entre os táxons analisados, de quatro a 39 (Figura 1).

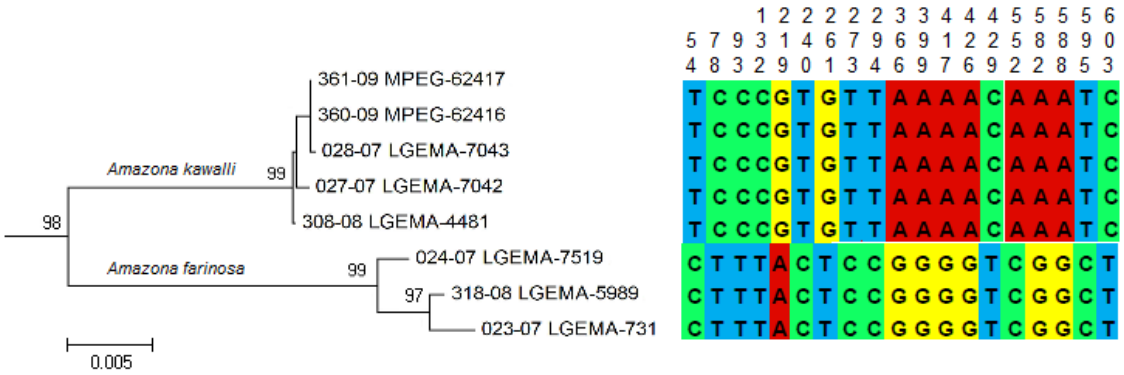


Figura 1. Segmentos da árvore de *Neighbor-joining* construída segundo o modelo K2P. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* maiores que 80%. Os nomes das espécies encontram-se nos respectivos ramos. As matrizes utilizadas na identificação de sítios diagnósticos possuíam 870, 855, 883, 867, 883 e 883 pb do *coxI*, respectivamente. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada indivíduo sequenciado são mostrados à direita, com os respectivos sítios acima das sequências.

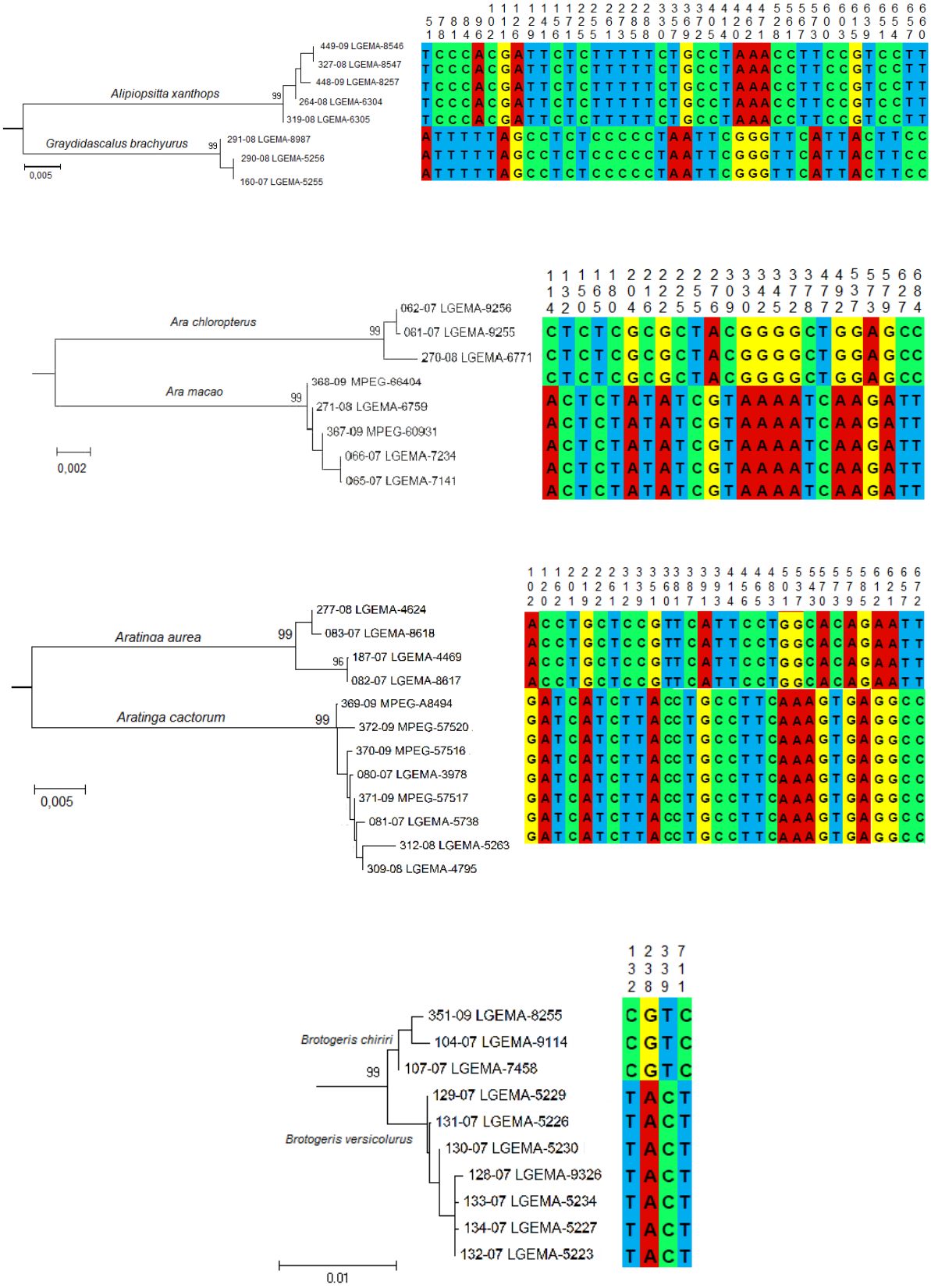


Figura 1. Continuação.

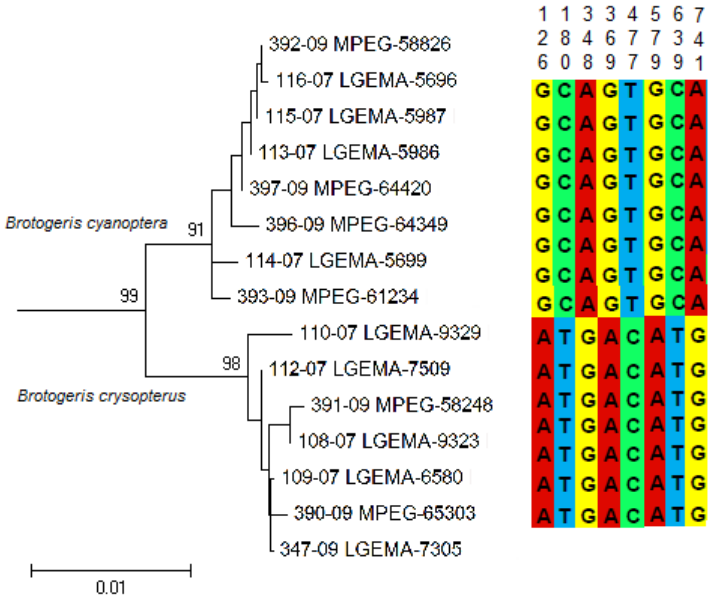


Figura 1. Continuação.

3.3.2. Pares de espécies com baixas distâncias interespecíficas

Três dos 17 pares de espécies com valores baixos de distâncias interespecíficas (Tabela 2) são irmãs e apresentaram número variável de substituições fixas diagnósticas, de duas a 11. Os pares de espécies dos gêneros *Myiopsitta* e *Pionites* apresentaram duas e oito substituições fixas diagnósticas, respectivamente (Figura 2). As sequências de *coxI* das duas espécies irmãs do gênero *Rhynchopsitta* não puderam ser diferenciadas, pois dentre as sequências dos quatro indivíduos analisados, somente uma apresenta uma substituição (Figura 2).

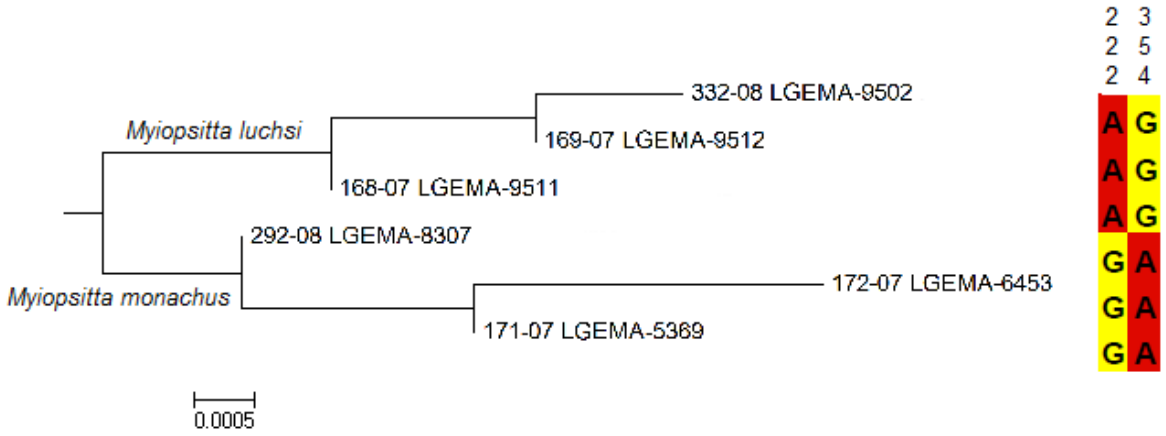


Figura 2. Segmentos da árvore de *Neighbor-joining* construída segundo o modelo K2P. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* maiores que 80%. Os nomes das espécies encontram-se nos respectivos ramos. As matrizes utilizadas na identificação de sítios diagnósticos possuíam 834, 846 e 834 pb do *coxI,* respectivamente. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada indivíduo sequenciado são mostrados à direita, com os respectivos sítios acima das sequências. No gênero *Rhynchopsitta* a única substituição encontrada nos quatro indivíduos analisados de suas duas espécies ocorre em apenas um individuo da espécie *R. terrisi*.

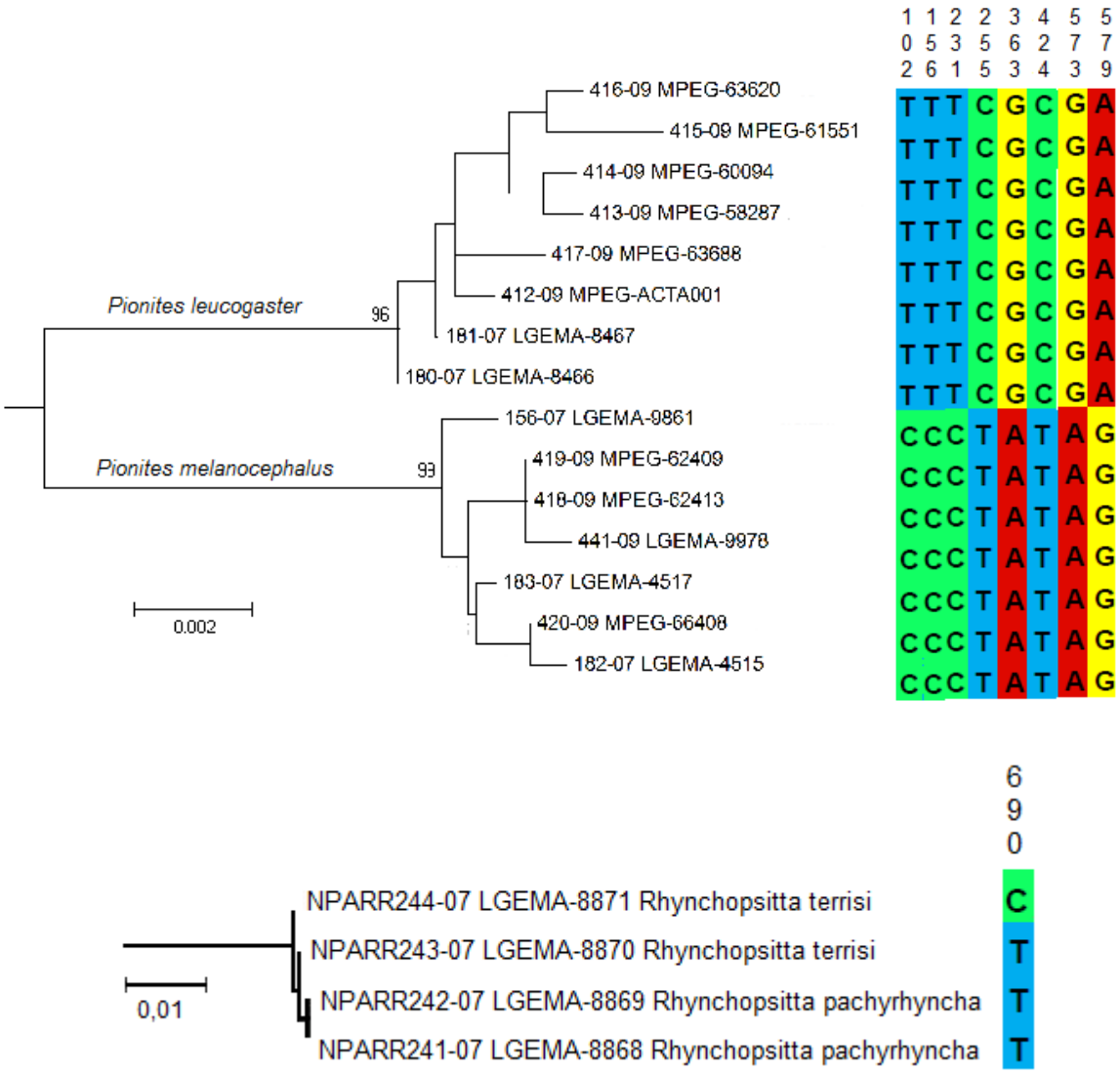


Figura 2. Continuação.

A espécie *Aratinga auricapillus* apresenta um sítio diagnóstico que a separa do clado formado por *A. pintoi* e *A. jandaya* (Figura 3). As espécies *A. pintoi* e *A. jandaya* apresentam quatro substituições que as separam em linhagens diferentes, uma diagnóstica da espécie *A. jandaya* e as outras três em *Aratinga pintoi*.

Os dois representantes de *Amazona oratrix* não aparecem como grupo monofilético (Figura 4). Mas o clado que contém *A. oratrix* e *A. auropaliata* apresentaram quatro substituições fixas que as separam do grupo *A. aestival A. ochrocephala* (Figura 4). A espécie *A. auropaliata* apresenta uma única substituição que a distingue das sequências de *A. oratrix*. As espécies *A. aestiva* e *A. ochrocephala* não se separam em unidades taxonômicas independentes baseando-se nas análises das sequências do *coxI.* Esse grupo se divide inicialmente em dois clados: um contendo uma única amostra da espécie *A. aestiva* com três mutações fixas diagnósticas em relação ao seu clado irmão, e outro clado com uma politomia com três grupos, todos contendo sequências de ambas as espécies. Os sítios diagnósticos entre esses três grupos são poucos (um, um e dois, respectivamente).

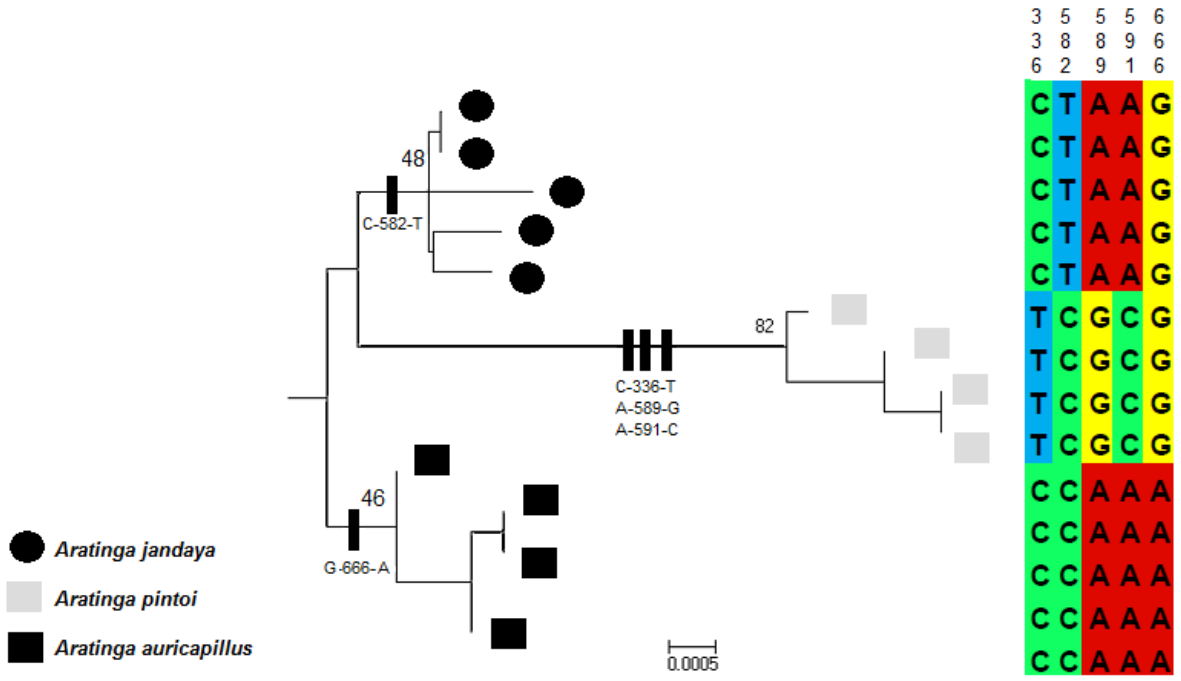


Figura 3. Segmento da árvore de *Neighbor-joining* construída segundo o modelo K2P. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* de cada linhagem. Os nomes das espécies encontram-se nas legendas. A matriz utilizada na identificação de sítios diagnósticos possuía 858 pb. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada linhagem estão representados nos ramos como barras pretas. Abaixo dessas barras estão as seguintes informações: o nucleotídeo presente no táxon irmão - a posição do sítio na sequência do *coxI* - o nucleotídeo diagnóstico da linhagem analisada. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada indivíduo sequenciado são mostrados à direita, com os respectivos sítios acima das sequências.

Dois grupos de espécies do gênero *Pyrrhura* foram analisados. Grupo A: incluindo as espécies *P. picta, P. leucotis, P. roseifrons* e *P. pfrimeri*, que apresentaram baixas distâncias interespecíficas. Grupo B: com as espécies *P. perlata, P. egregia, P. melanura* e *P. frontalis*, que também apresentaram espécies com baixas distâncias interespecíficas e no qual *P. perlata* formou um clado parafilético (Figura 5). Apesar das espécies *P. roseifrons* e *P. frontalis* não apresentarem baixas distâncias interespecíficas (menores ou iguais a 2%) com os membros dos seus respectivos grupos (ver tabela 4 do capítulo anterior), ambas fazem parte das árvores de *Neighbor-joining* encontrada para esses grupos e, portanto, foram incluídas nas análises. No grupo A, sete mutações separam o clado de *P. pfrimeri* das demais; no clado com as espécies *P. roseifrons, P. leucotis* e *P. picta*, nove mutações separam *P. roseifrons* das outras duas. O que distingue *P. leucotis* de *P. picta* são três mutações. No grupo B, cinco nucleotídeos diagnósticos separam o grupo de *P. frontalis* e duas amostras de *P. perlata* das demais e oito substituições separam essas duas espécies. No outro clado, formado pelas espécies *P. egregia, P. melanura* e duas outras amostras *de P. perlata,* nove mutações separam *P. perlata* das outras duas espécies e, duas mutações permitem diagnosticar *P. egregia* de *P. melanura.* Foi feita uma análise para verificar quantas substituições separam os dois grupos de *P. perlata* encontrados e o resultado foi que existem 12 substituições fixas diagnósticas que separam esses dois grupos.

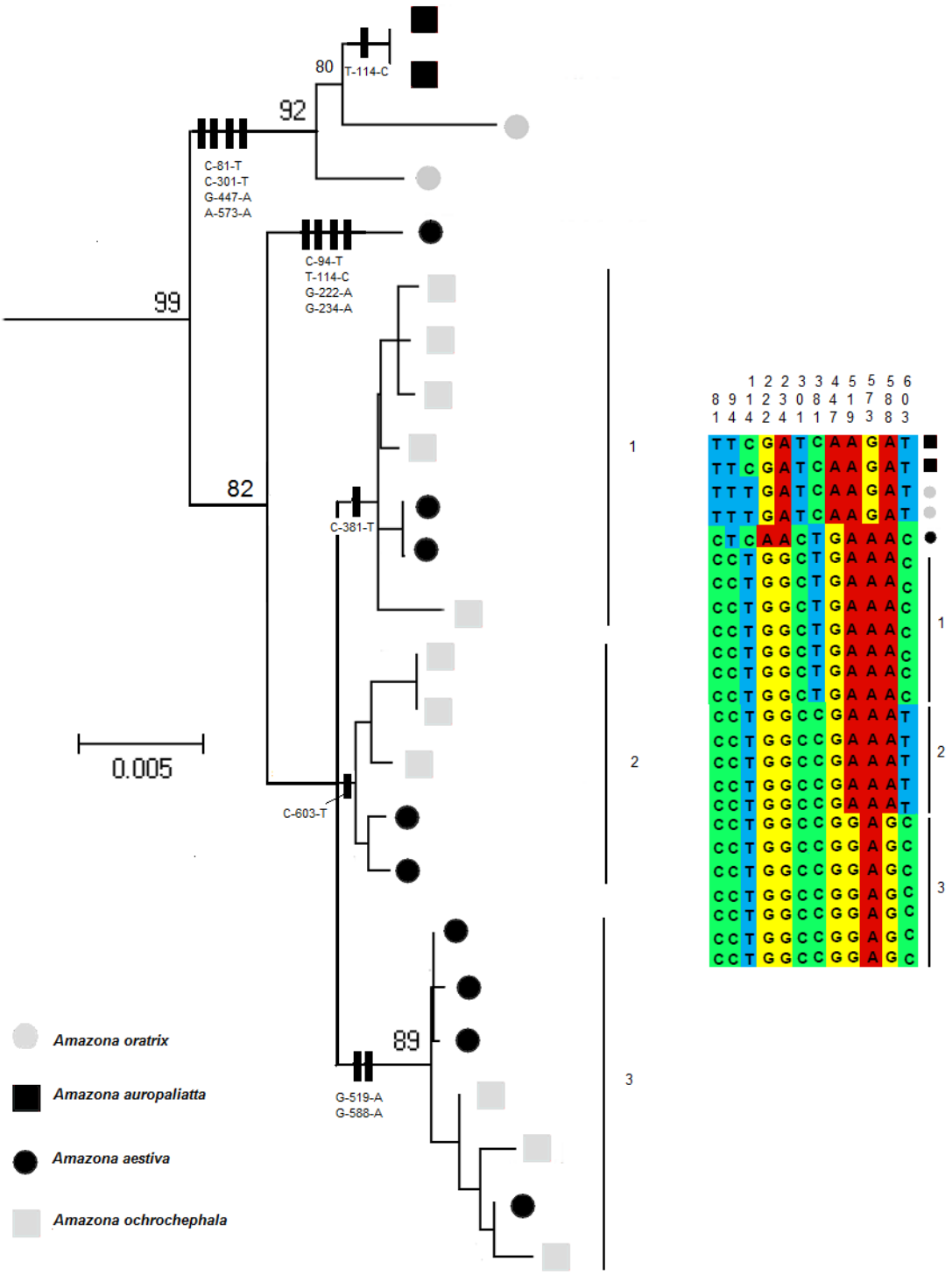


Figura 4. Segmento da árvore de *Neighbor-joining* construída segundo o modelo K2P. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* acima de 80%. Os nomes das espécies encontram-se na legenda. A matriz utilizada na identificação de sítios diagnósticos possuía 858 pb. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada linhagem estão representados nos ramos como barras pretas. Abaixo dessas barras estão as seguintes informações: o nucleotídeo presente no táxon irmão - a posição do sitio na sequência do *coxI* - o nucleotídeo diagnóstico da linhagem analisada. As barras verticais destacam três grupos nos quais as espécies *A. aestiva* e *A. ochrochephala* são encontradas. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada indivíduo sequenciado são mostrados à direita, com os respectivos sítios acima das sequências e com os símbolos identificando as espécies.

A)

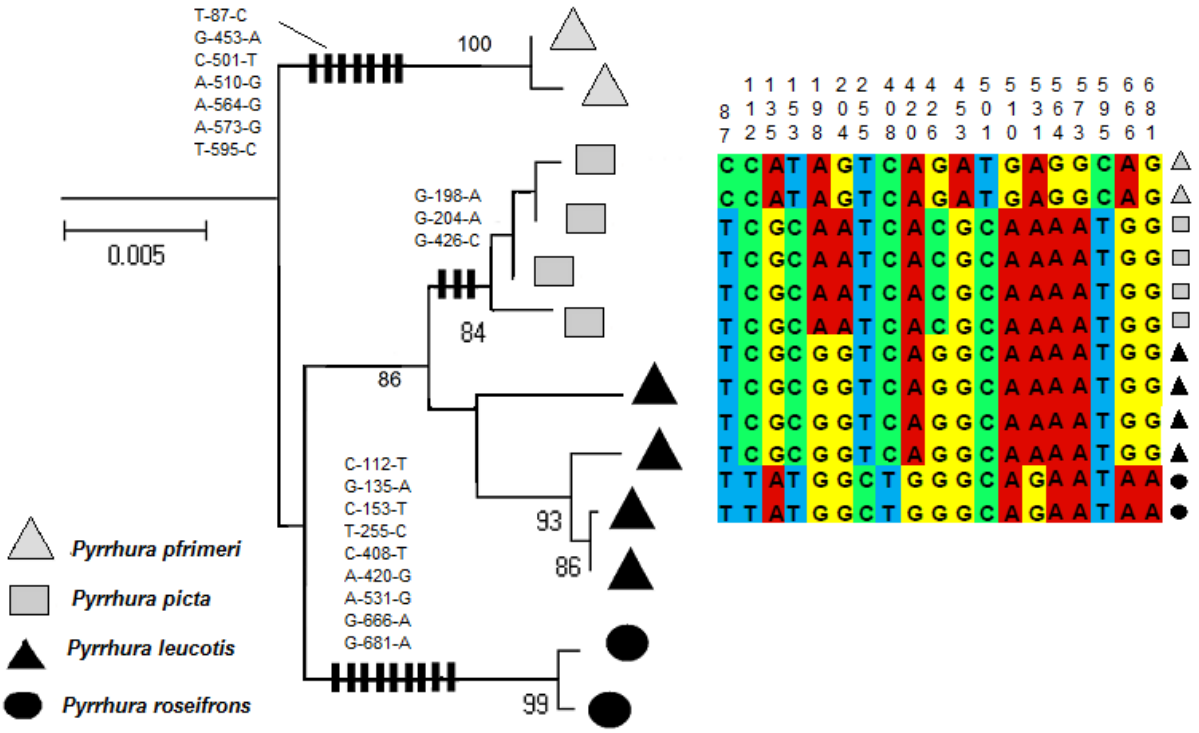


Figura 5. Segmentos da árvore de *Neighbor-joining* construídas segundo o modelo K2P. Os números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* acima de 80%. Os nomes das espécies encontram-se nas legendas. As matrizes utilizadas na identificação de sítios diagnósticos possuíam 852 e 861pb do *coxI,* respectivamente. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada linhagem estão representados nos ramos como barras pretas. Abaixo dessas barras estão as seguintes informações: o nucleotídeo presente no táxon irmão - a posição do sitio na sequência do *coxI* - o nucleotídeo diagnóstico da linhagem analisada. Os sítios diagnósticos no *coxI* de cada indivíduo seqüenciado são mostrados, com os respectivos sítios acima das sequências e com os símbolos identificando as espécies. A) grupo A e B) grupo B, descritos no texto.

3.4. Discussão

3.4.1. Sítios diagnósticos de pares e grupos de espécies de psitaciformes

Cada base de uma determinada sequência pode ser considerada um caráter e as informações obtidas a partir dessas sequências de caracteres poderiam ser utilizadas para identificar unidades taxonômicas (Rach *et al* 2008). Quando caracteres diagnósticos são usados para distinguir pares de espécies é preciso considerar que um caráter que é diagnóstico para um par de espécies pode não ser informativo para outro par de espécies, isto porque os caracteres diagnósticos são nucleotídeos em uma determinada posição que permitem a distinção entre duas espécies quando uma apresenta um estado e outra apresenta outro estado (Wong *et al* 2009).

Dessa forma, o uso de caracteres diagnósticos pode ser uma solução para grupos em que os métodos de distância não conseguem distinguir as espécies. No presente estudo foram analisados pares de espécies irmãs inferidos a partir de análises filogenéticas multigênicas e com altos valores de suporte. Dentre os pares analisados (seis), todos apresentaram caracteres diagnósticos que

permitem a distinção das duas espécies. Os pares de espécies irmãs *Amazona farinosa*/*A. kawalli*, *Alipiopsitta xanthops*/ *Graydidascalus brachyurus*, *Ara chloropterus*/*A. macao* e *Aratinga aurea*/*A. cactorum* possuem número de caracteres diagnósticos elevado (de 19 a 39). Porém, para os pares de espécies irmãs *Brotogeris chiriri*/*B. versicolurus* e *Brotogeris chrysopterus*/*B. cyanoptera* foram encontrados apenas quatro e oito sítios diagnósticos, respectivamente.

B)

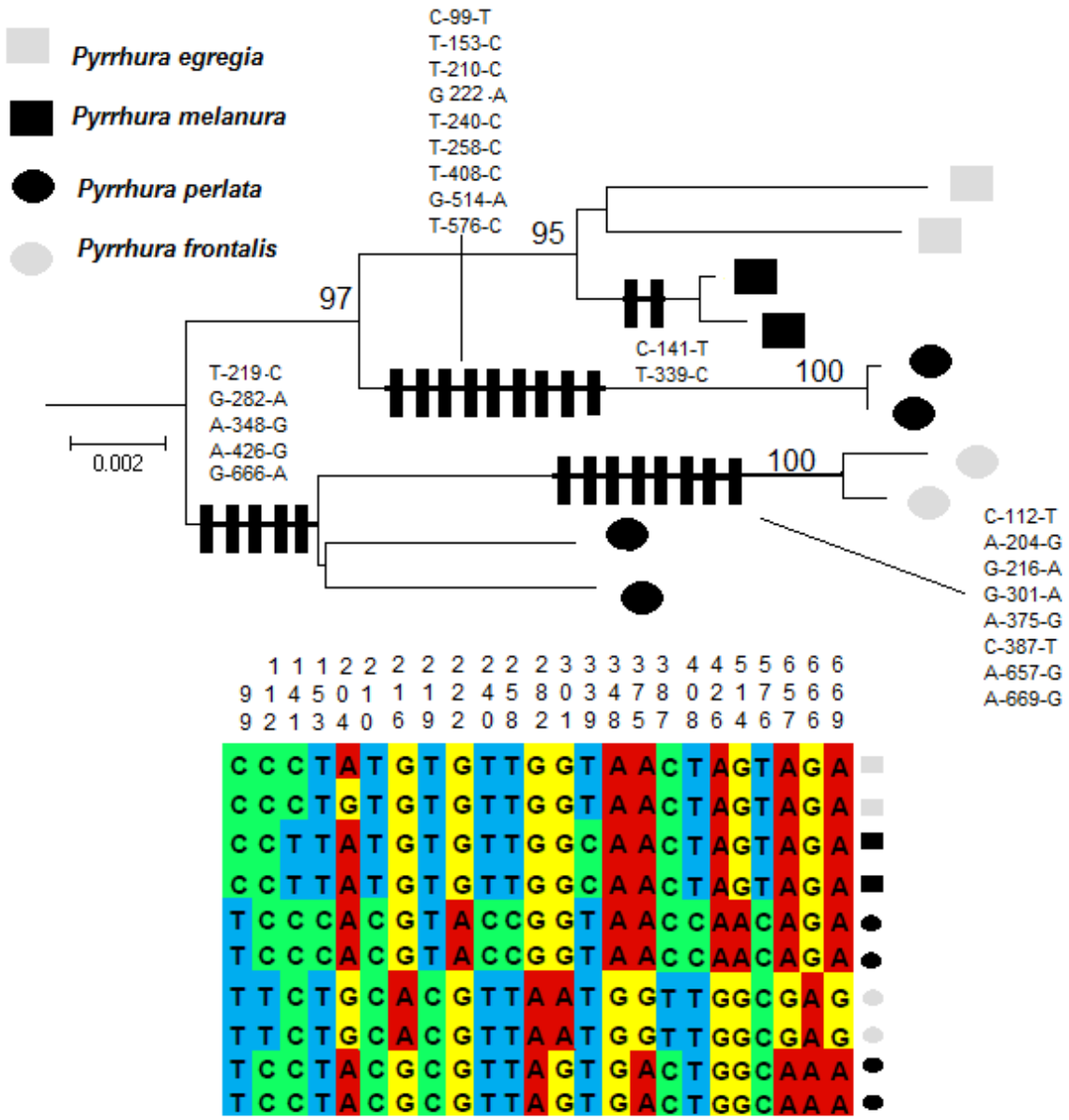


Figura 5. Continuação

Os estudos que utilizaram sítios diagnósticos do *DNA barcode* para identificar espécies apresentam um número variável de sítios e constataram que este é um bom método para diagnosticar espécies (Rach *et al*. 2008, Tavares e Baker 2008, Wong *et al* 2009). Entretanto, nenhum desses estudos sugere quais processos evolutivos poderiam explicar essa variação na

quantidade de sítios diagnósticos. Algumas hipóteses que podemos levantar para tentar explicar o pequeno número de sítios diagnósticos de alguns pares de espécies são: o curto tempo de divergência das linhagens, a ocorrência de hibridação ou a retenção de polimorfismo ancestral.

Espera-se que, quanto menor o tempo de divergência entre linhagens, menor o número de caracteres diagnósticos acumulados. O par *Alipiopsitta xanthops/ Graydidascalus brachyurus* (39 sítios diagnósticos, Figura 1) se divergiu há aproximadamente 19 milhões de anos (Ma., Tavares *et al* 2006) e *Ara chloropterus/A. macao* (24 sítios diagnósticos) há 2,54 Ma. (Oliveira-Marques 2006). Os pares de espécies *B. chiriri/B. versicolurus* (4 sítios diagnósticos) e *Brotogeris chrysopterus*/*B. cyanoptera* (8 sítios diagnósticos) se divergiram recentemente, há menos do que 0,5 e um Ma., respectivamente (Ribas *et al* 2009). Como esperado, foi encontrada uma tendência de o número de sítios diagnósticos estar relacionado com o tempo de divergência das espécies. Infelizmente as datas de divergência dos pares de espécies *Amazona farinosa*/*A. kawalli* (19 sítios diagnósticos) e *Aratinga aurea*/*A. cactorum* (30 sítios diagnósticos) não foram estimadas nos estudos de filogenia molecular multigênica disponíveis. No entanto, assumindo a tendência observada, elas teriam se divergido há mais de um Ma.

Se considerarmos a ocorrência de hibridação ou retenção do polimorfismo ancestral, seria esperado que pares de espécies irmãs influenciados por esses processos tivessem sequências do *DNA barcode* mais semelhantes e, portanto, menos sítios diagnósticos entre eles. No caso das espécies irmãs, apenas os pares formado pelas espécies *Brotogeris chiriri*/*B. versicolurus* e *Brotogeris chrysopterus*/*B. cyanoptera* apresentam número baixo de sítios diagnósticos (quatro e oito, respectivamente), ou seja, possuem sequências parecidas. Porém de acordo com as áreas de distribuição descritas para as espécies (del Hoyo *et al* 1997), apenas entre o par *Brotogeris chrysopterus*/*B. cyanoptera* poderia ocorrer hibridação, pois apresentam uma zona de contato. Essa hipótese também foi apontada por Ribas *et al* (2009) para explicar o padrão filogenético e biogeográfico encontrado para essa espécie. Como mencionado, a divergência entre o par *Brotogeris chiriri*/*B. versicolurus* parece ter sido recente e é possível que o tempo de divergência esteja mais relacionado com os poucos sítios diagnósticos encontrados.

Os resultados obtidos com os pares de espécies irmãs podem ajudar a interpretar os resultados das espécies proximamente relacionadas. A relação filogenética de algumas dessas espécies, como as dos gêneros *Pionites*, *Pyrrhura* e *Rhynchopsitta* ainda não foi esclarecida e existe a possibilidade de que sejam irmãs. Os pares de espécies do mesmo gênero que apresentaram valores baixos de distâncias interespecíficas, *Myiopsitta luchsi*/*M. monachus* (Figura 2) e *Pionites leucogaster*/*P. melanocephalus* (Figura 2), apresentaram dois e oito sítios diagnósticos, respectivamente. Para esse último par de espécies o número de sítios diagnósticos está dentro da variação do número de sítios obtido para as espécies irmãs e, portanto, poderíamos considerar que elas podem ser diagnosticadas. Já entre as espécies do gênero *Myiopsitta* foram encontrados apenas dois sítios diagnósticos (Figura 2). Apesar de esse número ser menor do que o que foi observado entre pares de espécies irmãs, trata-se de sítios que podem ser diagnósticos. No entanto, não está estabelecido qual o número mínimo de sítios diagnósticos para que as espécies possam ser identificadas (Wong *et al* 2009). Novamente, a quantidade de sítios diagnósticos irá depender de diversos processos evolutivos, como o tempo de divergência das espécies e, se esse for o caso

desse par de espécies, é possível que elas tenham se divergido recentemente e não tiveram tempo suficiente para acumularem mutações nas sequências do *coxI*. Até recentemente *M. luchsi* era considerada subespécie de *M. monachus* e passou a ser considerada como uma unidade taxonômica distinta por apresentar diversas características exclusivas, sendo irmã de *M. monachus* (Russello *et al* 2008).

Outro par de espécies de mesmo gênero que apresentaram baixo valor de distância nas sequências de *coxI* foi *Rhynchopsitta pachyrhyncha*/ *R. terrisi.* Essas espécies sequer apresentam caracteres moleculares diagnósticos (Figura 2). Há apenas um único sítio variável presente em uma das duas amostras de *R. terrisi*. Essas duas espécies são as únicas do gênero e apresentam caracteres morfológicos e hábitats diferentes (Collar 1997). *R. pachyrhyncha* é encontrada na Serra Madre Ocidental e *R. terrisi* habita um pequeno fragmento localizado na Serra Madre Oriental, ambas no México e como não ocorre sobreposição dessas áreas, é improvável que ocorra hibridação. A ausência de caracteres diagnósticos para essas espécies poderia ser resultado de retenção de polimorfismo ancestral. Filogenias multigênicas que incluam essas espécies não estão disponíveis e são necessárias para permitir uma melhor interpretação dos dados aqui obtidos. Adicionalmente, como as quatro amostras aqui analisadas pertencem a indivíduos de cativeiro sem procedência conhecida na natureza, seria importante ter amostras de aves de vida livre das duas espécies para confirmar os resultados aqui apresentados.

Nos grupos de espécies dos gêneros *Aratinga* (Figura 3)*, Amazona* (Figura 4) e *Pyrhurra* (Figura 5) foram encontrados um a 11 sítios diagnósticos que permitiram a distinção dos táxons. As espécies *Aratinga auricapillus e A. jandaya* apresentaram apenas um sítio diagnóstico. Essas duas espécies foram consideradas subespécies de *A. solstitialis* (Sick 1997), mas no estudo realizado por Ribas e Miyaki (2004) ambas foram diagnosticadas como linhagens independentes. O grupo também se divergiu recentemente (0,5 Ma., Ribas e Miyaki 2004) e do mesmo modo dos grupos anteriormente discutidos, pode não ter tido tempo suficiente para acumularem mutações nas sequências do *coxI.*

Em relação às espécies do gênero *Amazona*, *A. aestiva* e *A. ochrochephala* não são reciprocamente monofiléticos e não apresentam sítios diagnósticos. Essas duas espécies podem ser distinguidas baseando-se na plumagem, sendo improvável erro de identificação. No entanto, estudos filogenéticos utilizando dados de DNA mitocondrial e nuclear indicam que há um conflito entre a taxonomia tradicional e a história evolutiva reconstruída a partir de caracteres moleculares (Eberhard e Bermingham 2004, Ribas *et al* 2007). Ribas *et al* (2007) apontaram que *A. aestiva* e *A. ochrocephala* da América do Sul formam um complexo de espécies contendo três linhagens evolutivas independentes bem suportadas, que correspondem as localidades de coleta (América do Sul, América Central e norte da América do Sul). No presente estudo foi observado um padrão semelhante ao observado por Ribas *et al* (2007) (Figura 4). Foram encontrados dois clados principais com o *DNA barcode*, um formado pelas espécies *A. oratrix* e *A. auropaliata* que ocorrem na América Central, e outro formado por *A. aestiva*/ *A. ochrocephala* da América do Sul. Esse último grupo se divide em quatro clados: um contendo uma única amostra da espécie *A. aestiva*, e outros três grupos que contêm sequências de ambas as espécies. Essa mistura de haplótipos de *A. aestiva*/ *A. ochrocephala* também foi encontrada por Ribas *et al* (2007) no clado sul-americano. A amostra da espécie *A. aestiva* que apareceu aqui separada das demais por quatro sítios diagnósticos parece ser

uma linhagem distinta. Para confirmar esse achado, mais indivíduos de mais localidades deveriam ser amostrados, para que toda a diversidade genética desse complexo grupo possa ser analisada. Tanto aqui quanto no trabalho de Ribas *et al* (2007) foi possível observar que as amostras de *A. ochrocephala* provenientes do Acre se agrupam (quatro amostras em ambos trabalhos). No presente estudo, tais amostras se agruparam no clado 1 (Figura 4). Embora não tenha sido utilizada nenhuma amostra do norte da América do Sul e nem todas as amostras aqui estudadas terem localidade de coleta conhecida, o *DNA barcode* parece estar de acordo com os dados moleculares já publicados para esse grupo. Ou seja, a informação desse único fragmento aparentemente resgata relações semelhantes àquelas obtidas com outros marcadores moleculares.

Em relação às espécies que apresentaram baixas distâncias interespecíficas do gênero *Pyrrhura,* sete sítios diagnósticos separam o clado de *P. pfrimeri* das demais. No clado com as espécies *P. roseifrons, P. leucotis* e *P. picta*, nove mutações separam *P. roseifrons* das outras duas e, três sítios distinguem *P. leucoti*s de *P. picta*. Esses números de sítios diagnósticos são semelhantes aos que foram discutidos anteriormente. Um estudo filogenético do gênero (Ribas *et al* 2006) encontrou três linhagens principais, uma formada por *P. cruentata*, endêmica da Mata Atlântica, a segunda linhagem formada pelo complexo *picta-leucotis,* incluindo as espécies *P. pfrimeri, P. roseifrons, P. leucoti*s e *P. picta* e, a terceira com as demais espécies do gênero. Nesse estudo nem todas as relações do complexo *picta-leucotis* foram bem resolvidas, e isso poder ser consequência da rápida diversificação do grupo. Além disso, nem todas as espécies do gênero foram utilizadas. Seria importante ter o *DNA barcode* de todas as espécies desse gênero e reconstruções filogenéticas com amostragem completa e com melhor suporte para que qualquer discussão mais detalhada sobre o gênero *Pyrrhura* possa feita. Em relação às espécies *P. perlata, P. egregia, P. melanura* e *P. frontalis*, *P. perlata* aparece como parafilética, cinco sítios diagnósticos separam o grupo de *P. frontalis* e duas amostras de *P. perlata* das demais e oito substituições separam essas duas espécies. No outro clado, formado pelas espécies *P. egregia, P. melanura* e duas outras amostras *de P. perlata,* nove mutações separam *P. perlata* das outras duas espécies e, dois sítios diagnósticos separaram *P. egregia* de *P. melanura.* Na filogenia multigênica (Ribas *et al* 2006) *P. perlata* aparece como irmã de *P. lepida* e esse clado é irmão de *P. frontalis.* É possível que a espécie de *P. perlata* possa ser grupo relacionado a *P. frontalis.* Em relação ao outro grupo de *P. perlata* que parece ser uma unidade taxonômica distinta, pode ter havido erro de identificação na coleta do material ou no manuseio das amostras.

3.4.2. Métodos de análise dos sítios diagnósticos

Os sítios diagnósticos podem ser classificados em: puros (sítios diagnósticos compartilhados por todos os membros de um grupo e ausentes em outros clados) ou privados (sítios diagnósticos compartilhados por apenas alguns membros de um determinado clado e ausentes nos outros clados). Ambos, puros e privados, podem ser simples (restritos a uma única posição nucleotídica) ou compostos (combinações múltiplas de posições nucleotídicas diferentes) (Sarkar *et a*. 2000, Rach *et al*. 2008, Wong *et al* 2009). No presente estudo foram considerados somente sítios diagnósticos puros e simples do *DNA barcode* para alguns pares de espécies de psitaciformes. Tavares e Baker

(2008) adotaram o mesmo critério para analisar 60 pares de espécies irmãs de diversas ordens de aves e obtiveram sucesso na identificação de todos os grupos.

A utilização de sítios diagnósticos puros/compostos ou privados/simples ou compostos poderia ser útil quando os sítios puros/simples não permitem identificar as espécies, fornecendo mais alternativas de análise de pares de espécies com poucos sítios variáveis. Entretanto, no presente estudo a classificação mais conservadora permitiu identificar a maioria das espécies proximamente relacionadas de psitaciformes utilizadas, com exceção de *Rhynchopsitta pachyrhyncha* vs. *R. terrisi* e *Amazona aestiva* vs. *A. ochrochephala.* Como mencionado, esse último par forma um complexo de espécies que inviabiliza qualquer sistema de identificação a nível molecular e as espécies do gênero *Rhynchopsitta* apresentaram sequências do *coxI* idênticas. Portanto, para essas espécies mesmo a utilização de sítios privados/simples ou compostos não seria suficiente para diagnosticar os táxons.

O protocolo de identificação de sítios diagnósticos de pares de espécies irmãs adotado por Tavares e Baker (2008) utilizou programas que selecionam os sítios diagnósticos dos táxons e posteriormente filtram os sítios puros/simples. Existem outros métodos para identificação dos sítios diagnósticos, como o método proposto por Rach *et al* (2008), que utiliza um programa chamado CAOS (*Characteristic Attribute Organization System*) e busca caracteres puros e privados simples nas sequências de nucleotídeos do *DNA barcode*. Esse programa utiliza uma árvore guia e busca caracteres diagnósticos em cada nó dessa árvore. Já Wong *et al* (2009) utilizaram uma ferramenta manual, buscando todos os possíveis sítios diagnósticos em grupos de sequências usando o programa MEGA e a ferramenta desse programa que destaca os sítios variáveis das sequências.

No presente trabalho a identificação dos sítios diagnósticos de grupos com mais de duas espécies foi realizada combinando os métodos descritos anteriormente. Isso porque foram utilizadas as seqüências totais dos táxons comparados, analisadas com o auxílio de um programa que também destaca os sítios variáveis de um determinado grupo de sequências (programa BioEdit), árvores de *Neighbor-joining* como guias para identificar as espécies ou grupo mais basal, e os sítios diagnósticos puros/simples. Independente de como identificar, os sítios diagnósticos parecem ser úteis na diagnose de espécies proximamente relacionadas e pode ser uma alternativa quando os métodos de distâncias não permitem a identificação das espécies.

3.5. Conclusões

Todas as espécies irmãs analisadas no presente estudo apresentaram substituições fixas diagnósticas nas sequências do *coxI*. A utilização da análise de caracteres diagnósticos desse marcador também permitiu identificar a maior parte dos pares de espécies de psitacídeos proximamente relacionados que não puderam ser identificados no capítulo anterior. Exceto as espécies do complexo *Amazona aestiva/A. ochrochephala* e as espécies *Rhynchopsitta pachyrhyncha* e *R. terrisi* que não formaram clados reciprocamente monofiléticos e nem apresentaram sítios diagnósticos. Os achados do presente estudo são congruentes com dados da literatura e apontaram grupos que merecem ser alvo de análises mais detalhadas.

O método de identificação de sítios diagnósticos parece ser uma boa alternativa para a diagnose de espécies quando os métodos baseados em distâncias genéticas não são capazes de

distinguir as espécies. Assim, para que o *DNA barcode* continue sendo uma ferramenta padronizada, seria importante incorporar esse método de análise no BOLD (*Barcoding of Life Data System* – www.barcodinlife.org) contribuindo para o aprimoramento do seu sistema de identificação.

3.6. Referências

Bruford M. W., Hanotte O., Brookfield J. F. Y. e Burke T. 1992. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel A. R. (ed) *Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*. Oxford: University Press, 225-269.

Collar N.J. 1997. Family Psittacidae (Parrots). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (eds.) *Handbook of the Birds of the World*, vol. 4, Sandgrouse to Cuckoos, Barcelona: Lynx Edicions,

de Kloet R. S. e de Kloet S. R. 2005. The evolution of the spindling gene in birds: sequence analysis of an intron of the spindling W and Z gene revealed four major divisions of the Psittaciformes. Mol. Phylogenet. Evol., 36, 706-721.

DeSalle R. 2007. Phenetic and DNA taxonomy; a comment on Waugh. BioEssays, 29, 1289–1290.

DeSalle R., Egan M. G. e Siddall M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. Phil. Trans. R. Soc. B., 360, 1905-1916.

Eberhard J. R. e Bermingham E. 2004. Phylogeny and biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. Auk, 121, 318-332.

Eberhard J. R. e Bermingham E. 2005. Phylogeny and comparative biogeography of *Pionopsitta* parrots and *Pteroglossus* toucans. Mol. Phylogenet. Evol., 36, 288-307.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39, 783-791.

Frézal L. e Leblois R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. Inf. Genet. Evol., 8, 727-736.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., 41, 95-98.

Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. e Waard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. London B., 270, 313–321.

Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S. e Francis C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. Plos Biol., 2, 01-06.

Ivanova N. V., deWaard J. R. e Hebert P. D. N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. Mol. Ecol. Notes, 6, 998–1002.

Kelly R. P., Sarkar I. N., Eernisse D. J., DeSalle R. 2007. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). Mol. Ecol. Notes, 7, 177–183.

Kimura M. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16, 111-120.

Maddison D. R. e Maddison W. P. 2003. MACCLADE: Analysis of Phylogeny and Character Evolution, Version 4.06. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Meyer C. P. e Paulay G. 2005. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. Plos Biol., 3, 01-10.

Miyaki C. Y., Matioli S., Burke T. e Wanjntal A. 1998. Parrot evolution and paleogeographic events: mitochondrial DNA evidences. Mol. Biol. Evol., 15, 544-551.

Oliveira-Marques A. R. 2006. Filogenia Molecular das Espécies do Gênero *Ara* (Psittaciformes, Aves). Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ottens-Wainright P., Halanych K. M., Eberhard J. R., Burke R. I., Wiley J. W., Gnam R. S. e Aquilera X. G. 2004. Independent geographic origin of the genus *Amazona* in the West Indies. J. Carib. Ornitol., 17, 23-49.

Rach J., DeSalle R., Sarkar I. N., Schierwater B. e Hadrys H. 2008. Character-based *DNA barcoding* allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. Proc. R. Soc. London B., 275, 237-247.

Ribas C. C., Gaban-Lima R., Miyaki C. Y. e Cracraft J. 2005. Historical biogeography and diversification within the neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). J. Biogeogr., 32, 1409-1427.

Ribas C. C., Joseph L. e Miyaki C. Y. 2006. Molecular systematics and patterns of diversification in *Pyrrhura* (Psittacidae), with special relevance to the *picta-leucotis* complex. Auk, 123, 660-680.

Ribas C. C. e Miyaki C.Y. 2004. Molecular systematics in *Aratinga* parakeets: species limits and historical biogeography in the "*solstitialis*" group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. Mol. Phylogenet. Evol., 30, 663-675.

Ribas C. C., Miyaki C. Y. e Cracraft J. L. 2009 Phylogenetic relationships, diversification, and biogeography in Neotropical *Brotogeris* parakeets. J. Biogeogr., 36, 1712-1729.

Ribas C. C., Tavares E. S., Yoshihara C. e Miyaki C. Y. 2007. Phylogeny and biogeography of Yellow-headed and Blue-fronted parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with specila reference to the South America taxa. Ibis, 149, 564-574.

Russello M. A. e Amato, G. 2004. A molecular phylogeny of *Amazona*: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. Mol. Phylogenet. Evol. 30, 421-437.

Russello M. A, Avery M. e Wright T. 2008. Genetic evidence links invasive monk parakeet populations in the United States to the international pet trade. BMC Evol. Biol., 8, 217-228.

Sick H. 1997. *Ornitologia Brasileira, uma Introdução*. Rio de Janeiro: Nova Fronteria.

Swofford D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tamura K., Dudley J., Nei M. e Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol., 24, 1596-1599.

Tavares E. S. e Baker A. J. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. Evol. Biol., 8, 1-27.

Tavares E. S., Baker A. J., Pereira S. L. e Miyaki C. M. 2006. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Syst. Biol., 55, 454-470.

Tavares E. S., Yamashita C. e Miyaki C. Y. 2004. Phylogenetic relationships among some Neotropical parrot genera (Psittacidae, Aves) based on mitochondrial sequences. Auk, 121, 230–242.

Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R. e Hebert P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, 360, 1847–1857.

Waugh J., Huynen L., Millar C. e Lambert D. 2007. DNA barcoding of animal species - response to DeSalle. BioEssays, 30, 92–93.

Wong E. H. K., Shivji M. S. e Hanner R. H. 2009. Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. Mol. Ecol. Res.,9, 243-256.

Capítulo 4

Identificação da espécie de embriões apreendidos do tráfico ilegal: aplicação prática do *DNA barcode*

4.1. Introdução

Em 2003, um homem estrangeiro foi detido pela Polícia Federal no Aeroporto Internacional dos Guararapes em Recife, quando tentava embarcar para Lisboa carregando 58 ovos de aves. Os ovos estavam embalados individualmente em papel de seda e acondicionados em várias meias calças ao redor da sua barriga. O homem havia passado pelos estados do Amazonas, Mato Grosso, Tocantins, Distrito Federal e Pernambuco e poderia tê-los adquirido em qualquer desses lugares. Ao ser preso, o homem informou que os ovos eram de codorna, mas a aparência deles não confirmava tal alegação. Como os ovos não eclodiram, não foi possível identificar morfologicamente as espécies dos embriões.

A morfologia externa dos ovos sugeria que se tratava de psitacídeos, grupo de aves com diversas espécies ameaçadas de extinção (BirdLife International 2008). De acordo com Clements (2007), a ordem Psittaciformes apresenta 367 espécies distribuídas em duas famílias: Cacatuidae e Psittacidae. A família Psittacidae apresenta 346 espécies distribuídas em 78 gêneros, e possui um grupo exclusivamente neotropical, a tribo Arini, com 161 espécies descritas (Clements 2007). No Brasil ocorrem aproximadamente 70 espécies de psitacídeos (Sick 1997). Assim, baseado nas evidências do caso descrito acima, a única pista inicial em relação à identidade desses ovos era que poderia pertencer a qualquer uma dessas 70 espécies. De acordo com a Lei nº 9.605/98 – Artigo 29 e o Decreto nº 3.179/99, utilizar espécimes da fauna silvestre sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente leva à pena de detenção de seis meses a um ano, e multa de R$ 500,00. A pena dobra e a multa pode chegar a R$ 5000,00 se o crime for praticado contra espécies raras ou consideradas ameaçadas de extinção. Assim, a identificação das espécies dos embriões seria muito importante para compor o processo penal contra esse homem.

Dentro dessa problemática de identificação de espécies, Hebert *et al* (2003) propuseram a utilização de um fragmento de 650 pb do gene citocromo oxidase I (*coxI*) do DNAmit como solução. Esse método foi denominado de *DNA barcoding*. Apesar das críticas (Moritz e Cicero 2004, Rubinoff 2006) o método tem obtido sucesso da diagnose rápida de diversos táxons animais (Hebert *et al* 2003, 2004; Kerr *et al* 2007; Ward *et al* 2005) e poderia ser bastante útil no presente caso. A identificação das espécies com este método é feita pela comparação de sequências de *coxI* de táxons previamente identificados com a sequência da amostra que se pretende identificar.

No presente caso, seria então necessário ter um banco de sequências de *coxI* para todas ou a grande maioria as espécies de psitacídeos (em especial as neotropicais com ocorrência no Brasil) para permitir essa identificação. Esse banco de dados de sequências do *coxI* é conhecido como BOLD (*Barcode of life Data System*, Ratnasingham e Hebert 2007). Há atualmente no BOLD 141 espécies sequenciadas das 367 espécies existentes na ordem. Destas, 130 espécies sequenciadas são da família Psittacidae que possui 346 espécies. A tribo Arini apresenta 96 espécies sequenciadas das 161 espécies existentes. Em outras palavras, 60% das espécies da tribo Arini possuem sequências do *DNA barcode* depositadas no BOLD, restando 40% a serem sequenciadas para que o

banco de dados fique completo. Em relação às aproximadamente 70 espécies que ocorrem no Brasil, 59 possuem sequências depositadas no BOLD.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies dos embriões dos ovos apreendidos utilizando o *DNA barcode.* Discutimos também como os resultados podem contribuir no combate ao tráfico ilegal de animais e no processo contra o traficante.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. *Amostragem, extração de DNA e sequenciamento*

Foram utilizadas 58 amostras de embriões de aves apreendidos com um possível traficante internacional de animais no aeroporto de Recife. Os embriões não eclodiram e sua análise morfológica não permitiu identificar as espécies. As amostras foram preservadas em etanol 100% a -20 ^{o}C e estão depositadas no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

O DNA foi extraído pelo método padrão de digestão com proteinase K e purificação com fenol-clorofórmio. (Bruford *et al* 1992). Um fragmento de cerca de 800 pb da região 5' do gene *coxI* foi amplificado com os *primers*: BirdR1 (reverso*)*: 5'- ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG- 3' (Hebert *et al* 2004), LTyr (direto) 5'-TGTAAAAAGGWCTACAGCCTAACGC- 3' (Oliver Haddrath, com. pessoal), COIH7557 (reverso) 5'-GGCGGATGTGAAGTATGCTCGGG'- 3' (presente trabalho). As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 10 µl, contendo 1 µl de dNTPs (10 mM total), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5U/ µl, Amersham Biosciences), 1 µl de tampão, 40 ng/µl de DNA e água MilliQ para completar 10 µl finais.

Para a maioria das amplificações e reações de sequenciamento utilizou-se os *primers* COIH7557 e LTyr. Quando as amplificações com esse par de *primers* não apresentavam produtos em quantidade suficiente ou falhassem, o outro conjunto (LTyr e BirdR1) foi utilizado. Em casos nos quais as sequências obtidas com os *primers* COIH7557 e LTyr não apresentavam sobreposição de boa qualidade, o *primer* BirdR1 foi adicionalmente usado na reação de sequenciamento.

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com polietilenoglicol (PEG 8000 20%, NaCl 2,5 M). Em seguida foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). O produto final da reação de sequenciamento foi precipitado com isopropanol 75%. As sequências então foram lidas em um sequenciador automático modelo ABI 377 (Applied Biosystems).

4.2.2. Análise das sequências

Os eletroferogramas das sequências obtidas foram visualizados utilizando-se os programas Sequence Navigator e Sequence Analysis (Applied Biosystems). No programa CodonCode Aligner

1.4.1 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, EUA) as sequências obtidas foram alinhadas e editadas, obtendo-se uma sequência consenso para cada indivíduo. No programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) foi realizado o alinhamento, edição manual e análise de todas as sequências consenso das amostras analisadas e a verificação de ambiguidades e de códons de parada inesperados.

4.2.3. Identificação das espécies no Barcode of Life Database (BOLD) e por meio de análises baseadas em distâncias genéticas

O BOLD é um banco de dados de sequências de *coxI* e de informações associadas a essas sequências, como informações de campo, número do espécimen e instituição na qual esse material foi depositado, dados taxonômicos e informações moleculares. No BOLD também é possível identificar espécies pela comparação da sequência investigada com sequências lá depositadas (*BOLD Identification System* – IDS). Essa ferramenta está disponível para todos que acessam o BOLD, basta copiar cada sequência a ser analisada em formato *fasta* na área indicada no *site* e clicar no comando de análise. Como mencionado, todas as amostras obtidas e descritas nos capítulos anteriores foram depositadas no BOLD e utilizadas nessas comparações.

A comparação da sequência consenso de cada um dos embriões com aquelas depositadas no BOLD foi realizada por métodos baseados em distância genética, segundo o modelo de evolução molecular de Kimura-2-parâmetros (K2P, Kimura 1980). Essa análise consiste no alinhamento de cada sequência a ser pesquisada com aquelas depositadas no BOLD, seguida de uma busca das 100 sequências mais similares com a amostra desconhecida e a construção de uma árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) com esse conjunto de dados (sequência em estudo mais 100 sequências mais similares a ela). O resultado é apresentado em uma tabela, mostrando a porcentagem de similaridade da sequência de interesse com as depositadas no BOLD. Também é possível visualizar onde a sequência de interesse aparece na árvore de NJ. De acordo com Hebert *et al* (2003), em aves, a sequência investigada deve ter similaridade maior do que 98% com alguma sequência depositada nesse banco de dados para que se possa considerar que a espécie foi identificada.

Resumindo, a comparação realizada no BOLD foi feita usando uma sequência em estudo por vez. Os resultados da busca mostraram o valor de similaridade da sequência investigada com as depositadas no banco de dados e a sua localização em uma árvore de NJ com as 100 sequências mais similares do banco de dados. Adicionalmente, para obter uma figura que ilustrasse todos os resultados da identificação da espécie de todas as amostras, construímos uma árvore de *Neighbor-Joining*, aplicando-se 1000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein 1985). A matriz de dados incluiu as sequências de todos os embriões e sequências das 141 espécies de psitacídeos que se encontram depositadas no BOLD (407 sequências). Ainda utilizando essa matriz, foram calculadas as distâncias genéticas médias entre cada embrião e as espécies de psitacídeos identificadas utilizando o modelo K2P (Kimura 1980) no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al* 2007).

4.3. Resultados

O DNA de todas as amostras dos embriões foi extraído e o *coxI* foi amplificado e sequenciado. As sequências variaram de 564 a 862 pb. A matriz de sequências alinhadas dos 58 embriões apresentou um total de 564 caracteres. Nesse alinhamento, foram observadas sequências idênticas entre si (Tabela 1). A composição das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) do *coxI* das sequências desses embriões foi de 27.5%, 23.6 %, 32.5 % e 16.4%, respectivamente. Essas frequências são semelhantes àquelas encontradas para genes mitocondriais de outros grupos de aves e para o *coxI* de outros animais (Tavares *et al* 2006, Ward *et al* 2007).

A análise no BOLD resultou em 54 amostras identificadas como: três *Ara ararauna*, duas *Triclaria malachitacea* e 49 *Alipiopsitta xanthops*. Essas sequências apresentaram similaridade maior do que 98% com sequências de espécies depositadas no BOLD. As quatro amostras restantes foram atribuídas ao complexo de espécies *Amazona aestiva*/*A. ochrocephala*. As distâncias entre as amostras dos embriões e as possíveis espécies a que elas podem pertencer variaram de 0.1 a 1% (Tabela 1).

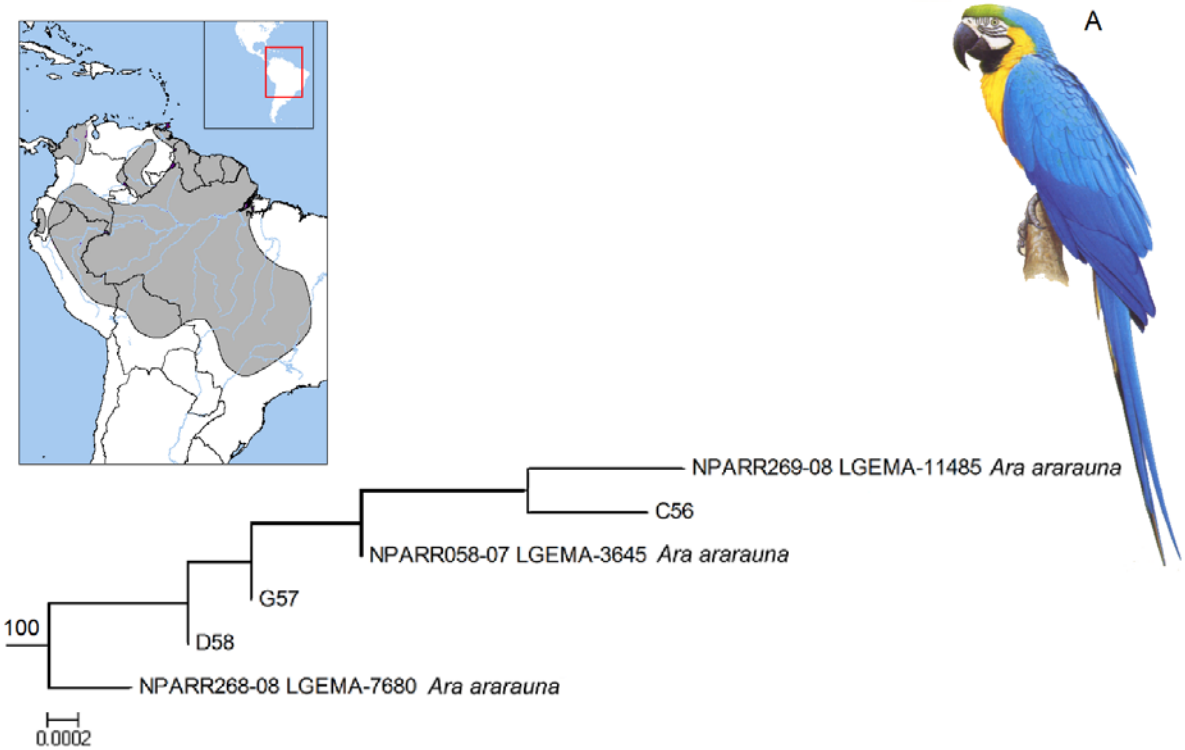
Tabela 1. Amostras de embriões cujas espécies foram identificadas com base em sequências do gene *coxI.* Os 13 grupos de sequências idênticas estão indicados. ID: registro de identificação original das amostras utilizadas, LGEMA: número de registro na coleção do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves. O tamanho das sequências está em pares de base. As possíveis espécies foram identificadas tanto em análises por distância, feitas no programa MEGA, quanto em análises por similaridade, feitas no BOLD. A distância média e a similaridade média entre cada sequência investigada e a possível espécie são informadas.

Grupos	ID	LGEMA	Tamanho	Possível espécie	Distância (%)	Similaridade (%)
I	A18	10827	822	*Amazona aestiva/Amazona ochrocephala*	0,7/0,7	99.71/99.62
II	D22	10828	844	*Amazona aestiva/Amazona ochrocephala*	0,7/0,7	99.71/99.64
	F37	10829	813	*Amazona aestiva/Amazona ochrocephala*	0,7/0,7	99.71/99.63
	G55	10830	765	*Amazona aestiva/Amazona ochrocephala*	0,5/0,5	100/100
III	C56	10831	564	*Ara ararauna*	0,3	100
	D58	10833	784	*Ara ararauna*	0,3	100
	G57	10832	826	*Ara ararauna*	0,3	99.87
IV	A16	10855	839	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.75
	A35	10869	845	*Alipiopsitta xanthops*	0,4	99.75
	B08	10848	857	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.75
	D27	10863	833	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
	D41	10874	861	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
	E46	10877	742	*Alipiopsitta xanthops*	0,4	99.71
	F29	10865	836	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
	G01	10841	826	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
V	B11	10851	843	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.76
	C02	10842	829	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
	C49	10878	788	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.74
	E50	10879	845	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
	F03	10843	764	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72

Tabela 1. Continuação

Grupos	Amos.	LGEMA	Tamanho	Possível espécie	Distância (%)	Similaridade (%)
VI	A17	10856	845	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	100
	A43	10875	854	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	100
	C15	10854	821	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.71
	C40	10873	787	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.70
	E24	10860	768	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.69
	E39	10872	834	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
	F26	10862	836	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	99.72
	F53	10882	826	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.72
	G51	10880	794	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.70
VII	G09	10849	809	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	99.85
VIII	G21	10858	842	*Alipiopsitta xanthops*	0,5	99.44
IX	A10	10850	836	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	99.87
	A23	10859	828	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	99.88
	D14	10853	836	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	99.86
	D28	10864	710	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.84
	G04	10844	858	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	99.86
X	C52	10881	852	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	D45	10876	850	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	E06	10846	835	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	E07	10847	807	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
XI	A20	10857	814	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	A54	10883	822	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	B12	10852	746	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	B25	10861	826	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	B30	10866	667	*Alipiopsitta xanthops*	0,3	99.85
	B33	10835	640	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	B34	10868	856	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	C38	10871	625	*Alipiopsitta xanthops*	0,2	100
	E31	10867	844	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	E36	10870	822	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	F05	10845	845	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	F13	10837	806	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	F19	10838	845	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	F42	10839	836	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	G32	10834	751	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
	G47	10840	836	*Alipiopsitta xanthops*	0,1	100
XII	B44	10836	704	*Triclaria malachitacea*	0,7	99.69
XIII	E48	10884	706	*Triclaria malachitacea*	1	99.69

A árvore de *Neighbor-Joining* resultante mostrou que as amostras de embriões agruparam-se com alto suporte de *bootstrap* com sequências de espécies conhecidas (Figura 1), confirmando os resultados da análise realizada no BOLD.



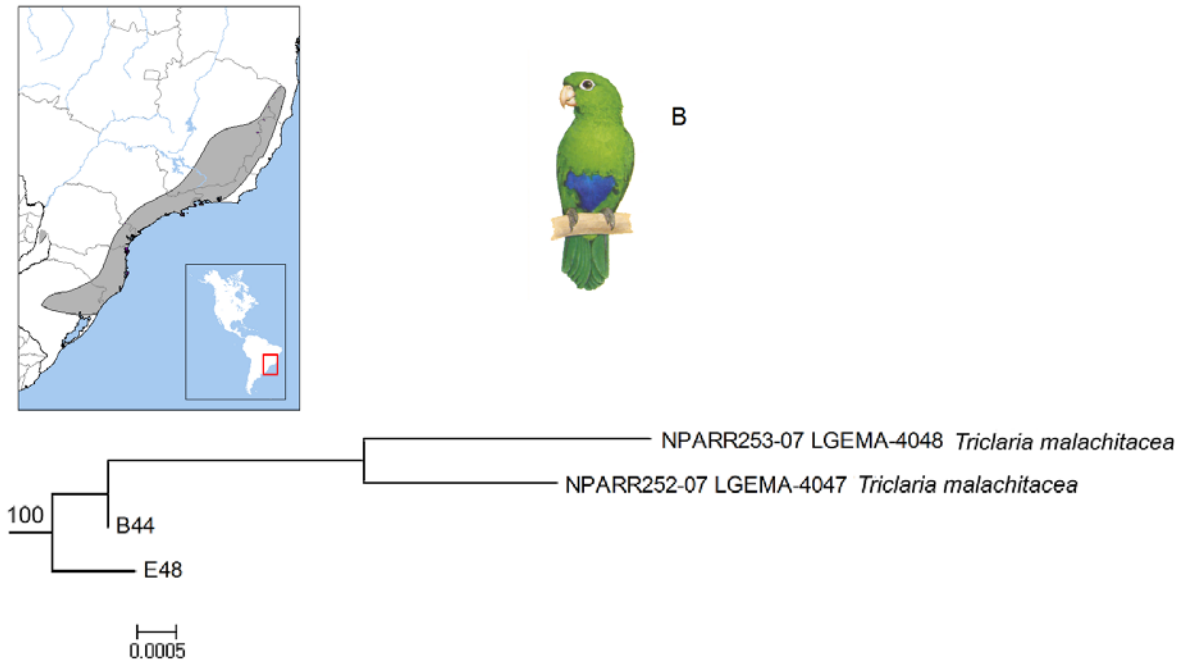


Figura 1. Trechos em destaque da árvore de *Neighbor-Joining* baseada na matriz de 564 pb do gene *coxI*, indicando o posicionamento de sequências das amostras de embriões. Os valores de suporte de *bootstrap* estão acima dos ramos. As siglas NPARR referem-se ao registro do BOLD e a sigla LGEMA ao registro da coleção no laboratório. Os mapas mostram em cinza as áreas de distribuição de cada uma das espécies (modificados de InfoNatura,www.natureserve.org) e as letras A, B C, D e E referem-se às figuras das espécies *Ara ararauna*, *Triclaria malachitacea, Amazona aestiva, Amazona ochrocephala* e *Alipiopsitta xanthops*, respectivamente. Figuras fora de escala, modificadas de Collar (1997).

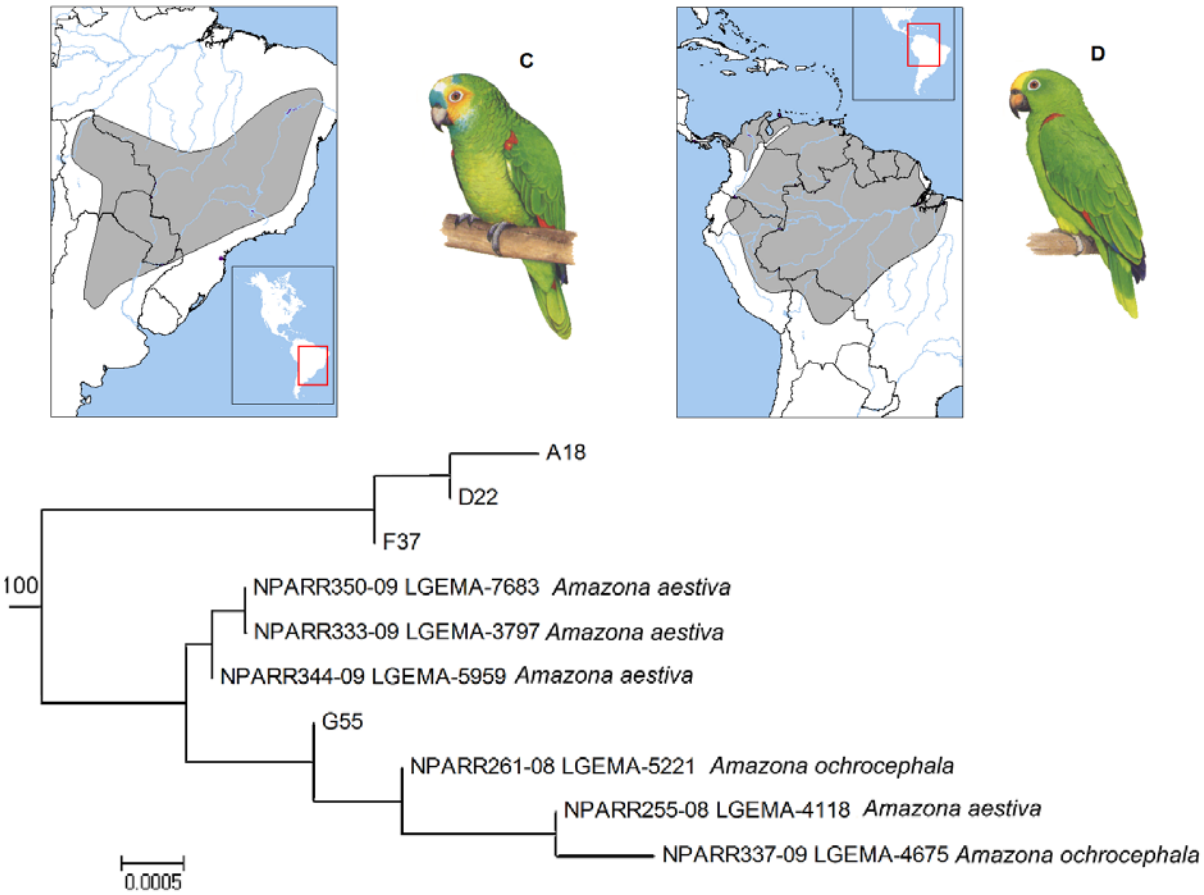


Figura 1. (continuação)

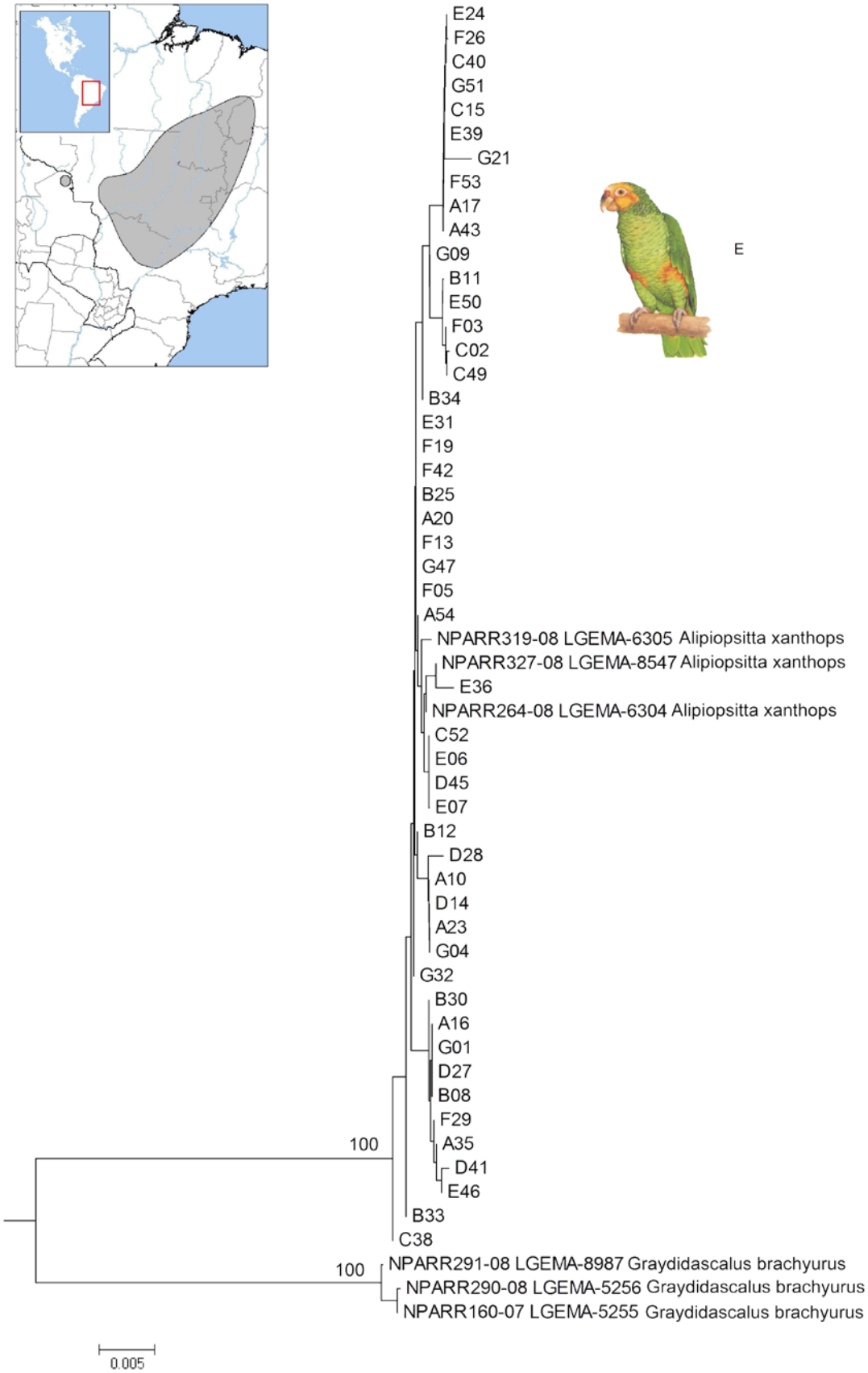


Figura 1. (continuação)

4.4. Discussão e conclusão

A análise dos embriões permitiu a identificação da espécie de 54 amostras apreendidas com um possível traficante. Ou seja, 93% do total de amostras foram identificadas quanto à espécie correspondente (*Ara ararauna*, *Triclaria malachitacea* e *Alipiopsitta xanthops*). *Ara ararauna* tem ampla distribuição, sendo encontrada em regiões do Panamá, Colômbia, Venezuela, Guianas, Brasil, Peru, Bolívia e Equador. Conhecida popularmente como arara-canindé habita beira de mata, várzeas com palmeiras e interior e bordas de florestas altas. Está na lista de espécies da CITES II (*Convention on International Trade in Endangered Species*), como todo grupo dos psitaciformes, mas não é considerada ameaçada de extinção. Já *Alipiopsitta xanthops*, que pertencia ao gênero *Amazona*, ocorre no interior de Minas Gerais, habitando o cerrado e a caatinga, sendo considerada uma espécie vulnerável. E por fim, a espécie *Triclaria malachitacea* habita a Floresta Atlântica, da Bahia ao Rio Grande do Sul e consta da lista das espécies ameaçadas de extinção (Collar 1997).

Uma das críticas em relação ao *DNA barcode* é que o marcador poderia não ser capaz de identificar espécies proximamente relacionadas (Moritz e Cicero 2004). Como os táxons irmãos dessas três espécies estão depositados no BOLD, tal crítica não seria válida no presente caso, pois para a grande maioria dos embriões suas espécies foram identificadas com sucesso. A espécie irmã de *Ara ararauna*, de acordo com Oliveira-Marques (2006), é *Ara glaucogularis*, e há uma amostra dessa espécie depositada no BOLD. Estudos filogenéticos (Russello e Amato 2004) apontam que a espécie irmã de *Alipiopsitta xanthops* é *Graydidascalus brachyurus,* também presente no banco de dados. Já *Triclaria malachitacea*, única espécie do gênero, é grupo irmão do clado formado por espécies dos gêneros *Amazona, Graydidascalus, Pionus* e *Pionopsitta* (Tavares *et al* 2006). No BOLD estão depositados representantes de outras espécies de todos esses gêneros, com exceção de *Graydidascalus* e *Alipiopsitta* que são gêneros monoespecíficos.

Em relação às quatro amostras identificadas como *Amazona aestiva* ou *A. ochrocephala*, a impossibilidade de definição da espécie poderia estar associada a vários fatores: 1) erro de identificação das amostras depositadas no BOLD, 2) amostragem insuficiente de ambos os táxons, 3) hibridação entre as duas espécies, 4) heteroplasmia, 5) retenção de polimorfismo ancestral. Como é possível identificar essas duas espécies baseado nas suas plumagens, seria pouco provável haver erro de identificação das amostras depositadas no BOLD. Além disso, esses dois táxons possuem mais do que cinco indivíduos por espécies depositados no BOLD, número maior do que o estabelecido pelo BOLD (três espécies) para evitar possíveis erros de identificação (Frézal e Leblois 2008). Estudos filogenéticos utilizando dados do DNAmit e do DNA nuclear apontaram que *Amazona aestiva* e *A. ochrocephala* formam um complexo de espécies, composto de pelo menos três linhagens evolutivas independentes (Eberhard e Bermingham 2004, Ribas *et al* 2007). Isso pode ser um indício de que a taxonomia tradicional não reflete a história evolutiva do grupo (Ribas *et al* 2007). Um estudo mais recente utilizando dados do DNAmit sugere que é possível que essas duas espécies sofreram diversificação seguida por introgressão (Caparroz *et al* 2009), o que também poderia explicar o compartilhamento de haplótipos observado. A ocorrência de heteroplasmia ou a

possível retenção de polimorfismo ancestral nessas duas espécies não foi apontada em nenhum dos estudos moleculares utilizando outros marcadores (Eberhard e Bermingham 2004, Ribas *et al* 2007, Caparroz *et al* 2009).

A identificação da espécie dessas mesmas amostras de embriões, mas baseada em dados do gene 16S rDNA do DNAmit e utilizando o BLAST do GenBank resultou nas mesmas espécies obtidas no presente estudo: *Ara ararauna*, *Alipiopsitta xanthops* e *Amazona aestiva* ou *Amazona ocrhocephala* (Matsumoto, Oliveira-Marques e Miyaki; em prep.). Uma das incongruências encontradas se refere a uma das amostras aqui identificada como *Triclaria malachitacea* (amostra E48) que não pôde ter sua espécie atribuída com o 16SrDNA devido à ausência de sequência desse gene no GenBank. A outra diferença está relacionada à amostra B44, aqui identificada também como *T. malachitacea*, e identificada como *Alipiopsitta xanthops* com o gene 16SrDNA. O re-sequenciamento de ambos os genes para essa amostra deve resolver essa questão. De qualquer forma, fica claro que quanto mais completa a amostragem de espécies previamente identificadas no banco de dados, menor a chance de ocorrer identificação incorreta da espécie. Assim, seria importante obter amostras e sequências de *coxI* das 65 espécies de psitacídeos neotropicais ausentes no BOLD para confirmar as identificações aqui obtidas.

Concluindo, o *DNA barcoding* parece ser efetivo na correta identificação de espécies de aves e é especialmente útil em casos nos quais dados morfológicos não são acessíveis, como no presente trabalho. Assim sendo, a metodologia mostrou ser uma ferramenta útil na diagnose rápida de espécies de ovos apreendidos do tráfico ilegal de animais e pode contribuir na criação de medidas que visem à conservação desses grupos alvo. Apesar de as espécies aqui identificadas não serem consideradas muito ameaçadas de extinção, foi importante provar que o traficante não carregava ovos de codorna, mas de psitacídeos.

4.6. Referências

BirdLife International 2008. The BirdLife checklist of the birds of the word, with conservation status and taxonomic sources. vol.1 (www.birdlife.org/datazone/species/taxonomy.html)

Bruford M. W., Hanotte O., Brookfield J. F. Y. e Burke T. 1992. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. *In*: Hoelzel A. R. ed. *Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 225-269.

Caparroz R., Seixas G. H. F., Berkunsky I. e Collevatti R. G. 2009. The role of demography and climatic events in shaping the phylogeography of Amazona aestiva and definition of management units for conservation. Divers. Distrib., 15,459-468.

Clements J. F. 2007. *The Clements Checklist of Birds of the World.* New York: Cornell University Press.

Collar N. J. 1997. Family Psittacidae (Parrots). *In*: del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J. eds. *Handbook of the Birds of the World*, vol. 4, Sandgrouse to Cuckoos. Barcelona: Lynx Edicions, 246-479.

Eberhard J. R. e Bermingham E. 2004. Phylogeny and biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. Auk, 121, 318-332.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution,* 39, 783-791.

Frézal L. e Leblois R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. Inf. Genet. Evol., 8, 727-736

Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. e Waard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. London B., 270, 313–321.

Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S. e Francis C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. Plos Biol., 2, 01-06.

Kerr K. C. R., Stoeckle M. Y., Dove C. J., Weigt L. A., Francis C. F. e Hebert P. D. N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Mol. Ecol. Notes, 7, 535-543

Kimura M. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16, 111-120.

Moritz C. e Cicero C. 2004. DNA Barcoding: promise and pitfalls. Plos Biol., 2, 1529-1531.

Oliveira-Marques A. R. 2006. Filogenia Molecular das Espécies do Gênero *Ara* (Psittaciformes, Aves). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.

Ratnasingham S. e Hebert P. D. N 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Mol. Ecol. Notes, 7, 355-364.

Ribas, C.C.; Tavares, E.S.; Yoshihara, C. e Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeny and biogeography of Yellow-headed and Blue-fronted Parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with special reference to the South American taxa. Íbis, 149, 564-574.

Rubinoff D. 2006. Utility of mithochondrial DNA barcodes in species conservation. Conserv. Biol., 4, 1026-1033.

Russello M. A. e Amato G. 2004. A molecular phylogeny of *Amazona*: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. Mol. Phylogenet. Evol. 30, 421-437.

Sick H. 1997. Ornitologia Brasileira. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. 351-382

Tamura K., Dudley J., Nei M. e Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol., 24, 1596-1599.

Tavares E. S., Baker A. J., Pereira S. L. e Miyaki C. M. 2006. Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Syst. Biol., 55, 454-470.

Ward R. D. e Holmes B. H. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. Mol. Ecol. Notes, 7, 899–907.

Ward R. D., Zemlak T. S., Innes B. H., Last P. R. e Hebert P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, 360, 1847–1857.

Capítulo 5

Considerações finais

5.1. Conclusões

5.1.1. O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais

- A sobreposição dos valores de distância intra- e interespecífica não impediu que o *DNA barcode* diagnosticasse a maioria das espécies de aves neotropicais, mostrando que esse marcador parece ser muito útil na identificação rápida desse grupo. Portanto, apesar das criticas e limitações, é possível distinguir um grande número de espécies de aves neotropicais utilizando um pequeno fragmento do DNA mitocondrial.
- O banco de dados padronizado com sequências do *DNA barcode* de todos os táxons existentes possibilita utilizar as informações de tais sequências para diversos fins. No presente estudo realizamos algumas análises que indicaram grupos de aves que podem ser interessantes de serem explorados em estudos biogeográficos, contribuindo na compreensão da diversidade da região neotropical.
- Foram observadas espécies proximamente relacionadas que não puderam ser identificadas utilizando somente a distância genética intra- e interespecífica, o que pode ser uma limitação desse marcador e/ou da metodologia utilizada.

5.1.2. Análise de caracteres diagnósticos no DNA barcode de espécies proximamente relacionadas de psitacídeos neotropicais (tribo Arini)

- A análise de caracteres diagnósticos permitiu identificar todas as espécies irmãs estudadas e a maior parte dos pares de espécies de psitacídeos proximamente relacionados que não puderam ser identificados utilizando métodos de distância genética. Todos esses grupos apresentaram substituições fixas diagnósticas nas sequências do *coxI*.
- As espécies do complexo *Amazona aestiva/A. ochrochephala* e o par de espécies *Rhynchopsitta pachyrhyncha* e *R. terrisi* não apresentaram sítios diagnósticos no *coxI*. Isso confirmou a necessidade de mais estudos com esses táxons para esclarecer sua taxonomia.
- Esse método parece ser uma boa alternativa para a diagnose de espécies quando os métodos baseados em distâncias genéticas não são capazes de distinguir as espécies. Assim, para que o *DNA barcode* continue sendo uma ferramenta padronizada, seria importante incorporar esse método de análise nos sistemas do BOLD (*Barcoding of Life Data System* – www.barcodinlife.org) contribuindo para o aprimoramento desse sistema de identificação.

5.1.3. Identificação da espécie de embriões apreendidos do tráfico ilegal: aplicação prática do DNA barcode

- 93% das amostras de embriões apreendidas do tráfico ilegal foram identificadas utilizando o *DNA barcode*, sendo as espécies encontradas: *Ara ararauna*, *Triclaria malachitacea* e *Alipiopsitta*

xanthops. *O*s 7% restantes foram identificadas como *Amazona aestiva* e/ou *Amazona ochrochephala*. Essas espécies formam um complexo já descrito em alguns trabalhos de filogenia molecular, o que inviabiliza qualquer sistema de identificação de espécies ao nível molecular.

- O *DNA barcoding* é especialmente vantajoso em casos nos quais dados morfológicos não são acessíveis. Assim essa ferramenta é útil na diagnose rápida de espécies de ovos apreendidos do tráfico ilegal de animais e pode contribuir na criação de medidas que visem à conservação desses grupos alvo.

- Constatamos que é importante ter um banco de dados com sequências de *coxI* o mais completo possível (ex. com todas as espécies de aves do mundo) para permitir realizar identificações de espécies baseado nesse marcador (como apresentado aqui) que sejam mais precisas possível.

Apêndice 1. BOLD-ID: registro do BOLD; ID: registro da coleção em que a amostra está depositada; Tam.: tamanho da sequência em pares de base; Inst.: instituição na qual a amostra está depositada (USP: Universidade de São Paulo, Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves; MPEG: Museu Paranáense Emilio Goeldi; MACN: Museo Argentino de Ciencias Naturales); *AR: Argentina, BR: Brasil; Lat. e Lon.: latitude e longitude do local de coleta, respectivamente. Amostras sem informação de local correspondem àquelas obtidas em cativeiro ou sem a localidade de coleta conhecida. Grifado em cinza estão amostras que não foram utilizadas nas análises de distâncias intra- e interespecífica

BOLD-ID	ID	Tam.	Táxon	Inst.	País*	Local	Lat.	Lon.
KBAR649-06	MACN-Or-ct 708	694	*Accipiter bicolor*	MACN	AR	Jujuy	-24,12	-64,46
KBAR817-06	MACN-Or-ct 1561	694	*Accipiter bicolor*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KAARG270-07	MACN-Or-ct 2359	680	*Accipiter bicolor*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA345-08	LGEMA-363	698	*Accipiter bicolor*	USP	BR	Piauí		
NPARR005-07	LGEMA-8881	852	*Agapornis roseicollis*	USP				
NPARR009-07	LGEMA-5822	689	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR008-07	LGEMA-4953	735	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR255-08	LGEMA-4118	761	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR007-07	LGEMA-4952	818	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR344-09	LGEMA-5959	820	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR254-08	LGEMA-4017	820	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR006-07	LGEMA-4951	835	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR333-09	LGEMA-3797	865	*Amazona aestiva*	USP				
NPARR350-09	LGEMA-7683	871	*Amazona aestiva*	USP	BR	Minas Gerais		
NPARR010-07	LGEMA-5962	728	*Amazona albifrons*	USP				
NPARR012-07	LGEMA-7302	664	*Amazona amazonica*	USP	BR	Pará	-9,05	-56,59
NPARR316-08	LGEMA-5863	697	*Amazona amazonica*	USP	BR	Bahia		
NPARR011-07	LGEMA-7301	724	*Amazona amazonica*	USP	BR	Pará	-9,05	-56,59
NPARR355-09	MPEG-57928	750	*Amazona amazonica*	MPEG	BR	Pará	-9,30	-54,83
NPARR442-09	LGEMA-10069	805	*Amazona amazonica*	USP	BR	Amazonas		
NPARR013-07	LGEMA-9038	610	*Amazona auropalliata*	USP				
NPARR014-07	LGEMA-9037	870	*Amazona auropalliata*	USP				
NPARR016-07	LGEMA-6013	862	*Amazona autumnalis*	USP				
NPARR256-08	LGEMA-6597	718	*Amazona autumnalis*	USP				
NPARR017-07	LGEMA-9077	760	*Amazona brasiliensis*	USP				
NPARR018-07	LGEMA-9076	836	*Amazona brasiliensis*	USP				
NPARR331-08	LGEMA-9490	849	*Amazona brasiliensis*	USP				
NPARR020-07	LGEMA-5985	658	*Amazona collaria*	USP				
NPARR019-07	LGEMA-5984	866	*Amazona collaria*	USP				
NPARR257-08	LGEMA-3798	793	*Amazona dufresniana*	USP				
NPARR358-09	MPEG-58006	821	*Amazona farinosa*	MPEG	BR	Acre	-8,35	-73,31
NPARR024-07	LGEMA-7519	852	*Amazona farinosa*	USP				
NPARR023-07	LGEMA-7315	874	*Amazona farinosa*	USP				
NPARR318-08	LGEMA-5989	882	*Amazona farinosa*	USP				
NPARR311-08	LGEMA-5249	645	*Amazona festiva*	USP	BR	Pará		
NPARR258-08	LGEMA-8256	723	*Amazona festiva*	USP				
NPARR025-07	LGEMA-8320	725	*Amazona festiva*	USP				
NPARR027-07	LGEMA-7042	691	*Amazona kawalli*	USP				
NPARR308-08	LGEMA-4481	694	*Amazona kawalli*	USP	BR	Pará		
NPARR028-07	LGEMA-7043	700	*Amazona kawalli*	USP				
NPARR360-09	MPEG-62416	856	*Amazona kawalli*	MPEG	BR	Amazonas	-1,65	-66,00
NPARR361-09	MPEG-62417	873	*Amazona kawalli*	MPEG	BR	Amazonas	-1,65	-66,00
NPARR029-07	LGEMA-6000	692	*Amazona leucocephala*	USP				
NPARR336-09	LGEMA-4650	766	*Amazona ochrocephala*	USP	BR	Pará		
NPARR338-09	LGEMA-5218	775	*Amazona ochrocephala*	USP	BR	Pará		
NPARR343-09	LGEMA-5700	820	*Amazona ochrocephala*	USP	BR	Acre		
NPARR262-08	LGEMA-5707	837	*Amazona ochrocephala*	USP				
NPARR261-08	LGEMA-5221	849	*Amazona ochrocephala*	USP				
NPARR260-08	LGEMA-5204	858	*Amazona ochrocephala*	USP				
NPARR363-09	MPEG-64423	861	*Amazona ochrocephala*	MPEG	BR	Acre	-10,66	-67,96
NPARR259-08	LGEMA-5195	862	*Amazona ochrocephala*	USP				
NPARR337-09	LGEMA-4675	864	*Amazona ochrocephala*	USP	BR	Pará		
NPARR342-09	LGEMA-5690	865	*Amazona ochrocephala*	USP	BR	Acre		

NPARR362-09	MPEG-64351	867	*Amazona ochrocephala*	MPEG	BR	Acre	-9,87	-67,73
NPARR033-07	LGEMA-9045	666	*Amazona oratrix*	USP				
NPARR032-07	LGEMA-9044	840	*Amazona oratrix*	USP				
NPARR330-08	LGEMA-9304	699	*Amazona pretrei*	USP	BR	Rio Grande do Sul		
NPARR034-07	LGEMA-9428	718	*Amazona pretrei*	USP				
NPARR035-07	LGEMA-9429	848	*Amazona pretrei*	USP				
NPARR036-07	LGEMA-9436	713	*Amazona rhodocorytha*	USP				
NPARR315-08	LGEMA-5861	842	*Amazona rhodocorytha*	USP	BR	Bahia		
NPARR037-07	LGEMA-9437	857	*Amazona rhodocorytha*	USP				
NPARR039-07	LGEMA-6367	726	*Amazona tucumana*	USP				
NPARR041-07	LGEMA-6044	679	*Amazona ventralis*	USP				
NPARR040-07	LGEMA-6043	724	*Amazona ventralis*	USP				
NPARR042-07	LGEMA-8650	647	*Amazona vinacea*	USP				
NPARR043-07	LGEMA-8649	733	*Amazona vinacea*	USP				
NPARR322-08	LGEMA-7275	870	*Amazona vinacea*	USP				
NPARR044-07	LGEMA-3799	827	*Amazona viridigenalis*	USP				
NPARR327-08	LGEMA-8547	688	*Amazona xanthops*	USP				
NPARR319-08	LGEMA-6305	723	*Amazona xanthops*	USP				
NPARR264-08	LGEMA-6304	726	*Amazona xanthops*	USP				
NPARR449-09	LGEMA-8546	810	*Amazona xanthops*	USP				
NPARR448-09	LGEMA-8257	837	*Amazona xanthops*	USP				
LGEMA100-07	LGEMA-2429	729	*Anabacerthia amaurotis*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA347-08	LGEMA-493	671	*Ancistrops strigilatus*	USP	BR	Mato Grosso		
NPARR266-08	LGEMA-6919	735	*Anodorhynchus hyacinthinus*	USP				
NPARR265-08	LGEMA-3746	821	*Anodorhynchus hyacinthinus*	USP				
NPARR049-07	LGEMA-9368	854	*Anodorhynchus hyacinthinus*	USP				
NPARR054-07	LGEMA-6610	700	*Anodorhynchus leari*	USP				
NPARR055-07	LGEMA-8728	752	*Anodorhynchus leari*	USP				
NPARR267-08	LGEMA-9513	805	*Anodorhynchus leari*	USP				
NPARR053-07	LGEMA-4153	863	*Anodorhynchus leari*	USP				
LGEMA011-07	LGEMA-69	735	*Anopetia gounellei*	USP	BR	Piauí		
LGEMA009-07	LGEMA-64	735	*Anthracothorax nigricollis*	USP	BR	Piauí		
NPARR056-07	LGEMA-5965	606	*Ara ambiguus*	USP				
NPARR268-08	LGEMA-7680	684	*Ara ararauna*	USP				
NPARR447-09	LGEMA-5252	708	*Ara ararauna*	USP	BR	Pará		
NPARR445-09	LGEMA-6500	747	*Ara ararauna*	USP	BR	Goiás		
NPARR269-08	LGEMA-11485	781	*Ara ararauna*	USP				
NPARR058-07	LGEMA-3645	822	*Ara ararauna*	USP				
NPARR061-07	LGEMA-9255	718	*Ara chloropterus*	USP				
NPARR062-07	LGEMA-9256	722	*Ara chloropterus*	USP				
NPARR270-08	LGEMA-6771	852	*Ara chloropterus*	USP				
NPARR063-07	LGEMA-4255	714	*Ara glaucogularis*	USP				
NPARR066-07	LGEMA-7234	726	*Ara macao*	USP				
NPARR065-07	LGEMA-7141	729	*Ara macao*	USP				
NPARR367-09	MPEG-60931	817	*Ara macao*	MPEG	BR	Acre	-9,41	-68,36
NPARR368-09	MPEG-66404	854	*Ara macao*	MPEG	BR	Pará	-0,93	-53,23
NPARR271-08	LGEMA-6759	900	*Ara macao*	USP				
NPARR067-07	LGEMA-9031	598	*Ara militaris*	USP				
NPARR068-07	LGEMA-9032	793	*Ara militaris*	USP				
NPARR272-08	LGEMA-5786	847	*Ara militaris*	USP				
NPARR273-08	LGEMA-5531	597	*Ara rubrogenys*	USP				
NPARR070-07	LGEMA-9194	723	*Ara rubrogenys*	USP				
NPARR069-07	LGEMA-9193	733	*Ara rubrogenys*	USP				
NPARR274-08	LGEMA-8258	590	*Ara severus*	USP				
NPARR364-09	MPEG-60454	725	*Ara severus*	MPEG	BR	Acre	-10,23	-67,43
NPARR072-07	LGEMA-6572	789	*Ara severus*	USP	BR	Mato Grosso	-9,64	-55,95
NPARR365-09	MPEG-60455	792	*Ara severus*	MPEG	BR	Acre	-9,38	-68,19
NPARR275-08	LGEMA-5261	825	*Ara severus*	USP				
NPARR366-09	MPEG-64419	827	*Ara severus*	MPEG	BR	Acre	-10,67	-67,96
NPARR073-07	LGEMA-6573	847	*Ara severus*	USP	BR	Pará	-9,05	-56,59
KAARG002-07	MACN-Or-ct 60	694	*Aramides cajanea*	MACN	AR	Buenos Aires	-35,13	-57,38
KBARG120-07	MACN-Or-ct 1857	694	*Aramides cajanea*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
KBARG158-07	MACN-Or-ct 1828	694	*Aramides cajanea*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
LGEMA035-07	LGEMA-395	734	*Aramides cajanea*	USP	BR	Mato Grosso		
NPARR317-08	LGEMA-5957	708	*Aratinga acuticaudata*	USP				

NPARR078-07	LGEMA-8223	755	*Aratinga acuticaudata*	USP				
NPARR307-08	LGEMA-4014	813	*Aratinga acuticaudata*	USP				
NPARR079-07	LGEMA-8224	861	*Aratinga acuticaudata*	USP				
NPARR312-08	LGEMA-5263	687	*Aratinga aurea*	USP	BR	Pará		
NPARR309-08	LGEMA-4795	718	*Aratinga aurea*	USP	BR	Bahia		
NPARR370-09	MPEG-57516	824	*Aratinga aurea*	MPEG	BR	Amazonas	-8,59	-61,55
NPARR371-09	MPEG-57517	827	*Aratinga aurea*	MPEG	BR	Amazonas	-8,52	-61,48
NPARR369-09	MPEG-A8494	837	*Aratinga aurea*	MPEG	BR	Pará	-0,30	-50,10
NPARR081-07	LGEMA-5738	847	*Aratinga aurea*	USP				
NPARR080-07	LGEMA-3978	850	*Aratinga aurea*	USP				
NPARR372-09	MPEG-57520	862	*Aratinga aurea*	MPEG	BR	Amazonas	-8,68	-61,50
NPARR325-08	LGEMA-7992	632	*Aratinga auricapillus*	USP				
NPARR323-08	LGEMA-7663	683	*Aratinga auricapillus*	USP				
NPARR324-08	LGEMA-7881	715	*Aratinga auricapillus*	USP				
NPARR074-07	LGEMA-8444	716	*Aratinga auricapillus*	USP				
NPARR075-07	LGEMA-8445	737	*Aratinga auricapillus*	USP				
NPARR187-07	LGEMA-4469	622	*Aratinga cactorum*	USP				
NPARR277-08	LGEMA-4624	726	*Aratinga cactorum*	USP				
NPARR082-07	LGEMA-8617	762	*Aratinga cactorum*	USP				
NPARR083-07	LGEMA-8618	828	*Aratinga cactorum*	USP				
NPARR084-07	LGEMA-9166	728	*Aratinga erythrogenys*	USP				
NPARR085-07	LGEMA-9167	729	*Aratinga erythrogenys*	USP				
NPARR278-08	LGEMA-8873	722	*Aratinga holochlora*	USP				
NPARR354-09	LGEMA-8872	870	*Aratinga holochlora*	USP				
NPARR276-08	LGEMA-8304	726	*Aratinga jandaya*	USP				
NPARR076-07	LGEMA-4944	731	*Aratinga jandaya*	USP				
NPARR349-09	LGEMA-7658	817	*Aratinga jandaya*	USP	BR	Maranhão		
NPARR339-09	LGEMA-5363	866	*Aratinga jandaya*	USP				
NPARR334-09	LGEMA-4323	867	*Aratinga jandaya*	USP				
NPARR374-09	MPEG-61232	684	*Aratinga leucophthalma*	MPEG	BR	Acre	-9,91	-68,56
NPARR090-07	LGEMA-6577	815	*Aratinga leucophthalma*	USP	BR	Pará	-9,05	-56,59
NPARR089-07	LGEMA-5722	830	*Aratinga leucophthalma*	USP				
NPARR377-09	MPEG-63686	832	*Aratinga leucophthalma*	MPEG	BR	Acre	-8,55	-70,61
NPARR088-07	LGEMA-5257	839	*Aratinga leucophthalma*	USP				
NPARR376-09	MPEG-64408	860	*Aratinga leucophthalma*	MPEG	BR	Acre	-9,87	-67,22
NPARR092-07	LGEMA-7327	672	*Aratinga mitrata*	USP				
NPARR320-08	LGEMA-6402	840	*Aratinga mitrata*	USP				
NPARR321-08	LGEMA-6444	855	*Aratinga mitrata*	USP				
NPARR091-07	LGEMA-7326	873	*Aratinga mitrata*	USP				
NPARR279-08	LGEMA-9352	730	*Aratinga pertinax*	USP				
NPARR383-09	MPEG-MPDS0559	740	*Aratinga pertinax*	MPEG	BR	Roraima	-2,58	-61,00
NPARR380-09	MPEG-MPDS0533	843	*Aratinga pertinax*	MPEG	BR	Roraima	-2,67	-61,20
NPARR382-09	MPEG-56514	843	*Aratinga pertinax*	MPEG	BR	Roraima	-2,68	-61,27
NPARR381-09	MPEG-56806	853	*Aratinga pertinax*	MPEG	BR		-2,68	-61,27
NPARR096-07	LGEMA-9159	681	*Aratinga pintoi*	USP				
NPARR095-07	LGEMA-9158	682	*Aratinga pintoi*	USP				
NPARR280-08	LGEMA-7092	695	*Aratinga pintoi*	USP				
NPARR384-09	MPEG-66405	856	*Aratinga pintoi*	MPEG	BR	Pará	-0,93	-53,23
NPARR284-08	LGEMA-9161	684	*Aratinga wagleri*	USP				
NPARR283-08	LGEMA-9160	684	*Aratinga wagleri*	USP				
NPARR282-08	LGEMA-5796	723	*Aratinga weddellii*	USP				
NPARR313-08	LGEMA-5717	725	*Aratinga weddellii*	USP	BR	Acre		
NPARR281-08	LGEMA-5694	728	*Aratinga weddellii*	USP				
NPARR385-09	MPEG-58662	826	*Aratinga weddellii*	MPEG	BR	Amazonas	-7,47	-62,93
NPARR388-09	MPEG-63478	828	*Aratinga weddellii*	MPEG	BR	Acre	-10,04	-67,88
NPARR379-09	MPEG-52707	836	*Aratinga weddellii*	MPEG	BR	Acre	-7,43	-73,65
NPARR386-09	MPEG-61233	836	*Aratinga weddellii*	MPEG	BR	Acre	-9,91	-68,56
NPARR389-09	MPEG-64348	854	*Aratinga weddellii*	MPEG	BR	Acre	-9,87	-67,22
NPARR387-09	MPEG-61988	857	*Aratinga weddellii*	MPEG	BR	Acre	-8,43	-72,65
LGEMA072-07	LGEMA-1350	725	*Arremon semitorquatus*	USP	BR	Paraná		
LGEMA348-08	LGEMA-535	697	*Arremon taciturnus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA349-08	LGEMA-2647	713	*Arremon taciturnus*	USP	BR	Bahia	-12,43	-41,36
LGEMA301-07	LGEMA-10245	734	*Arremon taciturnus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA350-08	LGEMA-3004	706	*Arundinicola leucocephala*	USP	BR	São Paulo		

LGEMA226-07	LGEMA-9729	736	*Attila cinnamomeus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA351-08	LGEMA-2436	738	*Attila rufus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA352-08	LGEMA-9871	729	*Automolus infuscatus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA265-07	LGEMA-9970	729	*Automolus ochrolaemus*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
KBARG372-07	MACN-Or-ct 2850	685	*Baryphthengus ruficapillus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG389-07	MACN-Or-ct 2950	685	*Baryphthengus ruficapillus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG323-07	MACN-Or-ct 2856	694	*Baryphthengus ruficapillus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA325-07	LGEMA-10429	666	*Baryphthengus ruficapillus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA304-07	LGEMA-10287	695	*Basileuterus culicivorus*	USP	BR	Rio de Janeiro	-22,03	-42,30
LGEMA354-08	LGEMA-2173	732	*Basileuterus culicivorus*	USP	BR	Rio Grande do Sul	-1,37	-52,38
LGEMA355-08	LGEMA-2768	740	*Basileuterus flaveolus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA353-08	LGEMA-506	669	*Basileuterus fulvicauda*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA308-07	LGEMA-10296	693	*Basileuterus hypoleucus*	USP	BR	Minas Gerais	-21,43	-43,50
LGEMA356-08	LGEMA-2196	725	*Basileuterus leucoblepharus*	USP	BR	Santa Catarina		
NPARR101-07	LGEMA-7307	873	*Bolborhynchus lineola*	USP				
NPARR102-07	LGEMA-8025	895	*Bolborhynchus lineola*	USP				
NPARR107-07	LGEMA-7458	782	*Brotogeris chiriri*	USP				
NPARR104-07	LGEMA-9114	804	*Brotogeris chiriri*	USP				
NPARR351-09	LGEMA-8255	904	*Brotogeris chiriri*	USP				
NPARR108-07	LGEMA-9323	724	*Brotogeris chrysoptera*	USP	BR	Pará	-2,47	-56,00
NPARR110-07	LGEMA-9329	777	*Brotogeris chrysoptera*	USP	BR	Amazonas	-4,85	-65,08
NPARR112-07	LGEMA-7509	795	*Brotogeris chrysoptera*	USP				
NPARR391-09	MPEG-58248	822	*Brotogeris chrysoptera*	MPEG	BR	Pará	-2,47	-56,00
NPARR109-07	LGEMA-6580	830	*Brotogeris chrysoptera*	USP				
NPARR347-09	LGEMA-7305	870	*Brotogeris chrysoptera*	USP				
NPARR390-09	MPEG-65303	871	*Brotogeris chrysoptera*	MPEG	BR	Pará		
NPARR397-09	MPEG-64420	764	*Brotogeris cyanoptera*	MPEG	BR	Acre	-10,67	-67,96
NPARR114-07	LGEMA-5699	765	*Brotogeris cyanoptera*	USP				
NPARR113-07	LGEMA-5986	825	*Brotogeris cyanoptera*	USP				
NPARR393-09	MPEG-61234	835	*Brotogeris cyanoptera*	MPEG	BR	Acre	-9,91	-68,56
NPARR115-07	LGEMA-5987	838	*Brotogeris cyanoptera*	USP				
NPARR392-09	MPEG-58826	852	*Brotogeris cyanoptera*	MPEG	BR	Acre	-11,06	-70,22
NPARR396-09	MPEG-64349	858	*Brotogeris cyanoptera*	MPEG	BR	Acre	-9,87	-67,22
NPARR116-07	LGEMA-5696	996	*Brotogeris cyanoptera*	USP				
NPARR121-07	LGEMA-9324	733	*Brotogeris sanctithomae*	USP	BR	Pará	-0,23	-50,09
NPARR285-08	LGEMA-4992	776	*Brotogeris sanctithomae*	USP				
NPARR286-08	LGEMA-4993	805	*Brotogeris sanctithomae*	USP				
NPARR119-07	LGEMA-9327	805	*Brotogeris sanctithomae*	USP			-8,74	-72,83
NPARR118-07	LGEMA-9325	813	*Brotogeris sanctithomae*	USP	BR	Pará	-0,23	-50,09
NPARR398-09	MPEG-58828	848	*Brotogeris sanctithomae*	MPEG	BR	Acre	-11,06	-70,22
NPARR120-07	LGEMA-9328	866	*Brotogeris sanctithomae*	USP				
NPARR117-07	LGEMA-5692	870	*Brotogeris sanctithomae*	USP				
NPARR125-07	LGEMA-6253	652	*Brotogeris tirica*	USP				
NPARR126-07	LGEMA-4140	772	*Brotogeris tirica*	USP				
NPARR127-07	LGEMA-8254	782	*Brotogeris tirica*	USP				
NPARR124-07	LGEMA-7599	852	*Brotogeris tirica*	USP				
NPARR123-07	LGEMA-7460	914	*Brotogeris tirica*	USP				
NPARR132-07	LGEMA-5223	657	*Brotogeris versicolurus*	USP				
NPARR133-07	LGEMA-5234	667	*Brotogeris versicolurus*	USP				
NPARR134-07	LGEMA-5227	688	*Brotogeris versicolurus*	USP				
NPARR131-07	LGEMA-5226	749	*Brotogeris versicolurus*	USP				
NPARR129-07	LGEMA-5229	749	*Brotogeris versicolurus*	USP				
NPARR128-07	LGEMA-9326	762	*Brotogeris versicolurus*	USP	BR	Pará	-0,28	-50,08
NPARR130-07	LGEMA-5230	767	*Brotogeris versicolurus*	USP				
LGEMA251-07	LGEMA-9877	744	*Bucco capensis*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
KAARG272-07	MACN-Or-ct 2361	694	*Buteo albicaudatus*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
LGEMA020-07	LGEMA-304	733	*Buteo albicaudatus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA357-08	LGEMA-361	686	*Buteo albonotatus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA332-07	LGEMA-357	711	*Buteo magnirostris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA017-07	LGEMA-257	734	*Buteo magnirostris*	USP	BR	Paraná		
NPARR004-07	LGEMA-4395	840	*Cacatua galerita*	USP				
NPARR003-07	LGEMA-4248	866	*Cacatua galerita*	USP				
LGEMA246-07	LGEMA-9851	716	*Cacicus cela*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA154-07	LGEMA-3604	708	*Campephilus melanoleucos*	USP	BR	Piauí		

LGEMA360-08	LGEMA-20	706	*Campylopterus largipennis*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA128-07	LGEMA-2992	733	*Campylorhamphus falcularius*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA042-07	LGEMA-430	723	*Campylorhamphus procurvoides*	USP	BR	Mato Grosso		
KAARG624-07	MACN-Or-ct 3274	674	*Campylorhamphus trochilirostris*	MACN	AR	Formosa	-25,10	-58,20
KAARG136-07	MACN-Or-ct 2092	689	*Campylorhamphus trochilirostris*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KAARG570-07	MACN-Or-ct 3186	664	*Campylorhamphus trochilirostris*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
LGEMA337-07	LGEMA-2746	731	*Campylorhamphus trochilirostris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA173-07	LGEMA-9575	751	*Capito auratus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA142-07	LGEMA-3289	731	*Capito dayi*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA014-07	LGEMA-104	750	*Caprimulgus longirostris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA187-07	LGEMA-9613	743	*Caprimulgus nigrescens*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
KAARG143-07	MACN-Or-ct 2105	694	*Caprimulgus parvulus*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KAARG129-07	MACN-Or-ct 2082	694	*Caprimulgus parvulus*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA013-07	LGEMA-99	725	*Caprimulgus parvulus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA362-08	LGEMA-101	680	*Caprimulgus rufus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA119-07	LGEMA-2771	727	*Casiornis fuscus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA059-07	LGEMA-526	770	*Casiornis rufus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA032-07	LGEMA-362	735	*Cathartes aura*	USP	BR	Piauí		
KBAR800-06	MACN-Or-ct 1494	694	*Cathartes burrovianus*	MACN	AR	Corrientes	-27,60	-58,65
KBARG049-07	MACN-Or-ct 1742	694	*Cathartes burrovianus*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
LGEMA031-07	LGEMA-359	736	*Cathartes burrovianus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA025-07	LGEMA-347	755	*Cathartes melambrotus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA271-07	LGEMA-10001	729	*Celeus elegans*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA207-07	LGEMA-9650	711	*Celeus grammicus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA225-07	LGEMA-9727	730	*Celeus torquatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA135-07	LGEMA-3253	733	*Cercomacra laeta*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA192-07	LGEMA-9619	750	*Cercomacra tyrannina*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA340-07	LGEMA-3003	744	*Certhiaxis cinnamomeus*	USP	BR	São Paulo		
NPARR135-07	LGEMA-8863	825	*Chalcopsitta cardinalis*	USP				
NPARR136-07	LGEMA-8890	850	*Chalcopsitta cardinalis*	USP				
LGEMA336-07	LGEMA-1183	731	*Chamaeza meruloides*	USP	BR	São Paulo		
KBAR521-06	MACN-Or-ct 1446	694	*Charadrius collaris*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR520-06	MACN-Or-ct 1445	694	*Charadrius collaris*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBARG045-07	MACN-Or-ct 1751	694	*Charadrius collaris*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
LGEMA218-07	LGEMA-9691	746	*Charadrius collaris*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA203-07	LGEMA-9641	752	*Chelidoptera tenebrosa*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA146-07	LGEMA-3298	752	*Chelidoptera tenebrosa*	USP	BR	Mato Grosso		
KBARG115-07	MACN-Or-ct 1980	694	*Chiroxiphia caudata*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
KBARG147-07	MACN-Or-ct 1989	694	*Chiroxiphia caudata*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
KBARG383-07	MACN-Or-ct 2979	694	*Chiroxiphia caudata*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA329-07	LGEMA-2085	740	*Chiroxiphia caudata*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA223-07	LGEMA-9718	702	*Chiroxiphia pareola*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA312-07	LGEMA-10319	710	*Chloroceryle aenea*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA016-07	LGEMA-187	735	*Chloroceryle aenea*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA171-07	LGEMA-9571	736	*Chlorophanes spiza*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA229-07	LGEMA-9753	737	*Chordeiles acutipennis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA364-08	LGEMA-60	706	*Chrysolampis mosquitus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA015-07	LGEMA-186	753	*Claravis pretiosa*	USP	BR	Piauí		
LGEMA008-07	LGEMA-59	707	*Clytolaema rubricauda*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA233-07	LGEMA-9769	743	*Cnipodectes subbrunneus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA219-07	LGEMA-9693	738	*Coccyzus americanus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA109-07	LGEMA-2724	731	*Coereba flaveola*	USP	BR	Piauí		
LGEMA367-08	LGEMA-174	703	*Columba palumbus*	USP	BR	Pará		
LGEMA359-08	LGEMA-2830	716	*Compsothraupis loricata*	USP	BR	Piauí		
LGEMA126-07	LGEMA-2847	752	*Compsothraupis loricata*	USP	BR	Piauí		
LGEMA320-07	LGEMA-10337	721	*Conirostrum bicolor*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA070-07	LGEMA-1302	746	*Conirostrum speciosum*	USP	BR	Paraná	-23,97	-50,05
LGEMA369-08	LGEMA-2107	689	*Conopophaga aurita*	USP	BR	Pará		
LGEMA178-07	LGEMA-9588	716	*Conopophaga aurita*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA048-07	LGEMA-467	733	*Conopophaga aurita*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA370-08	LGEMA-2049	702	*Conopophaga lineata*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA371-08	LGEMA-2658	719	*Conopophaga lineata*	USP	BR	Bahia	-11,91	-41,22
LGEMA323-07	LGEMA-10365	739	*Conopophaga lineata*	USP	AR	Misiones	-25,86	-53,98
LGEMA372-08	LGEMA-1613	642	*Conopophaga melanops*	USP	BR	São Paulo		

LGEMA373-08	LGEMA-1713	698	*Conopophaga melanops*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA374-08	LGEMA-1756	700	*Conopophaga melanops*	USP	BR	Rio de Janeiro		
LGEMA376-08	LGEMA-10318	706	*Conopophaga melanops*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA080-07	LGEMA-1528	730	*Conopophaga melanops*	USP	BR	Bahia		
LGEMA095-07	LGEMA-2105	761	*Conopophaga melanops*	USP	BR	Alagoas		
LGEMA083-07	LGEMA-1639	750	*Conopophaga roberti*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA084-07	LGEMA-1641	753	*Conopophaga roberti*	USP	BR	Piauí		
KAARG283-07	MACN-Or-ct 2374	694	*Coragyps atratus*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR793-06	MACN-Or-ct 1463	694	*Coragyps atratus*	MACN	AR	Corrientes	-27,60	-58,65
LGEMA028-07	LGEMA-353	754	*Coragyps atratus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA114-07	LGEMA-2750	707	*Coryphospingus pileatus*	USP	BR	Piauí		
KBARG394-07	MACN-Or-ct 2937	694	*Corythopis delalandi*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG380-07	MACN-Or-ct 2965	694	*Corythopis delalandi*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG123-07	MACN-Or-ct 1981	694	*Corythopis delalandi*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
LGEMA377-08	LGEMA-2368	717	*Corythopis delalandi*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA378-08	LGEMA-410	709	*Corythopis torquatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA379-08	LGEMA-9548	707	*Crypturellus parvirostris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA258-07	LGEMA-9907	727	*Crypturellus soui*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
KAARG461-07	MACN-Or-cp 77	656	*Crypturellus tataupa*	MACN	AR	Misiones	-27,46	-55,74
LGEMA160-07	LGEMA-9549	721	*Crypturellus tataupa*	USP	BR	Piauí		
LGEMA232-07	LGEMA-9766	718	*Cyanerpes caeruleus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA341-07	LGEMA-9767	730	*Cyanerpes nitidus*	USP	BR	Amapá	-2,85	-60,87
KBAR242-06	MACN-Or-ct 1150	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Jujuy	-23,28	-65,76
KAARG138-07	MACN-Or-ct 2094	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR766-06	MACN-Or-ct 1386	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR792-06	MACN-Or-ct 1461	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR334-06	MACN-Or-ct 902	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
KBAR241-06	MACN-Or-ct 1142	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
KBARG090-07	MACN-Or-ct 1706	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
KBARG027-07	MACN-Or-ct 1384	694	*Cyanocompsa brissonii*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
LGEMA111-07	LGEMA-2741	754	*Cyanocompsa brissonii*	USP	BR	Piauí		
LGEMA381-08	LGEMA-483	642	*Cyanocompsa cyanoides*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA296-07	LGEMA-10223	758	*Cyanocompsa cyanoides*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
KAARG590-07	MACN-Or-ct 3215	673	*Cyanocorax chrysops*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
KBAR781-06	MACN-Or-ct 1430	694	*Cyanocorax chrysops*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR797-06	MACN-Or-ct 1486	694	*Cyanocorax chrysops*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR771-06	MACN-Or-ct 1395	694	*Cyanocorax chrysops*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR203-06	MACN-Or-ct 1137	694	*Cyanocorax chrysops*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
LGEMA087-07	LGEMA-1649	735	*Cyanocorax chrysops*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA382-08	LGEMA-2702	721	*Cyanocorax cyanopogon*	USP	BR	Piauí		
NPARR329-08	LGEMA-8803	728	*Cyanoliseus patagonus*	USP				
NPARR138-07	LGEMA-8599	853	*Cyanoliseus patagonus*	USP				
NPARR137-07	LGEMA-5469	861	*Cyanoliseus patagonus*	USP				
NPARR188-07	LGEMA-4258	672	*Cyanopsitta spixii*	USP				
NPARR287-08	LGEMA-10256	719	*Cyanopsitta spixii*	USP				
NPARR140-07	LGEMA-8732	817	*Cyanopsitta spixii*	USP				
NPARR139-07	LGEMA-4041	853	*Cyanopsitta spixii*	USP				
KBAR765-06	MACN-Or-ct 1383	645	*Cyclarhis gujanensis*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR784-06	MACN-Or-ct 1441	645	*Cyclarhis gujanensis*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR796-06	MACN-Or-ct 1482	645	*Cyclarhis gujanensis*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR204-06	MACN-Or-ct 1118	694	*Cyclarhis gujanensis*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
LGEMA120-07	LGEMA-2774	750	*Cyclarhis gujanensis*	USP	BR	Piauí		
LGEMA213-07	LGEMA-9669	703	*Cymbilaimus lineatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA054-07	LGEMA-487	624	*Cyphorhinus arada*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA239-07	LGEMA-9810	746	*Cyphorhinus arada*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA383-08	LGEMA-9684	664	*Dacnis cayana*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA071-07	LGEMA-1305	752	*Dacnis cayana*	USP	BR	Paraná	-23,97	-50,05
LGEMA384-08	LGEMA-9721	658	*Deconychura longicauda*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA333-07	LGEMA-428	771	*Deconychura longicauda*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA385-08	LGEMA-595	672	*Deconychura stictolaema*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA235-07	LGEMA-9789	739	*Deconychura stictolaema*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA134-07	LGEMA-3247	606	*Dendrocincla fuliginosa*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA252-07	LGEMA-9881	729	*Dendrocincla fuliginosa*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA136-07	LGEMA-3255	730	*Dendrocincla fuliginosa*	USP	BR	Tocantins		

LGEMA193-07	LGEMA-9621	737	*Dendrocincla merula*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
KBARG281-07	MACN-Or-ct 2897	694	*Dendrocincla turdina*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG402-07	MACN-Or-ct 2939	694	*Dendrocincla turdina*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG409-07	MACN-Or-ct 2958	694	*Dendrocincla turdina*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA313-07	LGEMA-10321	731	*Dendrocincla turdina*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA236-07	LGEMA-9791	731	*Dendrocolaptes certhia*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA038-07	LGEMA-407	734	*Dendroplex picus*	USP	BR	Mato Grosso		
NPARR328-08	LGEMA-8571	683	*Deroptyus accipitrinus*	USP				
NPARR399-09	MPEG-66409	845	*Deroptyus accipitrinus*	MPEG	BR	Pará	-0,93	-53,23
NPARR142-07	LGEMA-4028	847	*Deroptyus accipitrinus*	USP				
NPARR141-07	LGEMA-4027	848	*Deroptyus accipitrinus*	USP				
NPARR400-09	MPEG-MPDS0540	757	*Diopsittaca nobilis*	MPEG	BR	Roraima	-2,58	-61,00
NPARR402-09	MPEG-MPDS0542	839	*Diopsittaca nobilis*	MPEG	BR	Roraima	-2,58	-61,00
NPARR143-07	LGEMA-3760	850	*Diopsittaca nobilis*	USP				
NPARR144-07	LGEMA-4605	864	*Diopsittaca nobilis*	USP				
NPARR145-07	LGEMA-4758	865	*Diopsittaca nobilis*	USP				
LGEMA519-08	LGEMA-9567	611	*Dixiphia pipra*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA386-08	LGEMA-10199	716	*Dixiphia pipra*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA387-08	LGEMA-10208	716	*Dixiphia pipra*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA290-07	LGEMA-10200	741	*Dixiphia pipra*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA388-08	LGEMA-218	705	*Dromococcyx phasianellus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA389-08	LGEMA-2411	719	*Drymophila ferruginea*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA390-08	LGEMA-1162	701	*Drymophila malura*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA307-07	LGEMA-10294	722	*Drymophila ochropyga*	USP	BR	Minas Gerais		
LGEMA391-08	LGEMA-10330	696	*Drymophila squamata*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA255-07	LGEMA-9899	738	*Dryocopus lineatus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA151-07	LGEMA-3547	744	*Dryocopus lineatus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA067-07	LGEMA-1067	701	*Dysithamnus mentalis*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA306-07	LGEMA-10292	733	*Dysithamnus mentalis*	USP	BR	Minas Gerais		
NPARR146-07	LGEMA-8883	675	*Eclectus roratus*	USP				
NPARR149-07	LGEMA-8806	757	*Enicognathus leptorhynchus*	USP				
NPARR148-07	LGEMA-8805	867	*Enicognathus leptorhynchus*	USP				
NPARR150-07	LGEMA-8807	868	*Enicognathus leptorhynchus*	USP				
KBAR819-06	MACN-Or-ct 1564	694	*Euphonia chlorotica*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBARG312-07	MACN-Or-ct 2903	694	*Euphonia chlorotica*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KAARG597-07	MACN-Or-ct 3225	681	*Euphonia chlorotica*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
LGEMA104-07	LGEMA-2689	749	*Euphonia chlorotica*	USP	BR	Piauí		
LGEMA050-07	LGEMA-479	730	*Euphonia rufiventris*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA395-08	LGEMA-524	697	*Euscarthmus meloryphus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA121-07	LGEMA-2801	738	*Euscarthmus meloryphus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA397-08	LGEMA-369	704	*Falco sparverius*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA396-08	LGEMA-355	710	*Falco sparverius*	USP	BR	Piauí		
LGEMA398-08	LGEMA-54	702	*Florisuga fuscus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA280-07	LGEMA-10153	731	*Formicarius analis*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA399-08	LGEMA-9700	706	*Formicarius colma*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA283-07	LGEMA-10174	734	*Formicarius colma*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA400-08	LGEMA-513	697	*Formicivora grisea*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA305-07	LGEMA-10290	703	*Formicivora grisea*	USP	BR	Bahia	-13,37	-39,08
LGEMA401-08	LGEMA-2764	735	*Formicivora melanogaster*	USP	BR	Piauí		
LGEMA402-08	LGEMA-511	651	*Formicivora rufa*	USP	BR	Mato Grosso		
NPARR153-07	LGEMA-4105	879	*Forpus crassirostris*	USP				
NPARR403-09	MPEG-64421	730	*Forpus sclateri*	MPEG	BR	Acre	-10,67	-67,96
NPARR289-08	LGEMA-4133	819	*Forpus xanthopterygius*	USP				
NPARR288-08	LGEMA-4106	850	*Forpus xanthopterygius*	USP				
LGEMA266-07	LGEMA-9972	734	*Frederickena viridis*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA248-07	LGEMA-9864	739	*Galbula albirostris*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA302-07	LGEMA-10246	739	*Galbula dea*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA268-07	LGEMA-9980	763	*Galbula galbula*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA228-07	LGEMA-9751	742	*Galbula leucogastra*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA155-07	LGEMA-3607	737	*Galbula ruficauda*	USP	BR	Piauí		
LGEMA404-08	LGEMA-366	702	*Gampsonyx swainsonii*	USP	BR	Pará		
LGEMA021-07	LGEMA-305	735	*Gampsonyx swainsonii*	USP	BR	Piauí		
LGEMA405-08	LGEMA-173	624	*Geotrygon montana*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA406-08	LGEMA-10283	714	*Geotrygon montana*	USP	BR	Espírito Santo		

LGEMA259-07	LGEMA-9908	755	*Geotrygon montana*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA019-07	LGEMA-303	699	*Geranospiza caerulescens*	USP	BR	Piauí		
LGEMA158-07	LGEMA-9529	736	*Glaucidium brasilianum*	USP	BR	Piauí		
KBAR627-06	MACN-Or-ct 382	694	*Glaucidium brasilianum*	MACN	AR		-34,60	-58,48
KAARG576-07	MACN-Or-ct 3193	671	*Glaucidium brasilianum*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
KBARG002-07	MACN-Or-ct 1335	694	*Glaucidium brasilianum*	MACN	AR	Buenos Aires	-34,60	-58,44
LGEMA407-08	LGEMA-592	672	*Glyphorynchus spirurus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA169-07	LGEMA-9566	733	*Glyphorynchus spirurus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA168-07	LGEMA-9565	733	*Glyphorynchus spirurus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA237-07	LGEMA-9796	761	*Glyphorynchus spirurus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
KAARG070-07	MACN-Or-ct 1887	694	*Gnorimopsar chopi*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA112-07	LGEMA-2744	750	*Gnorimopsar chopi*	USP	BR	Piauí		
LGEMA051-07	LGEMA-484	603	*Granatellus pelzelni*	USP	BR	Mato Grosso		
NPARR291-08	LGEMA-8987	681	*Graydidascalus brachyurus*	USP				
NPARR290-08	LGEMA-5256	790	*Graydidascalus brachyurus*	USP				
NPARR160-07	LGEMA-5255	815	*Graydidascalus brachyurus*	USP				
KBAR607-06	MACN-Or-ct 040	694	*Gubernatrix cristata*	MACN	AR	Buenos Aires	-40,58	-62,68
LGEMA408-08	LGEMA-2546	741	*Gubernatrix cristata*	USP				
LGEMA409-08	LGEMA-1620	706	*Gubernetes yetapa*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA181-07	LGEMA-9596	739	*Gymnopithys leucaspis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA273-07	LGEMA-10020	743	*Gymnopithys rufigula*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA530-08	LGEMA-408	708	*Gymnostinops bifasciatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA311-07	LGEMA-10316	662	*Habia rubica*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA411-08	LGEMA-1758	706	*Habia rubica*	USP	BR	Rio de Janeiro		
LGEMA078-07	LGEMA-1397	735	*Habia rubica*	USP	AR	Misiones		
LGEMA089-07	LGEMA-2047	735	*Habia rubica*	USP	BR	São Paulo		
KBARG396-07	MACN-Or-ct 2969	694	*Haplospiza unicolor*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA412-08	LGEMA-1611	679	*Haplospiza unicolor*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA413-08	LGEMA-233	711	*Harpagus bidentatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA022-07	LGEMA-307	735	*Harpagus diodon*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA414-08	LGEMA-339	697	*Harpyhaliaetus coronatus*	USP	BR	Rio de Janeiro		
LGEMA415-08	LGEMA-2194	695	*Heliobletus contaminatus*	USP	BR	Santa Catarina		
LGEMA220-07	LGEMA-9697	730	*Heliothryx barroti*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA052-07	LGEMA-485	735	*Hemithraupis flavicollis*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA191-07	LGEMA-9617	747	*Hemithraupis flavicollis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA124-07	LGEMA-2832	709	*Hemithraupis guira*	USP	BR	Piauí		
KBARG186-07	MACN-Or-ct 2039	694	*Hemitriccus diops*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
LGEMA417-08	LGEMA-1167	702	*Hemitriccus diops*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA418-08	LGEMA-2720	731	*Hemitriccus margaritaceiventer*	USP	BR	Piauí		
LGEMA309-07	LGEMA-10298	740	*Hemitriccus margaritaceiventer*	USP	BR	Bahia		
LGEMA419-08	LGEMA-559	687	*Hemitriccus minor*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA277-07	LGEMA-10149	717	*Hemitriccus minor*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA099-07	LGEMA-2412	780	*Hemitriccus nidipendulus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA420-08	LGEMA-2078	685	*Hemitriccus orbitatus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA421-08	LGEMA-10301	718	*Herpsilochmus atricapillus*	USP	BR	Minas Gerais		
LGEMA108-07	LGEMA-2719	740	*Herpsilochmus sellowi*	USP	BR	Piauí		
LGEMA327-07	LGEMA-10541	735	*Himantopus mexicanus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA423-08	LGEMA-594	680	*Hylexetastes perrotii*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA424-08	LGEMA-2117	734	*Hylexetastes uniformis*	USP	BR	Pará		
LGEMA319-07	LGEMA-10335	729	*Hylocharis cyanus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA426-08	LGEMA-567	689	*Hyloctistes subulatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA427-08	LGEMA-2773	731	*Hylopezus ochroleucus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA429-08	LGEMA-600	697	*Hylophilus ochraceiceps*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA438-08	LGEMA-10003	742	*Hylophilus ochraceiceps*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA214-07	LGEMA-9675	752	*Hylophilus ochraceiceps*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA428-08	LGEMA-2120	743	*Hylophilus semicinereus*	USP	BR	Pará		
LGEMA431-08	LGEMA-9698	700	*Hylophilus thoracicus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA180-07	LGEMA-9593	742	*Hylophylax naevius*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA432-08	LGEMA-2118	746	*Hylophylax naevius*	USP	BR	Pará		
LGEMA433-08	LGEMA-450	702	*Hylophylax poecilinotus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA435-08	LGEMA-9894	712	*Hylophylax poecilinotus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA436-08	LGEMA-9947	734	*Hylophylax poecilinotus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA293-07	LGEMA-10205	750	*Hylophylax poecilinotus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA244-07	LGEMA-9832	751	*Hylophylax poecilinotus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17

LGEMA058-07	LGEMA-522	753	*Hylophylax poecilinotus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA437-08	LGEMA-466	702	*Hylophylax punctulatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA439-08	LGEMA-446	714	*Hypocnemis cantator*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA190-07	LGEMA-9616	736	*Hypocnemis hypoxantha*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA026-07	LGEMA-348	746	*Ibycter americanus*	USP	BR	Rondonia		
KBAR563-06	MACN-Or-ct 1516	694	*Icterus cayanensis*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KAARG152-07	MACN-Or-ct 2118	694	*Icterus cayanensis*	MACN	AR	Buenos Aires	-33,73	-59,26
KAARG154-07	MACN-Or-ct 2120	694	*Icterus cayanensis*	MACN	AR	Buenos Aires	-33,73	-59,26
KBAR542-06	MACN-Or-ct 1483	694	*Icterus cayanensis*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR544-06	MACN-Or-ct 1489	694	*Icterus cayanensis*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KAARG558-07	MACN-Or-ct 3171	644	*Icterus cayanensis*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
KAARG562-07	MACN-Or-ct 3175	694	*Icterus cayanensis*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
LGEMA440-08	LGEMA-2779	715	*Icterus cayanensis*	USP	BR	Piauí		
LGEMA263-07	LGEMA-9935	737	*Icterus chrysocephalus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA441-08	LGEMA-2742	732	*Icterus jamacaii*	USP	BR	Piauí		
KAARG126-07	MACN-Or-ct 2076	694	*Ictinia plumbea*	MACN	AR			
KBARG068-07	MACN-Or-ct 1766	694	*Ictinia plumbea*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
KAARG127-07	MACN-Or-ct 2077	694	*Ictinia plumbea*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA023-07	LGEMA-342	735	*Ictinia plumbea*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA334-07	LGEMA-1147	735	*Ilicura militaris*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA279-07	LGEMA-10152	713	*Jacamerops aureus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA224-07	LGEMA-9720	734	*Jacamerops aureus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA148-07	LGEMA-3301	745	*Jacamerops aureus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA443-08	LGEMA-478	684	*Lanio versicolor*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA444-08	LGEMA-557	718	*Laniocera hypopyrra*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA257-07	LGEMA-9906	752	*Laniocera hypopyrra*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA076-07	LGEMA-1365	735	*Lathrotriccus euleri*	USP	BR	Paraná		
LGEMA037-07	LGEMA-404	735	*Lathrotriccus euleri*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA185-07	LGEMA-9610	743	*Legatus leucophaius*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA170-07	LGEMA-9568	750	*Lepidocolaptes albolineatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA445-08	LGEMA-536	700	*Lepidocolaptes angustirostris*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA446-08	LGEMA-2231	716	*Lepidocolaptes angustirostris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA517-08	LGEMA-546	695	*Lepidothrix nattereri*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA518-08	LGEMA-2113	702	*Lepidothrix nattereri*	USP	BR	Pará		
LGEMA521-08	LGEMA-1063	697	*Lepidothrix vilasboasi*	USP	BR	Pará		
KAARG377-07	MACN-Or-ct 2025	694	*Leptopogon amaurocephalus*	MACN	AR	Misiones	-25,85	-53,98
KAARG376-07	MACN-Or-ct 1979	694	*Leptopogon amaurocephalus*	MACN	AR	Misiones	-25,85	-53,98
KBARG386-07	MACN-Or-ct 2935	694	*Leptopogon amaurocephalus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG414-07	MACN-Or-ct 2943	694	*Leptopogon amaurocephalus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG417-07	MACN-Or-ct 2963	694	*Leptopogon amaurocephalus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG139-07	MACN-Or-ct 1983	694	*Leptopogon amaurocephalus*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
LGEMA321-07	LGEMA-10338	700	*Leptopogon amaurocephalus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA326-07	LGEMA-10540	731	*Leucopternis albicollis*	USP	BR	Pará		
LGEMA033-07	LGEMA-364	735	*Leucopternis kuhli*	USP	BR	Pará		
LGEMA018-07	LGEMA-258	735	*Leucopternis lacernulatus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA065-07	LGEMA-608	702	*Lipaugus vociferans*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA447-08	LGEMA-9671	712	*Lipaugus vociferans*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA448-08	LGEMA-2149	717	*Lochmias nematura*	USP	BR	Santa Catarina		
NPARR164-07	LGEMA-9411	834	*Lorius garrulus*	USP				
NPARR163-07	LGEMA-3907	863	*Lorius garrulus*	USP				
LGEMA184-07	LGEMA-9603	738	*Lurocalis semitorquatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA335-07	LGEMA-1174	735	*Mackenziaena severa*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA261-07	LGEMA-9932	750	*Malacoptila fusca*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA147-07	LGEMA-3300	698	*Malacoptila rufa*	USP	BR	Mato Grosso	-12,85	-58,93
LGEMA449-08	LGEMA-3299	700	*Malacoptila rufa*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA286-07	LGEMA-10189	730	*Malacoptila rufa*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA143-07	LGEMA-3290	731	*Malacoptila rufa*	USP	BR	Mato Grosso	-10,17	-59,46
LGEMA150-07	LGEMA-3516	737	*Malacoptila striata*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA093-07	LGEMA 2077	695	*Manacus manacus*	USP	BR			
LGEMA316-07	LGEMA-10327	740	*Manacus manacus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA118-07	LGEMA-2767	752	*Megarynchus pitangua*	USP	BR	Piauí		
LGEMA303-07	LGEMA-10247	734	*Megascops atricapilla*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA231-07	LGEMA-9765	731	*Megascops choliba*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA159-07	LGEMA-9532	739	*Megascops choliba*	USP	BR	São Paulo		

LGEMA166-07	LGEMA-9562	743	*Megastictus margaritatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA113-07	LGEMA-2745	732	*Megaxenops parnaguae*	USP	BR	Piauí		
LGEMA262-07	LGEMA-9933	735	*Melanerpes cruentatus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA056-07	LGEMA-504	727	*Melanopareia torquata*	USP	BR	Mato Grosso		
NPARR166-07	LGEMA-9412	674	*Melopsittacus undulatus*	USP				
NPARR165-07	LGEMA-8631	832	*Melopsittacus undulatus*	USP				
NPARR167-07	LGEMA-9413	838	*Melopsittacus undulatus*	USP				
LGEMA451-08	LGEMA-350	706	*Micrastur gilvicollis*	USP	BR	Rondonia		
LGEMA450-08	LGEMA-234	713	*Micrastur gilvicollis*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA034-07	LGEMA-365	730	*Micrastur gilvicollis*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA452-08	LGEMA-345	711	*Micrastur ruficollis*	USP	BR	Pará		
LGEMA453-08	LGEMA-356	711	*Micrastur ruficollis*	USP	BR	Piauí		
LGEMA024-07	LGEMA-343	731	*Micrastur ruficollis*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA030-07	LGEMA-358	733	*Micrastur semitorquatus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA179-07	LGEMA-9591	731	*Microbates collaris*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA454-08	LGEMA-10015	715	*Microcerculus bambla*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA053-07	LGEMA-486	702	*Microcerculus marginatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA294-07	LGEMA-10207	731	*Microcerculus marginatus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
KBAR850-06	MACN-Or-ct 1607	673	*Milvago chimachima*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
KBAR821-06	MACN-Or-ct 1566	674	*Milvago chimachima*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR865-06	MACN-Or-ct 1628	676	*Milvago chimachima*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR864-06	MACN-Or-ct 1627	674	*Milvago chimachima*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA029-07	LGEMA-352	753	*Milvago chimachima*	USP	BR	Piauí		
KBAR386-06	MACN-Or-ct 256	694	*Mimus saturninus*	MACN	AR		-34,60	-58,44
KBAR387-06	MACN-Or-ct 268	694	*Mimus saturninus*	MACN	AR		-34,60	-58,44
KBAR518-06	MACN-Or-ct 1439	694	*Mimus saturninus*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR510-06	MACN-Or-ct 1422	694	*Mimus saturninus*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR367-06	MACN-Or-ct 036	694	*Mimus saturninus*	MACN	AR	Buenos Aires	-40,58	-62,68
KAARG181-07	MACN-Or-ct 2148	694	*Mimus saturninus*	MACN	AR	Buenos Aires	-33,89	-59,35
LGEMA075-07	LGEMA-1361	727	*Mimus saturninus*	USP	BR	Paraná		
LGEMA086-07	LGEMA-1647	751	*Mionectes macconnelli*	USP	BR	Pará	-2,53	-48,75
LGEMA455-08	LGEMA-9885	716	*Mionectes oleagineus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA238-07	LGEMA-9800	721	*Mionectes oleagineus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA458-08	LGEMA-9965	730	*Mionectes oleagineus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA085-07	LGEMA-1646	740	*Mionectes oleagineus*	USP	BR	Pará	-2,95	-48,95
LGEMA275-07	LGEMA-10062	744	*Mitu tomentosum*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA284-07	LGEMA-10183	718	*Momotus momota*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA459-08	LGEMA-3297	607	*Monasa morphoeus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA461-08	LGEMA-9860	683	*Monasa morphoeus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA460-08	LGEMA-3428	730	*Monasa morphoeus*	USP				
LGEMA149-07	LGEMA-3306	742	*Monasa morphoeus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA212-07	LGEMA-9667	746	*Monasa morphoeus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA204-07	LGEMA-9644	743	*Monasa nigrifrons*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA227-07	LGEMA-9750	732	*Myiarchus ferox*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA127-07	LGEMA-2986	731	*Myiarchus swainsoni*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA116-07	LGEMA-2752	755	*Myiarchus tyrannulus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA470-08	LGEMA-2797	676	*Myiobius atricaudus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA465-08	LGEMA-2410	713	*Myiobius atricaudus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA122-07	LGEMA-2816	750	*Myiobius atricaudus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA468-08	LGEMA-2628	628	*Myiobius barbatus*	USP	BR	Bahia	-12,55	-41,36
LGEMA466-08	LGEMA-399	688	*Myiobius barbatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA322-07	LGEMA-10339	730	*Myiobius barbatus*	USP	BR	São Paulo	-23,80	-45,98
LGEMA314-07	LGEMA-10323	731	*Myiobius barbatus*	USP	BR	São Paulo	-23,80	-45,98
KBAR147-06	MACN-Or-ct 1119	694	*Myiodynastes maculatus*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
KBAR149-06	MACN-Or-ct 903	694	*Myiodynastes maculatus*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
KBAR343-06	MACN-Or-ct 977	694	*Myiodynastes maculatus*	MACN	AR	Jujuy	-24,12	-64,45
KBARG028-07	MACN-Or-ct 1787	694	*Myiodynastes maculatus*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
KBARG052-07	MACN-Or-ct 1803	693	*Myiodynastes maculatus*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
LGEMA125-07	LGEMA-2841	723	*Myiodynastes maculatus*	USP	BR	Piauí		
NPARR332-08	LGEMA-9502	664	*Myiopsitta luchsi*	USP				
NPARR169-07	LGEMA-9512	713	*Myiopsitta luchsi*	USP				
NPARR168-07	LGEMA-9511	727	*Myiopsitta luchsi*	USP				
NPARR292-08	LGEMA-8307	668	*Myiopsitta monachus*	USP				
NPARR172-07	LGEMA-6453	696	*Myiopsitta monachus*	USP				

NPARR171-07	LGEMA-5369	834	*Myiopsitta monachus*	USP				
LGEMA045-07	LGEMA-436	732	*Myiornis ecaudatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA044-07	LGEMA-435	730	*Myiozetetes luteiventris*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA472-08	LGEMA-10019	731	*Myrmeciza atrothorax*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA057-07	LGEMA-516	735	*Myrmeciza atrothorax*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA473-08	LGEMA-515	674	*Myrmeciza hemimelaena*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA317-07	LGEMA-10328	707	*Myrmeciza squamosa*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA474-08	LGEMA-589	702	*Myrmoborus myotherinus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA177-07	LGEMA-9587	751	*Myrmoborus myotherinus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA475-08	LGEMA-2782	738	*Myrmorchilus strigilatus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA047-07	LGEMA-463	702	*Myrmornis torquata*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA477-08	LGEMA-3234	707	*Myrmotherula axillaris*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA281-07	LGEMA-10154	716	*Myrmotherula axillaris*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA274-07	LGEMA-10024	742	*Myrmotherula axillaris*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA478-08	LGEMA-1146	701	*Myrmotherula gularis*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA249-07	LGEMA-9866	737	*Myrmotherula haematonota*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA479-08	LGEMA-451	707	*Myrmotherula hauxwelli*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA344-08	LGEMA-10169	739	*Myrmotherula hauxwelli*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA480-08	LGEMA-448	702	*Myrmotherula leucophthalma*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA064-07	LGEMA-582	683	*Myrmotherula longipennis*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA481-08	LGEMA-9590	715	*Myrmotherula longipennis*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA282-07	LGEMA-10167	740	*Myrmotherula menetriesii*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA315-07	LGEMA-10324	719	*Myrmotherula unicolor*	USP	BR	São Paulo		
NPARR173-07	LGEMA-3775	826	*Nandayus nenday*	USP				
NPARR174-07	LGEMA-4009	864	*Nandayus nenday*	USP				
NPARR175-07	LGEMA-9123	817	*Nannopsittaca dachilleae*	USP	BR	Acre	-7,45	-73,63
NPARR176-07	LGEMA-9124	851	*Nannopsittaca dachilleae*	USP	BR	Acre	-7,45	-73,63
LGEMA195-07	LGEMA-9626	733	*Nasica longirostris*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA482-08	LGEMA-2786	717	*Nemosia pileata*	USP	BR	Piauí		
LGEMA486-08	LGEMA-97	698	*Nyctibius griseus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA299-07	LGEMA-10237	719	*Nyctibius griseus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA488-08	LGEMA-9601	682	*Nyctidromus albicollis*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA230-07	LGEMA-9754	726	*Nyctiprogne leucopyga*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
NPARR001-07	LGEMA-6401	843	*Nymphicus hollandicus*	USP				
NPARR002-07	LGEMA-8788	849	*Nymphicus hollandicus*	USP				
KAARG393-07	MACN-Or-cp 9	567	*Nystalus chacuru*	MACN	AR	Misiones	-27,46	-55,74
LGEMA489-08	LGEMA-3549	730	*Nystalus chacuru*	USP				
LGEMA153-07	LGEMA-3603	728	*Nystalus maculatus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA285-07	LGEMA-10187	730	*Nystalus striolatus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA254-07	LGEMA-9889	733	*Odontophorus gujanensis*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA490-08	LGEMA-3244	690	*Onychorhynchus coronatus*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA289-07	LGEMA-10198	736	*Onychorhynchus coronatus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
NPARR293-08	LGEMA-5484	770	*Orthopsittaca manilata*	USP				
NPARR410-09	MPEG-60456	842	*Orthopsittaca manilata*	MPEG	BR	Acre	-9,41	-68,36
NPARR177-07	LGEMA-6015	851	*Orthopsittaca manilata*	USP				
NPARR408-09	MPEG-57514	861	*Orthopsittaca manilata*	MPEG	BR	Amazonas	-8,59	-61,55
NPARR409-09	MPEG-57515	871	*Orthopsittaca manilata*	MPEG	BR	Amazonas	-8,59	-61,55
NPARR294-08	LGEMA-7186	872	*Orthopsittaca manilata*	USP				
LGEMA130-07	LGEMA-3000	734	*Pachyramphus polychopterus*	USP	BR	São Paulo		
KAARG277-07	MACN-Or-ct 2368	694	*Pachyramphus viridis*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KAARG608-07	MACN-Or-ct 3239	677	*Pachyramphus viridis*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
LGEMA492-08	LGEMA-2833	686	*Pachyramphus viridis*	USP	BR	Piauí		
KAARG573-07	MACN-Or-ct 3189	675	*Paroaria coronata*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
KBAR775-06	MACN-Or-ct 1418	694	*Paroaria coronata*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR799-06	MACN-Or-ct 1490	694	*Paroaria coronata*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR755-06	MACN-Or-ct 1353	694	*Paroaria coronata*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KAARG572-07	MACN-Or-ct 3188	659	*Paroaria coronata*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
LGEMA493-08	LGEMA-2183	684	*Paroaria coronata*	USP	BR	Rio Grande do Sul		
LGEMA101-07	LGEMA-2600	703	*Paroaria dominicana*	USP	BR	Piauí	-10,31	-44,70
LGEMA495-08	LGEMA-2614	705	*Paroaria dominicana*	USP	BR	Pernambuco	-7,79	-40,28
LGEMA494-08	LGEMA-2586	735	*Paroaria dominicana*	USP	BR	Bahia	-12,50	-41,18
LGEMA256-07	LGEMA-9904	735	*Penelope jacquacu*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
KBAR169-06	MACN-Or-ct 998	645	*Phaeomyias murina*	MACN	AR	Jujuy	-24,02	-64,25
KBAR156-06	MACN-Or-ct 795	644	*Phaeomyias murina*	MACN	AR	Jujuy	-24,02	-64,25

LGEMA496-08	LGEMA-2575	730	*Phaeomyias murina*	USP	BR	Piauí		
KBARG400-07	MACN-Or-ct 2970	694	*Phaethornis eurynome*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG410-07	MACN-Or-ct 2941	694	*Phaethornis eurynome*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA497-08	LGEMA-40	686	*Phaethornis eurynome*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA502-08	LGEMA-84	699	*Phaethornis malaris*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA503-08	LGEMA-82	700	*Phaethornis nattereri*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA498-08	LGEMA-9797	657	*Phaethornis ruber*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA292-07	LGEMA-10204	730	*Phaethornis ruber*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA253-07	LGEMA-9884	751	*Phaethornis ruber*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA500-08	LGEMA-22	686	*Phaethornis superciliosus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA501-08	LGEMA-29	686	*Phaethornis superciliosus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA272-07	LGEMA-10002	716	*Phaethornis superciliosus*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA001-07	LGEMA-19	724	*Phaethornis superciliosus*	USP	BR	Mato Grosso	-10,01	-51,11
KBARG356-07	MACN-Or-ct 2847	694	*Philydor atricapillus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG397-07	MACN-Or-ct 2955	694	*Philydor atricapillus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA508-08	LGEMA-2418	729	*Philydor atricapillus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA504-08	LGEMA-568	698	*Philydor erythrocercum*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA505-08	LGEMA-497	701	*Philydor ruficaudatum*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA182-07	LGEMA-9598	746	*Phlegopsis erythroptera*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA506-08	LGEMA-518	691	*Phlegopsis nigromaculata*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA507-08	LGEMA-2116	716	*Phlegopsis nigromaculata*	USP	BR	Pará		
LGEMA186-07	LGEMA-9612	725	*Phoenicircus nigricollis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA510-08	LGEMA-2446	709	*Phyllomyias fasciatus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA167-07	LGEMA-9564	750	*Phyllomyias griseiceps*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
KBAR161-06	MACN-Or-ct 981	694	*Phylloscartes ventralis*	MACN	AR	Jujuy	-24,12	-64,46
LGEMA511-08	LGEMA-2176	733	*Phylloscartes ventralis*	USP	BR	Rio Grande do Sul	-31,37	-52,38
LGEMA513-08	LGEMA-219	705	*Piaya cayana*	USP	BR	Piauí		
LGEMA512-08	LGEMA-212	711	*Piaya cayana*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA514-08	LGEMA-211	711	*Piaya melanogaster*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA211-07	LGEMA-9666	750	*Piaya melanogaster*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
KAARG281-07	MACN-Or-ct 2372	694	*Piculus chrysochloros*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBARG142-07	MACN-Or-ct 1825	680	*Piculus chrysochloros*	MACN	AR	Corrientes	-27,92	-59,14
KBAR512-06	MACN-Or-ct 1427	694	*Piculus chrysochloros*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA157-07	LGEMA-3614	753	*Piculus chrysochloros*	USP	BR	Piauí		
LGEMA515-08	LGEMA-9856	705	*Piculus flavigula*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA200-07	LGEMA-9638	774	*Picumnus lafresnayi*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA152-07	LGEMA-3601	708	*Picumnus pygmaeus*	USP	BR	Piauí		
KBARG311-07	MACN-Or-ct 2919	657	*Picumnus temminckii*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG178-07	MACN-Or-ct 2038	694	*Picumnus temminckii*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
LGEMA516-08	LGEMA-3531	719	*Picumnus temminckii*	USP	BR	Pará		
NPARR181-07	LGEMA-8467	730	*Pionites leucogaster*	USP				
NPARR180-07	LGEMA-8466	732	*Pionites leucogaster*	USP				
NPARR416-09	MPEG-63620	778	*Pionites leucogaster*	MPEG	BR	Acre	-9,88	-67,69
NPARR415-09	MPEG-61551	812	*Pionites leucogaster*	MPEG	BR	Mato Grosso	-12,88	-52,37
NPARR413-09	MPEG-58287	839	*Pionites leucogaster*	MPEG	BR	Amazonas	-4,90	-65,11
NPARR417-09	MPEG-63688	840	*Pionites leucogaster*	MPEG	BR	Acre	-8,55	-70,61
NPARR414-09	MPEG-60094	844	*Pionites leucogaster*	MPEG	BR	Amazonas	-4,63	-68,29
NPARR412-09	MPEG-ACTA001	855	*Pionites leucogaster*	MPEG	BR	Pará	-2,72	-48,42
NPARR156-07	LGEMA-9861	709	*Pionites melanocephalus*	USP	BR	Amazonas		
NPARR441-09	LGEMA-9978	716	*Pionites melanocephalus*	USP	BR	Amazonas		
NPARR182-07	LGEMA-4515	813	*Pionites melanocephalus*	USP				
NPARR183-07	LGEMA-4517	839	*Pionites melanocephalus*	USP				
NPARR418-09	MPEG-62413	846	*Pionites melanocephalus*	MPEG	BR	Amazonas	-2,20	-67,38
NPARR419-09	MPEG-62409	852	*Pionites melanocephalus*	MPEG	BR	Amazonas	-1,83	-66,65
NPARR420-09	MPEG-66408	854	*Pionites melanocephalus*	MPEG	BR	Pará	-0,93	-53,23
NPARR295-08	LGEMA-6581	838	*Pionopsitta aurantiocephala*	USP				
NPARR185-07	LGEMA-6575	865	*Pionopsitta aurantiocephala*	USP	BR	Pará	-8,92	-56,59
NPARR404-09	MPEG-65599	871	*Pionopsitta aurantiocephala*	MPEG	BR	Pará	-5,20	-57,57
NPARR422-09	MPEG-58660	834	*Pionopsitta barrabandi*	MPEG	BR	Amazonas	-7,47	-62,93
NPARR406-09	MPEG-62419	859	*Pionopsitta barrabandi*	MPEG	BR	Amazonas	-1,83	-66,65
NPARR421-09	MPEG-58659	859	*Pionopsitta barrabandi*	MPEG	BR	Amazonas	-7,47	-62,82
NPARR405-09	MPEG-62418	874	*Pionopsitta barrabandi*	MPEG	BR	Amazonas	-1,83	-66,65
NPARR407-09	MPEG-65730	872	*Pionopsitta caica*	MPEG	BR	Pará	-1,28	-58,68
NPARR193-07	LGEMA-7098	701	*Pionopsitta pileata*	USP				

NPARR194-07	LGEMA-7099	824	*Pionopsitta pileata*	USP				
NPARR296-08	LGEMA-7486	886	*Pionopsitta pileata*	USP				
NPARR298-08	LGEMA-8309	675	*Pionus fuscus*	USP				
NPARR297-08	LGEMA-7777	762	*Pionus fuscus*	USP				
NPARR424-09	MPEG-66407	851	*Pionus fuscus*	MPEG	BR	Pará	-0,93	-53,23
NPARR423-09	MPEG-65341	861	*Pionus fuscus*	MPEG	BR	Pará	-0,15	-55,18
NPARR425-09	MPEG-66173	862	*Pionus fuscus*	MPEG	BR	Pará	-0,82	-53,92
NPARR204-07	LGEMA-4853	825	*Pionus maximiliani*	USP				
NPARR203-07	LGEMA-4851	853	*Pionus maximiliani*	USP				
NPARR299-08	LGEMA-8194	687	*Pionus menstruus*	USP				
NPARR427-09	MPEG-60459	746	*Pionus menstruus*	MPEG	BR	Acre	-9,90	-67,24
NPARR432-09	MPEG-66171	856	*Pionus menstruus*	MPEG	BR	Pará	0,82	-53,92
NPARR431-09	MPEG-63689	860	*Pionus menstruus*	MPEG	BR	Acre	-8,55	-70,61
NPARR426-09	MPEG-58661	860	*Pionus menstruus*	MPEG	BR	Amazonas	-7,47	-62,93
NPARR430-09	MPEG-64422	863	*Pionus menstruus*	MPEG	BR	Acre	-10,67	-67,96
NPARR207-07	LGEMA-9026	718	*Pionus senilis*	USP				
NPARR208-07	LGEMA-9027	742	*Pionus senilis*	USP				
LGEMA339-07	LGEMA-9604	738	*Pipra cornuta*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA250-07	LGEMA-9874	743	*Pipra erythrocephala*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
KAARG538-07	MACN-Or-ct 3041	694	*Pipra fasciicauda*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG406-07	MACN-Or-ct 2940	694	*Pipra fasciicauda*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG306-07	MACN-Or-ct 2868	694	*Pipra fasciicauda*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA060-07	LGEMA-533	734	*Pipra fasciicauda*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA520-08	LGEMA-473	702	*Pipra rubrocapilla*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA522-08	LGEMA-476	702	*Piprites chloris*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA049-07	LGEMA-475	727	*Piprites chloris*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA216-07	LGEMA-9683	742	*Piprites chloris*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
KAARG177-07	MACN-Or-ct 2144	694	*Piranga flava*	MACN	AR	Buenos Aires	-33,73	-59,26
LGEMA523-08	LGEMA-2795	729	*Piranga flava*	USP	BR	Piauí		
LGEMA300-07	LGEMA-10240	726	*Pitangus sulphuratus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA097-07	LGEMA-2212	739	*Pitangus sulphuratus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA172-07	LGEMA-9573	717	*Pithys albifrons*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA183-07	LGEMA-9599	760	*Pithys albifrons*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA088-07	LGEMA-1755	701	*Platyrinchus mystaceus*	USP	BR	Rio de Janeiro		
LGEMA526-08	LGEMA-558	680	*Platyrinchus saturatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA571-08	LGEMA-1161	701	*Poecilotriccus plumbeiceps*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA416-08	LGEMA-2124	688	*Poecilotriccus senex*	USP	BR	Pará		
LGEMA527-08	LGEMA-2115	711	*Polioptila guianensis*	USP	BR	Pará		
LGEMA528-08	LGEMA-2721	706	*Polioptila plumbea*	USP	BR	Piauí		
LGEMA010-07	LGEMA-68	735	*Polyerata fimbriata*	USP	BR	Piauí		
NPARR209-07	LGEMA-3899	848	*Polytelis swainsonii*	USP				
NPARR210-07	LGEMA-3902	857	*Polytelis swainsonii*	USP				
LGEMA529-08	LGEMA-2175	701	*Poospiza lateralis*	USP	BR	Rio Grande do Sul	-31,37	-52,38
NPARR211-07	LGEMA-5374	833	*Primolius auricollis*	USP				
NPARR212-07	LGEMA-5977	879	*Primolius auricollis*	USP				
NPARR300-08	LGEMA-6774	762	*Primolius couloni*	USP				
NPARR301-08	LGEMA-4922	608	*Primolius maracana*	USP				
NPARR215-07	LGEMA-8188	834	*Primolius maracana*	USP				
NPARR216-07	LGEMA-8221	839	*Primolius maracana*	USP				
LGEMA222-07	LGEMA-9707	725	*Progne tapera*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA210-07	LGEMA-9665	705	*Psarocolius viridis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA531-08	LGEMA-2991	582	*Psilorhamphus guttatus*	USP	BR	São Paulo		
NPARR218-07	LGEMA-8148	711	*Psittacula krameri*	USP				
NPARR217-07	LGEMA-8147	842	*Psittacula krameri*	USP				
NPARR219-07	LGEMA-6293	848	*Psittacus erithacus*	USP				
NPARR220-07	LGEMA-8366	859	*Psittacus erithacus*	USP				
LGEMA247-07	LGEMA-9862	730	*Psophia leucoptera*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA144-07	LGEMA-3291	697	*Pteroglossus bitorquatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA343-08	LGEMA-10186	716	*Pteroglossus bitorquatus*	USP	BR	Pará	-2,62	-48,78
LGEMA532-08	LGEMA-3252	731	*Pyriglena leuconota*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA141-07	LGEMA-3270	750	*Pyriglena leuconota*	USP	BR	Pará		
LGEMA092-07	LGEMA-2071	735	*Pyriglena leucoptera*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA073-07	LGEMA-1354	743	*Pyrrhocoma ruficeps*	USP	BR	Paraná		
NPARR227-07	LGEMA-8857	711	*Pyrrhura griseipectus*	USP				

NPARR235-07	LGEMA-8536	736	*Pyrrhura pfrimeri*	USP				
NPARR236-07	LGEMA-8537	746	*Pyrrhura pfrimeri*	USP				
NPARR222-07	LGEMA-7498	633	*Pyrrhura cruentata*	USP				
NPARR221-07	LGEMA-7497	734	*Pyrrhura cruentata*	USP				
NPARR223-07	LGEMA-4043	771	*Pyrrhura egregia*	USP				
NPARR224-07	LGEMA-4044	798	*Pyrrhura egregia*	USP				
NPARR225-07	LGEMA-8648	731	*Pyrrhura frontalis*	USP				
NPARR226-07	LGEMA-8660	732	*Pyrrhura frontalis*	USP				
NPARR433-09	MPEG-61676	731	*Pyrrhura lepida*	MPEG	BR	Pará	-1,95	-51,60
NPARR228-07	LGEMA-7553	819	*Pyrrhura leucotis*	USP				
NPARR230-07	LGEMA-7096	823	*Pyrrhura leucotis*	USP				
NPARR229-07	LGEMA-8151	828	*Pyrrhura leucotis*	USP				
NPARR302-08	LGEMA-6005	845	*Pyrrhura leucotis*	USP				
NPARR303-08	LGEMA-9905	705	*Pyrrhura melanura*	USP	BR	Amazonas		
NPARR434-09	MPEG-62407	853	*Pyrrhura melanura*	MPEG	BR	Amazonas	-1,65	-66,00
NPARR233-07	LGEMA-8591	686	*Pyrrhura perlata*	USP				
NPARR234-07	LGEMA-8592	735	*Pyrrhura perlata*	USP				
NPARR348-09	LGEMA-7529	870	*Pyrrhura perlata*	USP				
NPARR353-09	LGEMA-8836	870	*Pyrrhura perlata*	USP				
NPARR304-08	LGEMA-6566	766	*Pyrrhura picta*	USP	BR	Pará		
NPARR436-09	MPEG-55587	804	*Pyrrhura picta*	MPEG	BR	Pará	-3,65	-51,86
NPARR305-08	LGEMA-6564	820	*Pyrrhura picta*	USP	BR	Mato Grosso		
NPARR435-09	MPEG-57513	852	*Pyrrhura picta*	MPEG	BR	Amazonas	-8,72	-61,48
NPARR239-07	LGEMA-7506	666	*Pyrrhura rhodocephala*	USP				
NPARR306-08	LGEMA-7499	688	*Pyrrhura rhodocephala*	USP				
NPARR439-09	MPEG-61993	855	*Pyrrhura roseifrons*	MPEG	BR	Acre	-7,58	-72,99
NPARR438-09	MPEG-60093	872	*Pyrrhura roseifrons*	MPEG	BR	Amazonas	-4,93	-68,17
NPARR440-09	MPEG-58825	817	*Pyrrhura rupicola*	MPEG	BR	Acre	-11,06	-70,22
LGEMA297-07	LGEMA-10225	768	*Querula purpurata*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA145-07	LGEMA-3292	730	*Ramphastos vitellinus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA533-08	LGEMA-10320	719	*Ramphodon naevius*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA534-08	LGEMA-2110	702	*Rhegmatorhina sp.*	USP	BR	Pará		
NPARR242-07	LGEMA-8869	763	*Rhynchopsitta pachyrhyncha*	USP				
NPARR241-07	LGEMA-8868	840	*Rhynchopsitta pachyrhyncha*	USP				
NPARR243-07	LGEMA-8870	698	*Rhynchopsitta terrisi*	USP				
NPARR244-07	LGEMA-8871	719	*Rhynchopsitta terrisi*	USP				
LGEMA535-08	LGEMA-562	703	*Rhytipterna simplex*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA046-07	LGEMA-437	732	*Rhytipterna simplex*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA298-07	LGEMA-10234	757	*Saltator grossus*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA140-07	LGEMA-3265	744	*Saltator maximus*	USP	BR	Tocantins		
LGEMA260-07	LGEMA-9925	761	*Saltator maximus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA538-08	LGEMA-354	710	*Sarcoramphus papa*	USP	BR	Piauí		
LGEMA061-07	LGEMA-547	719	*Schiffornis turdina*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA205-07	LGEMA-9645	761	*Schiffornis turdina*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
KBARG185-07	MACN-Or-ct 1960	694	*Schiffornis virescens*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
KBARG412-07	MACN-Or-ct 2973	694	*Schiffornis virescens*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG388-07	MACN-Or-ct 2967	694	*Schiffornis virescens*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA539-08	LGEMA-2084	682	*Schiffornis virescens*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA540-08	LGEMA-494	702	*Sclerurus rufigularis*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA542-08	LGEMA-2706	621	*Sittasomus griseicapillus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA541-08	LGEMA-2064	706	*Sittasomus griseicapillus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA544-08	LGEMA-442	690	*Skutchia borbae*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA543-08	LGEMA-500	698	*Skutchia borbae*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA129-07	LGEMA-2997	733	*Sporophila bouvreuil*	USP	BR	São Paulo		
KAARG372-07	MACN-Or-ct 3232	694	*Sporophila caerulescens*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,17
KAARG368-07	MACN-Or-ct 3211	694	*Sporophila caerulescens*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,17
KAARG366-07	MACN-Or-ct 3192	694	*Sporophila caerulescens*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,17
KBAR578-06	MACN-Or-ct 1535	694	*Sporophila caerulescens*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR527-06	MACN-Or-ct 1462	694	*Sporophila caerulescens*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR481-06	MACN-Or-ct 1358	694	*Sporophila caerulescens*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA545-08	LGEMA-2408	736	*Sporophila caerulescens*	USP	BR	São Paulo		
KBAR908-06	MACN-Or-ct 1682	664	*Sporophila collaris*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
KAARG365-07	MACN-Or-ct 3185	694	*Sporophila collaris*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,17
KAARG367-07	MACN-Or-ct 3202	694	*Sporophila collaris*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,17

KBAR911-06	MACN-Or-ct 1685	694	*Sporophila collaris*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
KBAR909-06	MACN-Or-ct 1683	694	*Sporophila collaris*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
LGEMA546-08	LGEMA-3001	715	*Sporophila collaris*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA102-07	LGEMA-2687	750	*Sporophila lineola*	USP	BR	Piauí		
LGEMA310-07	LGEMA-10302	719	*Sporophila nigricollis*	USP	BR	Minas Gerais	-19,59	-44,60
LGEMA103-07	LGEMA-2688	729	*Sporophila nigricollis*	USP	BR	Piauí		
KBARG369-07	MACN-Or-ct 2896	680	*Stephanoxis lalandi*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA548-08	LGEMA-65	699	*Stephanoxis lalandi*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA291-07	LGEMA-10202	729	*Synallaxis gujanensis*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA090-07	LGEMA-2054	733	*Synallaxis ruficapilla*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA549-08	LGEMA-495	701	*Synallaxis rutilans*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA270-07	LGEMA-9994	736	*Synallaxis rutilans*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA063-07	LGEMA-564	737	*Synallaxis rutilans*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA131-07	LGEMA-3230	754	*Synallaxis rutilans*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA115-07	LGEMA-2751	756	*Synallaxis scutata*	USP	BR	Piauí		
KBARG155-07	MACN-Or-ct 1990	694	*Syndactyla rufosuperciliata*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
KBAR075-06	MACN-Or-ct 1116	694	*Syndactyla rufosuperciliata*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
KBAR330-06	MACN-Or-ct 894	694	*Syndactyla rufosuperciliata*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
KBAR889-06	MACN-Or-ct 1659	694	*Syndactyla rufosuperciliata*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR077-06	MACN-Or-ct 724	694	*Syndactyla rufosuperciliata*	MACN	AR	Jujuy	-24,12	-64,45
LGEMA133-07	LGEMA-10581	737	*Syndactyla rufosuperciliata*	USP	BR			
LGEMA245-07	LGEMA-9837	734	*Tachycineta albiventer*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
KBARG283-07	MACN-Or-ct 2864	694	*Tachyphonus coronatus*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG170-07	MACN-Or-ct 1952	694	*Tachyphonus coronatus*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
LGEMA079-07	LGEMA-1400	721	*Tachyphonus coronatus*	USP	Argentina	Misiones		
LGEMA198-07	LGEMA-9633	738	*Tachyphonus cristatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA243-07	LGEMA-9817	676	*Tachyphonus surinamus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA139-07	LGEMA-3258	758	*Taeniotriccus andrei*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA551-08	LGEMA-2406	685	*Tangara seledon*	USP	BR	São Paulo		
KAARG547-07	MACN-Or-ct 3156	669	*Taraba major*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
KAARG584-07	MACN-Or-ct 3203	670	*Taraba major*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
KAARG598-07	MACN-Or-ct 3226	649	*Taraba major*	MACN	AR	Formosa	-25,12	-58,33
LGEMA552-08	LGEMA-2835	711	*Taraba major*	USP	BR	Piauí		
LGEMA553-08	LGEMA-434	712	*Terenotriccus erythrurus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA264-07	LGEMA-9967	750	*Terenotriccus erythrurus*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA557-08	LGEMA-10214	616	*Thalurania furcata*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA556-08	LGEMA-10213	664	*Thalurania furcata*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA554-08	LGEMA-32	711	*Thalurania furcata*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA003-07	LGEMA-33	738	*Thalurania furcata*	USP	BR	Mato Grosso	-15,23	-59,34
LGEMA295-07	LGEMA-10216	740	*Thalurania furcata*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
KBARG362-07	MACN-Or-ct 2881	669	*Thalurania glaucopis*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG321-07	MACN-Or-ct 2889	694	*Thalurania glaucopis*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG344-07	MACN-Or-ct 2907	694	*Thalurania glaucopis*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA004-07	LGEMA-38	762	*Thalurania glaucopis*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA559-08	LGEMA-9869	635	*Thamnomanes caesius*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA558-08	LGEMA-583	672	*Thamnomanes caesius*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA174-07	LGEMA-9576	716	*Thamnomanes caesius*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA560-08	LGEMA-9959	740	*Thamnomanes caesius*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,93
LGEMA055-07	LGEMA-503	735	*Thamnomanes saturninus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA565-08	LGEMA-10150	698	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA561-08	LGEMA-459	702	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA562-08	LGEMA-588	702	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA278-07	LGEMA-10151	710	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Pará	-2,60	-48,78
LGEMA563-08	LGEMA-9670	726	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA564-08	LGEMA-9998	728	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA338-07	LGEMA-3249	737	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Maranhão	-4,95	-47,50
LGEMA342-08	LGEMA-9895	746	*Thamnophilus aethiops*	USP	BR	Amazonas	-0,98	-62,93
LGEMA217-07	LGEMA-9690	740	*Thamnophilus amazonicus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA110-07	LGEMA-2740	711	*Thamnophilus doliatus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA566-08	LGEMA-9883	719	*Thamnophilus murinus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA330-07	LGEMA-2700	735	*Thamnophilus pelzelni*	USP	BR	Piauí		
LGEMA567-08	LGEMA-2405	655	*Thraupis ornata*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA568-08	LGEMA-2852	700	*Thraupis palmarum*	USP	BR	Piauí		
KAARG095-07	MACN-Or-ct 1918	694	*Thraupis sayaca*	MACN	AR	Entre Rios	-31,82	-58,25

KBAR291-06	MACN-Or-ct 1159	694	*Thraupis sayaca*	MACN	AR	Jujuy	-23,93	-65,22
KBAR626-06	MACN-Or-ct 361	694	*Thraupis sayaca*	MACN	AR	Jujuy	-24,16	-65,32
KBAR770-06	MACN-Or-ct 1394	694	*Thraupis sayaca*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBARG015-07	MACN-Or-ct 1727	694	*Thraupis sayaca*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
LGEMA569-08	LGEMA-2829	739	*Thraupis sayaca*	USP	BR	Piauí		
LGEMA269-07	LGEMA-9982	733	*Thryothorus coraya*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA106-07	LGEMA-2709	640	*Thryothorus longirostris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA318-07	LGEMA-10334	734	*Thryothorus longirostris*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA074-07	LGEMA-1358	744	*Tiaris fuliginosus*	USP	BR	Paraná		
LGEMA276-07	LGEMA-10063	713	*Tinamus major*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA194-07	LGEMA-9623	728	*Tolmomyias assimilis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA043-07	LGEMA-432	735	*Tolmomyias assimilis*	USP	BR	Mato Grosso	-10,17	-59,46
LGEMA208-07	LGEMA-9657	743	*Tolmomyias assimilis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA105-07	LGEMA-2704	563	*Tolmomyias flaviventris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA137-07	LGEMA-3256	736	*Tolmomyias sulphurescens*	USP	BR	Tocantins		
KBARG177-07	MACN-Or-ct 1953	693	*Trichothraupis melanops*	MACN	AR	Misiones	-25,86	-53,98
KBARG324-07	MACN-Or-ct 2843	694	*Trichothraupis melanops*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG284-07	MACN-Or-ct 2851	694	*Trichothraupis melanops*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
LGEMA324-07	LGEMA-10367	731	*Trichothraupis melanops*	USP	AR	Misiones	-25,86	-53,98
NPARR253-07	LGEMA-4048	763	*Triclaria malachitacea*	USP				
NPARR443-09	LGEMA-8149	802	*Triclaria malachitacea*	USP				
NPARR444-09	LGEMA-8150	804	*Triclaria malachitacea*	USP				
NPARR252-07	LGEMA-4047	855	*Triclaria malachitacea*	USP				
LGEMA573-08	LGEMA-9553	680	*Trogon curucui*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA165-07	LGEMA-9561	719	*Trogon curucui*	USP	BR	Piauí	-8,89	-43,46
LGEMA163-07	LGEMA-9554	741	*Trogon curucui*	USP	BR	Mato Grosso	-15,23	-59,34
LGEMA575-08	LGEMA-9555	620	*Trogon melanurus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA267-07	LGEMA-9976	736	*Trogon melanurus*	USP	BR	Amazonas	-0,42	-62,88
LGEMA162-07	LGEMA-9551	752	*Trogon melanurus*	USP	BR	Mato Grosso		
KBARG376-07	MACN-Or-ct 2946	694	*Trogon surrucura*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBARG382-07	MACN-Or-ct 2934	694	*Trogon surrucura*	MACN	AR	Misiones	-25,68	-54,45
KBAR871-06	MACN-Or-ct 1636	694	*Trogon surrucura*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR872-06	MACN-Or-ct 1637	694	*Trogon surrucura*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR929-06	MACN-Or-ct 1705	694	*Trogon surrucura*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA164-07	LGEMA-9558	730	*Trogon surrucura*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA241-07	LGEMA-9813	710	*Trogon violaceus*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA206-07	LGEMA-9649	737	*Trogon viridis*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA161-07	LGEMA-9550	742	*Trogon viridis*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA579-08	LGEMA-2806	693	*Turdus leucomelas*	USP	BR	Piauí		
LGEMA582-08	LGEMA-9783	718	*Turdus leucomelas*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA234-07	LGEMA-9782	725	*Turdus leucomelas*	USP	BR	Amazonas	-0,78	-63,17
LGEMA096-07	LGEMA-2210	735	*Turdus leucomelas*	USP	BR	Piauí	-8,89	-43,46
LGEMA581-08	LGEMA-3264	743	*Turdus leucomelas*	USP	BR	Tocantins		
LGEMA039-07	LGEMA-409	750	*Turdus leucomelas*	USP	BR	Mato Grosso	-22,54	-54,46
LGEMA123-07	LGEMA-2819	725	*Turdus rufiventris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA098-07	LGEMA-2402	737	*Turdus rufiventris*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA036-07	LGEMA-401	752	*Tyranneutes stolzmanni*	USP	BR	Mato Grosso	-22,54	-54,46
LGEMA583-08	LGEMA-10336	728	*Tyrannus melancholicus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA117-07	LGEMA-2753	760	*Tyrannus melancholicus*	USP	BR	Piauí		
KAARG059-07	MACN-Or-ct 1707	694	*Veniliornis passerinus*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
KBAR931-06	MACN-Or-ct 1709	694	*Veniliornis passerinus*	MACN	AR	Corrientes	-27,58	-58,66
KBAR874-06	MACN-Or-ct 1640	694	*Veniliornis passerinus*	MACN	AR	Corrientes	-27,55	-58,68
LGEMA156-07	LGEMA-3608	740	*Veniliornis passerinus*	USP	BR	Piauí		
LGEMA584-08	LGEMA-2978	638	*Vireo olivaceus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA585-08	LGEMA-9578	716	*Vireo olivaceus*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA077-07	LGEMA-1381	717	*Vireo olivaceus*	USP	BR	Paraná	-23,85	-49,80
LGEMA082-07	LGEMA-1587	745	*Vireo olivaceus*	USP	BR	São Paulo	-23,92	-46,67
LGEMA175-07	LGEMA-9577	747	*Vireo olivaceus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA587-08	LGEMA-9624	714	*Xenopipo atronitens*	USP	BR	Amazonas		
LGEMA215-07	LGEMA-9679	758	*Xenops minutus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA588-08	LGEMA-499	696	*Xenops rutilans*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA590-08	LGEMA-2710	695	*Xiphocolaptes falcirostris*	USP	BR	Piauí		
LGEMA188-07	LGEMA-9614	736	*Xipholena punicea*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA041-07	LGEMA-424	735	*Xiphorhynchus elegans*	USP	BR	Mato Grosso		

LGEMA591-08	LGEMA-2654	714	*Xiphorhynchus fuscus*	USP	BR	Bahia	-12,43	-41,36
LGEMA081-07	LGEMA-1580	735	*Xiphorhynchus fuscus*	USP	BR	São Paulo		
LGEMA592-08	LGEMA-431	701	*Xiphorhynchus guttatus*	USP	BR	Mato Grosso		
LGEMA593-08	LGEMA-3248	738	*Xiphorhynchus guttatus*	USP	BR	Maranhão		
LGEMA199-07	LGEMA-9637	749	*Xiphorhynchus guttatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87
LGEMA176-07	LGEMA-9582	738	*Xiphorhynchus ocellatus*	USP	BR	Amazonas	-2,85	-60,87