Juliana Machado Ferreira

Contribuição da Genética de Populações à investigação
sobre o tráfico de fauna no Brasil:

Desenvolvimento de microssatélites e análise da estrutura
genética em *Paroaria dominicana* e *Saltator similis*
(Aves:Passeriformes:Thraupidae)

Contribution of Population Genetics to investigation efforts
on wildlife trafficking in Brazil:

Development of microsatellites and analysis of the genetic
structure of *Paroaria dominicana* e *Saltator similis*
(Aves:Passeriformes:Thraupidae)

São Paulo

Juliana Machado Ferreira

Contribuição da Genética de Populações à investigação
sobre o tráfico de fauna no Brasil:

Desenvolvimento de microssatélites e análise da estrutura
genética em *Paroaria dominicana* e *Saltator similis*
(Aves:Passeriformes:Thraupidae)

Contribution of Population Genetics to investigation efforts
on wildlife trafficking in Brazil:

Development of microsatellites and analysis of the genetic
structure of *Paroaria dominicana* e *Saltator similis*
(Aves:Passeriformes:Thraupidae)

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de Biologia
(Genética).

Orientador: Prof. Dr. João S. Morgante

São Paulo

2012

Ferreira, Juliana Machado
Contribuição da Genética de Populações à
investigação sobre o tráfico de fauna no Brasil:
desenvolvimento de microssatélites e análise
da estrutura genética em *Paroaria*
dominicana e *Saltator similis*
(Aves: Passeriformes: Thraupidae). 186p.

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

1. Microssatélites 2. Tráfico de fauna 3.
Passeriformes 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).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr João Stenghel
Morgante, Orientador

Fotos: Juliana M Ferreira

Dedico este trabalho para o Shanty, para os meus pais, meus avós (*in memoriam*, em especial Vovô Machado, que acho que adoraria ter visto a neta que foi para a área de Biológicas defender o doutorado!), para John Thornton, e para todos os que não se omitem na construção de um mundo melhor.

Tá?

Mariana Aydar

Pra bom entendedor, meia palavra bas-
Eu vou denunciar a sua ação nefas-
Você amarga o mar, desflora a flores-
Por onde você passa, o ar você empes-
Não tem medida a sua ação imediatis-
Não tem limite o seu sonho consumis-
Você deixou na mata uma ferida expos-
Você descora as cores dos corais na cos-
Você aquece a Terra e enriquece à cus-
Do roubo, do futuro e da beleza augus-

Mas do que vale tal riqueza? Grande bos-
Parece que de neto seu você não gos-
Você decreta a morte, a vida indevis-
Você declara guerra à paz por mais bem quis-
Não há em toda fauna um animal tão bes-
Mas já tem gente vendo que você não pres-
Não vou dizer seu nome porque me desgas-
Pra bom entendedor, meia palavra bas-
Não vou dizer seu nome porque me desgas-
Pra bom entendedor, meia palavra bas-
Bom entendedor, meia palavra bas-
Bom entendedor, meia palavra bas-
Pra bom entendedor, meia palavra bas-
Pra bom entendedor, meia palavra bas-
Eu vou denunciar a sua ação nefas-
Você amarga o mar, desflora a flores-
Por onde você passa, o ar você empes-
Não tem medida a sua ação imediatis-
Não tem limite o seu sonho consumis-
Você deixou na mata uma ferida expos-

Você descora as cores do coral na cos-
Você aquece a Terra e enriquece à cus-

Mas do que vale tal riqueza?

Grande bos-

Parece que de neto seu você não gos-

Você decreta a morte, a vida indevis-

Você declara guerra à paz, por mais bem quis-

Não há em toda fauna animal, um tão bes-

Mas já tem gente vendo que você não pres-

Não vou dizer seu nome porque me desgasa-

Pra bom entendedor, meia palavra bas-

Não vou dizer seu nome porque me desgasa-

Pra bom entendedor, meia palavra bas-

Bom entendedor, meia palavra bas-

Bom entendedor, meia palavra bas-

Pra bom entendedor, meia palavra bas-

Tá?

pontocardealsul.blogspot.com.br

Agradecimentos

Este trabalho consistiu de um enorme esforço conjunto. Sem sombra de dúvida não teria chegado até aqui sem a colaboração de inúmeras pessoas e instituições e sem o apoio de amigos muito especiais. Por isso, considero esta uma das seções mais importantes deste trabalho, e aviso, é **longa** (tudo escrito abaixo é imprescindível, não corto de jeito nenhum), informal (porque é quem eu sou) e muito pessoal. Portanto, peço paciência e bom-humor. Se um ou outro estiver faltando, peço gentilmente que pule esta seção e volte outro dia. Espero não deixar ninguém de fora. O agradecimento não está por ordem de importância.

O primeiro agradecimento vai para os financiadores de todo esse projeto e de mim nos últimos quatro anos, sem os quais, definitivamente nada disso teria sido feito: FAPESP (bolsa de doutorado 07/59747-3 e projeto de auxílio 08/52207-0), CAPES (bolsa de doutorado e estágio de doutorando no exterior 3286-08-8) e Neil e Eliana Ferreira.

Agradeço do fundo do meu coração ao Prof. Dr. João S. Morgante, meu orientador desde 2002, meu pai na Ciência e um segundo pai na vida, que abriu as portas do LABEC para que eu pudesse seguir meus sonhos, sempre ensinando a importância da colaboração, do comportamento ético, honesto e firme, da imparcialidade na geração de dados e da atenção ao processo científico. Tudo isso além de ainda consolar os alunos em momentos difíceis, e trazer bolo de laranja da Marlene para levantar os ânimos no laboratório! Sou muito agradecida ao fato do Prof. João ter me dado liberdade e ter considerado importante o meu envolvimento com a sociedade civil e todos os esforços que fizemos juntos para sempre ampliar o diálogo entre sociedade e academia. Devo ao João a pessoa e pesquisadora que sou hoje. Obrigada, chefe!

Meu profundo agradecimento ao Marcelo Pavlenco Rocha e sua família (Andreia, Vitória e Jean) e à SOS Fauna (e seus membros Bruno, Fábio, Paola, Cris, Celso, André, Cinthia, e outros). O Marcelo é a pessoa mais idealista e menos acomodada que conheço. Tornou-se, por suas próprias pernas, uma das maiores autoridades em tráfico de fauna no Brasil, e ainda teve tempo e paciência para me tomar (literalmente) sob suas asas e passar seu conhecimento, acreditando que esse esforço valeria a pena. Através do Marcelo pude ver claramente a situação do tráfico de fauna no Brasil, sem as lentes, mitos ou vícios dos que veem de segunda mão. E esse aprendizado é um caminho sem volta, nunca mais serei a mesma pessoa. Obrigada, Marcelão.

Este trabalho não teria nem começado sem o grande colega e amigo Fábio Schunck, um dos maiores ornitólogos do Brasil e uma das pessoas mais gente fina que eu conheço. O Fábio foi responsável por me ensinar tudo que eu sei sobre trabalho de campo, como montar redes, como tirar aves das redes sem destruí-las (risos), e principalmente, sua generosidade fez com que parasse o seu trabalho e várias vezes fosse para o campo comigo pois sabia o quanto eu estava precisando. Acho que 50% dessa tese são dele!

Agradeço demais à minha co-orientadora e amiga querida Mary Curtis e ao pessoal do *U.S. Fish and Wildlife National Forensics Laboratory* (Andy, Val, Doina, Tom T., grande amigo, Pam, Mike, Brian H., companheiro de laboratório, JoJane,

Brad, Jim L., Jim C., Dyan, Pepper, Darryl, Dinah) por ter me recebido lá desde 2005, me aguentado, se tornado grandes amigos e me ensinado sobre Ciência Forense para crimes contra a vida silvestre e sobre esqui e snowboard (mais risos). Esse aprendizado é único e fez toda a diferença sobre como vejo Ciência aplicada a crimes contra a natureza. Um agradecimento especial ao Ed Espinoza, grande amigo e mentor e ao Ken Goddard, amigão, mentor e *back-up father*. Um agradecimento especial também ao querido Mestre John Thornton, uma das minhas inspirações para este trabalho.

Grande agradecimento às instituições que colaboraram com amostras para este trabalho: Museu do Capão da Imbuía (Dra Lygia, Curitiba, Paraná), Banco de Tecidos do Laboratório de Genética e Ecologia Molecular de Aves da USP (LGEMA, Profa Dra Cris Miyaki), Coleção do Laboratório de Ornitologia e Mastozoologia (LORMA, Universidade Estadual de Feira de Santana, Prof Dr Caio Gracco), Banco de Tecidos do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM, Universidade Federal de Minas Gerais, Prof Dr Fabrício Santos), Museu Nacional (Rio de Janeiro), DEPAVE-3 (divisão de fauna do departamento de parques e áreas verdes do município de São Paulo), SOS Fauna, e, em especial, o Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e o Dr. Luís Fábio Silveira, por ter contribuído com centenas de amostras.

Agradecimento sem fim àqueles que de alguma forma colaboraram com o trabalho de campo para coleta de amostras: Fábio Schunck, pessoal da divisão de fauna do DEPAVE (Mestre Marcos Melo, Juliana Summa, Adriana, Anelisa, Sumiko, Maria Amélia, Sr Nielsen, Cauê, Daniel Perrela) pelas amostras dos animais apreendidos e pelas várias viagens e muita paciência tocando cantos, montando redes e perseguindo esses bichos! Um agradecimento especial à Vilma Clarice Geraldi, diretora do DEPAVE-3, que sempre apoiou a colaboração a este projeto. Érica Pacífico, Juliana Russo e Fundação Biodiversitas (pela minha primeira viagem de campo de verdade, Canudos, Ba), Hotel Morro do Pai Mateus pela acolhida (Cabaceiras, Pb), Sr José Carlos, Cidinha e Valdemar (Fazenda Saco do Céu, MS, pela incrível acolhida), sr Antônio Carlos e família (Campo Grande, MS), sr Pauleca, Paula Vianna, vó e adorável família (pela acolhida e imensa ajuda em Santa Isabel do Rio Preto, RJ), Rosana, Alex e seus pais, Cláudio, Marcelo e D. Yayá, Vital (pessoal da ADAB - Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, que deu a maior força em Vitória da Conquista, Ba), a grande Andréia Lula (IBAMA de Vitória da Conquista, Ba), Sr Valdir (sítio Fatura, Vitória da Conquista, Ba, nos recebeu tão bem), Sr Ferreira (Inhobim, Ba, Faz Casca, também pela carinhosa acolhida), Gláucia Seixas e Lúcia Monteiro (Fundação Neotropica, por toda ajuda em Bonito, MS), os queridos Daniel de Granville e Tietta Pivatto (pela ajuda e incrível acolhida em Bonito, MS), Sr. Eduardo Coelho, Luiza Coelho, Samuel Duleba, Carol Hurt e Foca (das belíssimas Fazendas Estância Mimosa e Rio da Prata, Bonito, MS), Sr João e Fabiano da Pousada Aguapé (Aquidauana, MS, pela disposição em ajudar), Ronald Rosa (ONG Brasil Bonito, MS por fazer de tudo para ajudar), Sr Geraldo (Vale do Taquaral, Bonito, MS, por nos receber muito bem e mostrar um ninho de Harpia!), Vivian (Bion Consultoria, Bonito, MS), Fazenda Quatis (Oriente, Vitória da Conquista, Ba), Sr Udson (Faz Boa Vista, Vitória da Conquista, Ba), Prof Dr Caio Graco, Emília e Cyrio Santana (por toda ajuda – MESMO – em Feira de Santana, Ba), Bruno Lima, pelas conversas sobre pixoxós, Carlos Candia-Gallardo, que só

depois me dei conta que era meu amigão Kiwi, pelas dicas sobre pixoxós, Sidney Florêncio, Manzutti e Luciana, pelas operações junto à Polícia Civil do Estado de São Paulo, Marcelo e Jean Rocha, pelas longas tardes amostrando e anilhando aves na SOS Fauna (Juquitiba, SP, e Andreia e Vitória pelos bolos maravilhosos durante essas tardes!).

Pelas dicas em relação ao trabalho, programas, interpretações, sugestão e discussão de artigos, conversas sem fim, e tardes de descabelo (queria escrever um parágrafo para cada um, mas me dei conta que está ficando longo demais), meu agradecimento eterno aos incríveis: Larissa Rosa de Oliveira, Kelly Nunes, Sofia Marques, Gisele Dantas (por ter lido o trabalho e dado sugestões), Rodrigo Francisco, Camila Clozato, Santa Fernanda Almeida, Márcia Pincerati, Jenny Giles, Fernando Nodari, e um agradecimento especial para o Felipe Martins pela ajuda, apoio e amizade sempre presentes, e para Nádia Moraes Barros, que, por dividir a sala comigo, aguentou todos os meus desesperos, dúvidas e crises com uma paciência e um carinho impressionantes.

Um grande agradecimento ao pessoal das conferências TED pela oportunidade que me foi dada de ir aos incríveis eventos que abrem a cabeça de qualquer um e nos colocam em perspectiva, e pelas bolsas TED Fellow 2009 e TED Senior Fellow 2010-2012. Meu amadurecimento pessoal e profissional foram muito grandes graças a essa experiência.

Muito obrigada aos queridos Helenice, Deisy e Camila, da secretaria de pós-graduação do depto. de Genética e Biologia Evolutiva, e Helder, Vera e Érika, da secretaria de pós do IB, sempre ajudando da forma como podiam.

Obrigada aos amigos da limpeza e manutenção, que sempre deixaram tudo lindo, limpo e funcionando para que tivéssemos as melhores condições de trabalho.

Agradeço muito ao amigo Dalgas Frisch pelo carinho, por me receber tão bem e pelas conversas e livros.

Agradeço aos queridos amigos, companheiros de jornada, que fazem a vida valer a pena: as minhas irmãs por escolha Rafa Nascimento, Julia Cezar, Larissa de Oliveira, Gisele Dantas, Nádia Moraes, Tessa Roorda e Fabi Peçanha. Os amados Márcia Pinceratti, Maria Helena Maia, Rodrigo Latino Francisco, Felipe Martins, Bárbara Xuxu Bitarello, Kelly Nunes, Fezinha Almeida, Sofia Sófis Marques, Camila Lindinha Clozato, Ana Pavan, Asha de Vos, Jenny Giles, Dani Priolli, Kiwi e Bial por toda amizade. As queridas meninas Thalita, Mariana, Bia, Juliana, Lígia e Maíra e suas famílias. As queridas ex-estagiárias bonitinhas Paula Morena, Helena, Anninha Millo, Vanessa, Gabi, Ana Terra, nossa querida ex-técnica de lab, Paulinha Vianna, e a lindinha Larissa. Os queridos amigos que me receberam e cuidaram de mim em Ashland quando eu mais precisei: Karen Darling, Rebecca e Gary. O companheiro Chico, o vira-lata boa praça que me adotou, ficou ao meu lado durante todos os momentos, inclusive durante as madrugadas de trabalho, ele só ia dormir depois que eu ia!

Grande agradecimento ao estimado Educador DeRose e aos queridos amigos do Método DeRose Granja Viana (Marcus, Bruzi, Vênus, Cacá, Julia Maia, Gui e Galak), pela oportunidade de vivenciar um estilo de vida saudável e equilibrado, conhecer uma cultura milenar, e entender, com humildade e respeito, que nem tudo precisa ser testado.

Agradeço do fundo do coração aos meus queridos “pais postiços” Beto e Anurmi, família maravilhosa, pela acolhida sempre carinhosa, palavras de apoio e por cuidar de mim nas longas horas de estudo e trabalho no sítio!!

Meu eterno agradecimento, que palavras não podem traduzir, aos meus pais, Neil e Eliana, me apoiando sempre, e com especial paciência nos momentos de desespero. Obrigada também por não terem me deixado mudar de identidade e de país para fugir do doutorado, e por sempre terem acreditado que eu devia seguir o meu sonho na minha carreira. Obrigada!!

Por fim, agradeço ao Shanty, meu amor, meu melhor amigo, minha pessoa no mundo, por ter confeccionado lindos mapas e me ajudado com conversões, tabelas, decimal, graus, e coisas de computador que eu não entendo. Mas, principalmente, por ser meu norte e meu prumo, por entender a importância deste trabalho para mim e a necessidade de eu estar em São Paulo e viajar tanto aos EUA, sempre me apoiando incondicionalmente, mesmo isso significando morarmos a 4000 km de distância um do outro. Sem você nada teria sentido. Te amo!

Índice

Geral

1. Introdução	1
1.1. Genética da Conservação	1
1.2. Genética da Conservação e Genética de Populações	3
1.3. Métodos para a Definição das Populações na Amostragem	5
1.4. Demografia Histórica	8
1.5. A Ferramenta: Microssatélites	10
1.6. Genética da Conservação Aplicada	12
1.7. Testes de Atribuição	15
1.8. O Problema: Tráfico de Fauna no Brasil	17
1.9. <i>Saltator similis</i> e <i>Paroaria dominicana</i>	21
2. Objetivos	26
3. Materiais e Métodos	28
3.1. Coleta das Amostras	28
3.2. Bibliotecas Genômicas Enriquecidas	30
3.3. Genotipagem dos Microssatélites	33
3.4. Análise dos Resultados	34
3.4.1. Genotipagens	34
3.4.2. Estrutura Populacional e Testes de Atribuição	35
3.4.3. Demografia Histórica	37
4. Resultados	39
4.1. Seleção de Marcadores Microssatélites	39
4.1.1. Seleção de Marcadores para <i>Paroaria dominicana</i>	40
4.1.2. Seleção de Marcadores para <i>Saltator similis</i>	43
4.1.3. Seleção de Marcadores para <i>Cyanoloxia brissonii</i>	45
4.1.4. Seleção de Marcadores para <i>Sporophila frontalis</i>	48
4.2. Diferenciação Populacional: <i>Paroaria dominicana</i>	50
4.2.1. Diferenciação populacional: <i>a priori</i>	52
4.2.2. Diferenciação populacional: partição de amostras	57
4.2.3. Estrutura Genética	64
4.2.4. Inferências sobre a História Demográfica	67
4.2.5. Teste de Atribuição	69

4.3. Diferenciação Populacional: <i>Saltator similis</i>	73
4.3.1. Diferenciação Populacional: <i>a priori</i>	76
4.3.2. Diferenciação Populacional: <i>clustering</i>	84
4.3.4. Inferências sobre a História Demográfica.....	88
5. Discussão	90
5.1. Seleção de Marcadores Microsatélites.....	90
5.2. Estrutura Genética e Teste de Atribuição: <i>P. dominicana</i>	95
5.3. Estrutura Genética: <i>S. similis</i>	111
6. Conclusões	117
6.1. <i>Paroaria dominicana</i>	117
6.2. <i>Saltator similis</i>	118
6.3. Conclusões Gerais.....	118
7. Resumo	120
8. Abstract	122
9. Referências Bibliográficas	124
10. Anexos e Apêndices	132

Figuras

Figura 1.1. Desenho de <i>Saltator similis</i>	22
Figura 1.2. Desenho de <i>Paroaria dominicana</i>	23
Figura 4.1. Distribuição das frequências alélicas para seleção de microsatélites para <i>P. dominicana</i>	42
Figura 4.2. Distribuição das frequências alélicas para seleção de microsatélites para <i>S. similis</i>	45
Figura 4.3. Distribuição das frequências alélicas para seleção de microsatélites para <i>C. brissonii</i>	47
Figura 4.4. Distribuição das frequências alélicas para seleção de microsatélites para <i>S. frontalis</i>	49
Figura 4.5. Mapa com as localidades de coleta de amostras de <i>P.</i> <i>dominicana</i>	50
Figura 4.6. Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado, para todas as amostras de <i>P. dominicana</i>	51

Figura 4.7. Gráfico de correlação de distância geográfica com distância genética com as amostras de <i>P. dominicana</i> divididas com base nas localidades de coleta.....	55
Figura 4.8. Valores do <i>Bayesian Information Criterion</i> (BIC) para diferentes números de <i>clusters</i> inferidos para de <i>P. dominicana</i> e gráfico dos <i>clusters</i> inferidos, utilizando a DAPC (Adegenet).....	57
Figura 4.9. Gráficos mostrando a diferença de frequência de cada <i>cluster</i> inferido pelo programa Adegenet em cada localidade de coleta de amostras de <i>P. dominicana</i>	58
Figura 4.10. DeltaK com a inferência do mais provável número de <i>clusters</i> presentes na amostragem.....	59
Figura 4.11. Gráfico de barras gerado pelo programa Structure v.2.3, com as amostras separadas em localidades de coleta.....	59
Figura 4.12. Gráfico triângulo gerado pelo <i>programa</i> Structure v.2.3, com as amostras separadas em localidades de coleta.....	60
Figura 4.13. Gráfico de barras gerado pelo programa Structure v.2.3 quando são assumidos três <i>clusters</i> (k=3).....	61
Figura 4.14. Gráfico em barras obtido utilizando o programa Structure v.2.3, com k=3 e Beira Rio agrupada ao <i>cluster</i> sudoeste.....	62
Figura 4.15. Gráfico em barras obtido utilizando o programa Structure v.2.3, com k=3 e sem ancestralidade em mais de um <i>cluster</i>	63
Figura 4.16. Frequências alélicas para cada loco em cada <i>cluster</i> inferido para <i>P. dominicana</i>	66
Figura 4.17. Distribuição do número de alelos para cada classe de frequência para todas as amostras de <i>P. dominicana</i> analisadas e em cada um dos <i>clusters</i>	68
Figura 4.18. Gráfico fornecido pelo programa Structure para atribuição de amostras provenientes de apreensão, utilizando o modelo com ancestralidade mista.....	70
Figura 4.19. Gráfico fornecido pelo programa Structure para atribuição de amostras provenientes de apreensão, utilizando o modelo sem ancestralidade mista.....	70

Figura 4.20. Gráfico triângulo fornecido pelo programa Structure para atribuição das amostras de <i>P. dominicana</i> provenientes de apreensão.....	71
Figura 4.21. Gráfico triângulo fornecido pelo programa Structure para atribuição das amostras de <i>P. dominicana</i> provenientes de apreensão.....	71
Figura 4.22. Mapa com todas as localidades para as quais foram obtidas amostras de <i>Saltator similis</i>	73
Figura 4.23. Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado, para todas as amostras de <i>S. similis</i> analisadas em conjunto.....	74/75
Figura 4.24. Frequências dos alelos de cada loco em cada localidade de coleta de amostras de <i>S. similis</i>	80-83
Figura 4.25. Valores do <i>Bayesian Information Criterion</i> (BIC) para diferentes números de <i>clusters</i> inferidos para <i>S. similis</i> e gráfico dos <i>clusters</i> inferidos, utilizando a DAPC (Adegenet).....	86
Figura 4.26. Diferenças nas frequências de cada <i>cluster</i> inferido pela análise de DAPC em cada localidade de coleta de amostras de <i>S. similis</i>	86
Figura 4.27. Inferência de k=3 (para todas as amostras) e k=2 (apenas para as quatro localidades Barra do Choça, Correntina, Nova Andradina e Santa Isabel do Rio Preto), obtidas para as amostras de <i>S. similis</i>	87
Figura 4.28. Gráfico de barras, barra gerado pelo programa Structure, demonstrando a divisão proposta para k=4.....	88
Figura 4.29. Gráfico de barras gerado pelo programa Structure, para k=2 e 4 localidades de origem das amostras.....	88
Figura 4.30. Distribuição das frequências alélicas para as amostras de <i>S. similis</i> em conjunto.....	90
Figura 5.1. Mapa de curvas de nível (IBGE) mostrando os três <i>clusters</i> propostos para <i>P. dominicana</i> , as altitudes de cada localidade de coleta de amostras e a bacia hidrográfica do Rio São Francisco.....	108

Figura 5.2. Mapa de relevo (IBGE) mostrando propostas de como ocorreria a dispersão dentro e entre os <i>clusters</i>	109
--	-----

Tabelas

Tabela 4.1. Perfil otimizado do programa de reação em cadeia da polimerase.....	40
Tabela 4.2. Oligonucleotídeos iniciadores de microsatélites desenvolvidos para <i>Paroaria dominicana</i>	41
Tabela 4.3. Oligonucleotídeos iniciadores de microsatélites desenvolvidos para <i>Saltator similis</i>	44
Tabela 4.4. Oligonucleotídeos iniciadores de microsatélites desenvolvidos para <i>Cyanoloxia brissonii</i>	46
Tabela 4.5. Oligonucleotídeos iniciadores de microsatélites desenvolvidos para <i>Sporophila frontalis</i>	48
Tabela 4.6. Análise de variância molecular (AMOVA, com base no Fst) para as amostras de <i>P. dominicana</i> divididas <i>a priori</i> , com base nas localidades de coleta.....	52
Tabela 4.7. Fst (A) para <i>P. dominicana</i> divididas <i>a priori</i> , com base nas localidades de coleta, e (B) valores de p.....	53
Tabela 4.8. Pares de localidades de coleta de <i>P. dominicana</i> que não apresentaram valores de Fst significativos.....	54
Tabela 4.9. Análise de variância molecular (AMOVA, com base no Rst) para as amostras de <i>P. dominicana</i> divididas <i>a priori</i> , com base nas localidades de coleta.....	56
Tabela 4.10. Análise de Fst (A) utilizando os <i>clusters</i> inicialmente sugeridos pelo Structure e valores de p (B).....	61
Tabela 4.11. Análise de Fst (A) utilizando três <i>clusters</i> com Beira Rio agrupada ao sudoeste e valores de p (B).....	63
Tabela 4.12. Número absoluto de migrantes entre os três <i>clusters</i> inferidos com base nos valores de Fst.....	64
Tabela 4.13. Tamanho amostral (N), número de alelos (Na) e heterozigoses observada (Ho) e esperada (He) por loco por <i>cluster</i>	65

Tabela 4.14. Número médio de alelos e médias das heterozigoses observada (Ho) e esperada (He) por <i>cluster</i>	65
Tabela 4.15. Testes de expansão populacional para <i>P. dominicana</i> para as amostras em conjunto e para os <i>clusters</i>	68
Tabela 4.16. Teste Garza & Williamson para <i>P. dominicana</i> para as amostras em conjunto e para os <i>clusters</i>	69
Tabela 4.17. Teste excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996) para <i>P. dominicana</i> para as amostras em conjunto e para os <i>clusters</i>	69
Tabela 4.18. Tamanho amostral, número de alelos e heterozigoses observada e esperada para todas as amostras em conjunto e por localidade de coleta de amostra de <i>Saltator similis</i>	76/77
Tabela 4.19. Número médio de alelos e médias das heterozigoses observada e esperada por localidade de coleta de amostra de <i>Saltator similis</i>	78
Tabela 4.20. Análise de variância molecular (AMOVA) para sete localidades de coleta de amostras de <i>S. similis</i>	78
Tabela 4.21. Análise de Fst (A) utilizando as localidades de coleta de <i>S. similis</i> como populações potenciais e valores de p (B).....	79
Tabela 4.22. Alelos privados por localidade de coleta de amostras de indivíduos de <i>S. similis</i>	82/83
Tabela 4.23. Análise de variância molecular (AMOVA) para quatro localidades de coleta de amostras de <i>S. similis</i>	84
Tabela 4.24. Análise de Fst (A) utilizando quatro localidades de coleta nos extremos da amostra obtida para <i>S. similis</i> como populações potenciais e (B) valores de p.....	84
Tabela 4.25. Teste de expansão populacional para cada loco (k) e inter-loco (g) para <i>S. similis</i>	89

1. Introdução

1.1. Genética da Conservação

A Biologia da Conservação é a resposta da comunidade científica à crise da biodiversidade atual, que por sua vez é consequência direta e indireta das atividades antrópicas e seus impactos no ambiente. Esses impactos têm resultado na maior extinção em massa desde o desaparecimento dos dinossauros, e vêm sendo conhecidos como a sexta grande extinção (Meffe & Carroll, 1994). A Biologia da Conservação é uma ciência multidisciplinar que aplica princípios da ecologia, biogeografia, genética de populações, economia, sociologia, antropologia, filosofia e outras disciplinas para a manutenção da biodiversidade e dos processos que a geram, face às perturbações causadas pelas atividades humanas (Meffe & Carroll, *op cit*; Moritz, 2002).

Biodiversidade é um conceito complexo que vai além do que pode ser representado somente pelo número de diferentes espécies em um ambiente. Pode ser definida como a variedade de ecossistemas, espécies, populações dentro de espécies e a diversidade genética dentro e entre essas populações (Frankham *et al.*, 2002). Existe uma relação direta de interdependência e modificação mútua entre o ambiente e as diferentes formas de vida, e a partir dela forma-se um sistema composto de processos ecológicos e evolutivos. Desta forma, o conceito de biodiversidade abrange todo este sistema complexo de processos, ambiente e formas de vida. Ao propor a definição da Biologia como uma ciência única, Mayr (2005) ressaltou que uma de suas características mais importantes é a complexidade dos sistemas biológicos. Com isso, mostra que não é possível utilizar o reducionismo da física e da matemática nesses sistemas, uma vez que não são explicados com base em suas menores partes, mas sim, em suas interações. Assim, conservar e proteger a biodiversidade significa conservar as interações, os processos, as relações entre os organismos, as condições físicas e químicas dos ambientes, em suma, a manutenção de processos evolutivos dinâmicos em um contexto ecológico em constante transformação.

Moritz (2002) realizou um levantamento sobre diversos trabalhos que discutem a conservação eficaz da biodiversidade (e.g. Balmford *et al.*, 1998, Purvis & Hector, 2000, Crozier, 1997, Cowling & Pressey, 2001, entre outros) e afirma que ao priorizar táxons e habitats para esforços de conservação, é necessário maximizar tanto a representação quanto a persistência da biodiversidade. A primeira consiste em buscar estratégias de forma a conservar a biodiversidade ao longo de seu padrão de distribuição espacial, no entanto, conseguir que esforços de conservação atinjam a diversidade genética em níveis infra-específicos ainda é assunto de debate. Já a persistência consiste em garantir que os processos que sustentam a diversidade atual e futura sejam protegidos. Assim, a Biologia da Conservação envolve não apenas a retenção da integridade ecológica das populações e dos habitats que as sustentam, mas o entendimento que um ambiente dinâmico é vital (Moritz, 2002).

Segundo Frankham *et al.* (2002), fatores relacionados à ação humana frequentemente reduzem as populações a tamanhos nos quais as espécies ficam suscetíveis a efeitos estocásticos. Populações reduzidas podem apresentar, após muitas gerações, decréscimo da diversidade genética ou mesmo depressão por endocruzamento, que podem levar a uma redução da aptidão em face de novos desafios ambientais. Da mesma forma, o manejo de populações diferenciadas geneticamente, que apresentam adaptação local ou complexos de genes coadaptados, como uma população pan-mítica, pode levar à redução acentuada da aptidão das gerações seguintes e à perda de diversidade genética da espécie.

Neste contexto a Genética da Conservação surge como uma disciplina que tem entre seus objetivos a redução da taxa de extinção e da perda de biodiversidade global, através do uso de teorias e técnicas da Genética, de forma a conservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem, através de respostas evolutivas, às mudanças ambientais (Frankham *et al.*, *op cit*; Moritz, 2002). Lida com fatores genéticos que afetam o risco de extinção, e com regimes de manejo genético requeridos para minimizar esses riscos. Foca particularmente em processos em populações pequenas e fragmentadas e em abordagens práticas para

minimizar efeitos deletérios dentro delas (Frankham *et al.*, 2002). Segundo Amos & Balmford (2001), a genética pode ser utilizada como uma ferramenta para elucidar problemas e guiar decisões de manejo não apenas através de estimativas de diversidade genética e reconhecimento de depressão por endocruzamento, mas também através de desdobramentos como a reconstrução de histórias populacionais, o desenvolvimento de métodos para a identificação de unidades significativas para conservação, a identificação forense de indivíduos, o controle do comércio ilegal, além de aspectos mais básicos como o entendimento do comportamento reprodutivo e estrutura populacional (Avice, 1996). Moran (2002) cita ainda como parte do crescente campo da genética da conservação desde estudos envolvendo expressão gênica até adaptação local, genética de populações e quantitativa, e fatores ecológicos guiando a seleção.

1.2. Genética da Conservação e Genética de Populações

Atualmente, uma das maiores controvérsias da Biologia da Conservação diz respeito à definição de unidades para serem objetos de manejo e proteção. Tem sido cada vez mais aceito que a maior parte da diversidade das espécies encontra-se distribuída nos níveis infra-específicos (Goldstein *et al.* 2000, Moritz, 1994), que podem representar unidade “reais” em termos evolutivos, com “destino evolutivo” independente (Eizirik, 1996), e que cada vez mais têm sido os objetos de atuação de políticas de manejo e conservação. As discussões sobre o reconhecimento dessas linhagens são acaloradas (e.g. Moritz, 1994, Crandall *et al.*, 2000, Goldstein *et al.*, 2000, Moritz, 2002) e englobam também quais os aspectos que devem ser priorizados: linhagens históricas isoladas ou variantes adaptativas. Segundo Moritz (2002), a diversidade genética pode ser particionada em dois grandes componentes: o primeiro, proveniente da evolução adaptativa, identificado através de variação fenotípica ou de ferramentas da genética quantitativa, que surge por seleção divergente e é facilitado por isolamento genético; e o segundo, resultante de isolamento histórico, identificado principalmente através de dados moleculares, que pode ocorrer independentemente de seleção divergente, assim de como divergência fenotípica. Com isso, o autor

propõe que esforços de conservação foquem por um lado o contexto de ação da seleção - populações viáveis ao longo de ambientes heterogêneos, o que protegeria o componente adaptativo da diversidade - e por outro as linhagens históricas. Para o reconhecimento dessas unidades (unidades evolutivamente significativas e unidades de manejo), sugere critérios genéticos que envolvem a identificação de diferenças significativas em linhagens de DNA mitocondrial e/ou em frequência de alelos em locos nucleares, analisando, portanto, o componente da variação neutra (Moritz, 1994).

Segundo Balloux & Lugon-Moulin (2002), estimativas confiáveis de diferenciação populacional são cruciais para a Biologia da Conservação, para a qual é necessário entender se nas espécies podem ser detectadas populações geneticamente isoladas, e o grau de isolamento. Assim, o reconhecimento dessas unidades de manejo passa necessariamente pelo entendimento de como se distribui a variabilidade genética dentro das espécies, com a identificação de quais são as populações e quão diferenciadas elas são. Dessa forma, uma parte substancial da Biologia da Conservação, que é o reconhecimento de unidades divergentes dentro de uma mesma espécie, utiliza ferramentas e conceitos da Genética de Populações.

A maioria das populações de praticamente todas as espécies apresenta algum grau de estruturação genética, que pode ser devida a barreiras ambientais, processos históricos, história natural das espécies ou mesmo ao isolamento por distância. A dimensão do fluxo gênico entre as populações determina sua maior ou menor homogeneização, assim como os efeitos relativos da seleção e da deriva genética (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Entretanto, a estruturação genética, o grau de fluxo gênico ou isolamento e a história demográfica só poderão ser inferidos após a definição de quais são as populações que compõe aquela espécie. O primeiro passo é, portanto, a definição de qual, dentre a miríade de conceitos existentes (e.g. Waples & Gaggiotti, 2006), será o conceito de população adotado.

De acordo com Hartl & Clark (2010), população pode ser definida como um grupo de organismos da mesma espécie vivendo em uma área geográfica restrita de tal modo que não exista barreiras para o cruzamento intrapopulacional, ou seja, qualquer membro da população pode potencialmente cruzar com qualquer outro (do sexo oposto). Na prática, ao adotar esse conceito, procura-se por grupos cujas frequências alélicas encontrem-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que sugere existência de panmixia.

De acordo com Balloux & Lugon-Moulin (2002), um dos pontos fracos da abordagem tradicional da Genética de Populações é o fato de os limites entre as populações não serem, na maioria das vezes, claramente demarcados. Cabe ao pesquisador, então, fazer a subdivisão arbitrária da amostra total em populações potenciais. A definição de populações dentro de uma amostragem é, portanto, na maioria das vezes subjetiva, baseada, por exemplo, em características físicas ou na localização geográfica das amostras (Pritchard *et al.*, 2000). Essa subdivisão inicial pode ter consequências importantes nas estimativas subsequentes de estrutura populacional, por exemplo, se um grupo de amostras considerado como uma população consistir na realidade de diversas populações, a estruturação dentro desse grupo levará a uma subestimação da estruturação entre os diferentes grupos de amostras (Balloux & Lugon-Moulin, *op cit.*).

1.3. Métodos para a Definição das Populações na Amostragem

Existem duas abordagens muito utilizadas para a inferência de quantas e quais são as populações em uma amostragem. O método clássico envolve a definição *a priori* de grupos dentro da amostragem, em geral as diferentes localidades de coleta, e a utilização de ferramentas estatísticas para inferir, através dos índices de fixação de cada grupo, quais localidades são ou não estatisticamente diferentes das outras. Com isso, grupos de amostras não diferenciadas vão sendo amalgamados até que a obtenção de populações potenciais, estatisticamente diferenciadas.

Outra abordagem que vem sendo amplamente utilizada são os métodos de *clustering* (partição de indivíduos de uma amostra em diferentes populações) para dados genéticos (e.g. Pritchard *et al.*, 2000; Evanno *et al.*, 2005; Hubisz *et al.*, 2009; Falush *et al.*, 2003; Jombart *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009; Liu & Zhao, 2006; Corander *et al.*, 2008).

Dentre estes métodos, o executado pelo programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) adota uma abordagem Bayesiana e assume os pressupostos de equilíbrio de ligação e de Hardy-Weinberg em cada *cluster*. A partir destes pressupostos, o modelo trata a presença de desequilíbrios através da introdução de estruturação populacional, e busca os agrupamentos que minimizem esses desvios. São assumidas então k populações (sendo que k , o número assumido de populações, pode ser desconhecido), as quais são caracterizadas por grupos de frequências alélicas em cada loco. O programa estima essas frequências alélicas e a probabilidade de cada amostra pertencer a cada um dos *clusters*, com base em seu genótipo. Entretanto, o número de k s pode ser superestimado se houver endocruzamento, indivíduos aparentados na amostragem, ou desequilíbrios de Hardy-Weinberg e de ligação provocados por outros fenômenos que não a estruturação populacional. Este método também permite assumir que os indivíduos possuem ancestralidade em mais de uma população, o que é comum para dados reais (Hubisz *et al.*, *op cit.*; Pritchard *et al.*, *op cit.*).

A escolha do número de k s pode ser feita através da comparação dos logaritmos penalizados das verossimilhanças obtidos para cada uma das réplicas realizadas para cada valor de k , escolhendo-se o maior valor. Entretanto, Evanno *et al.* (2005) notaram que a escolha do melhor número de k s na amostragem pode ser difícil de fazer, já que muitas vezes a distribuição das verossimilhanças não apresenta uma moda clara. Com isso, propuseram uma quantidade *ad hoc* ΔK , que torna a quebra na distribuição dos valores em questão mais clara. Desde então, ΔK tem sido amplamente utilizado para a inferência de número de populações dentro de uma amostragem (e.g. Honnen *et al.*, 2010; Milot *et al.*, 2008, Phillimore, *et al.*, 2008; Francisco *et al.*, 2007; Parsons *et al.*, 2006; Ernest *et al.*, 2003, entre

inúmeros outros). É importante mencionar que Pritchard *et al.* (2010), alertam no manual do programa que muitas vezes a estimativa de k é complicada e que o valor obtido para os dados deve ser interpretado menos como o “real” número de populações na amostra, e mais como o número de populações que abrange a maior parte da estrutura nos dados e que faz sentido biologicamente.

O pacote Adegenet (Jombart, 2008), executado pelo programa R (*R development team*, 2009), é baseado na análise discriminante de componentes principais (DAPC). De acordo com Jombart *et al.* (2010), a vantagem da análise de componentes principais (PCA) de dados genéticos é a possibilidade de identificação de estruturação genética em bases de dados grandes de forma computacionalmente rápida. No entanto, a PCA tem como objetivo resumir a variabilidade entre indivíduos, que inclui tanto a variação entre quanto dentro dos grupos. Além disso, necessita de definição de grupos *a priori*. A análise discriminante (DA) é um método multivariado que define um modelo no qual a variação genética é particionada em dois componentes - entre e dentro de grupos, maximizando a primeira e minimizando a segunda. A DAPC utiliza a análise de componentes principais como base para a análise discriminante, o que manteria as vantagens da análise discriminante, permitindo seu uso com dados genéticos, sem as desvantagens da DA aplica sozinha, além disso, não assume nenhum pressuposto sobre modelos de genética de populações, e é, portanto, livre de pressupostos sobre equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação (Jombart *et al.*, 2010).

Quando o número de *clusters* (“ k s”) não é conhecido previamente é possível utilizar a função *find.clusters* que identifica grupos de indivíduos através do método de *K-means clustering of principal components* (Lee *et al.* 2009): o método é testado para diversos valores de k , cada qual gerando um modelo estatístico e uma verossimilhança associados. Através do *Bayesian Information Criterion* (BIC), o melhor valor de k para os dados é estimado, escolhendo-se aquele associado ao menor valor de BIC. Quando o número de *clusters* mais adequado aos dados for ambíguo, Jombart (2011) sugere que seja adotado o critério que leva em conta a diferença entre diminuições

marcadas e mais sutis do BIC entre os diferentes ks. Assim, o k escolhido é aquele após a diminuição mais marcada do valor de BIC e antes das mais sutis. Além disso, esse método permite não apenas identificar o número de *clusters* presente na amostra, mas possibilita uma representação gráfica de relação entre eles através dos gráficos gerados (*scatter plots*).

Em uma análise do poder do método DAPC através de simulações, Jombart *et. al* (2010) concluíram que a DAPC não apenas tem um alto poder de inferência do número correto de ks tanto para populações em modelos de ilha, assim como em distribuições mais contínuas, como ilhas hierárquicas, *stepping-stone* e *stepping-stone* hierárquico, para as quais os *clusters* tendem a se dissolver em padrões mais clinais de diferenciação genética.

Uma vez definidas as populações é possível também realizar inferências sobre sua demografia histórica, procurando sinais de flutuações populacionais que tenham levado ao cenário observado de distribuição da variabilidade genética através de gargalos populacionais ou de expansões marcadas.

1.4. Demografia Histórica: como e por que entender as flutuações populacionais

A principal preocupação de pesquisadores e biólogos da conservação no que diz respeito a flutuações populacionais envolve a detecção de reduções drásticas dos tamanhos populacionais ao longo do tempo, ou gargalos populacionais. A razão reside no fato de que entre suas possíveis consequências, podem ser citados o aumento da estocasticidade demográfica, a perda de variabilidade genética, a ocorrência de altos níveis de endocruzamento e fixação de alelos deletérios. Estes fatores, aliados à dimensão da redução populacional e à duração do gargalo, e adicionados a outras pressões ambientais, podem levar ao comprometimento do potencial evolutivo ou até mesmo ao risco de extinção da espécie (Frankham *et al.*, 2002). Entretanto, o entendimento sobre as flutuações populacionais pelas quais passou uma espécie - ou populações de uma espécie - também configuram como uma rica fonte de informações para entender sua história evolutiva, realizar inferências zoogeográficas em relação a fenômenos como

expansões e retrações de territórios, assim como para entender os padrões atuais de distribuição da espécie.

A detecção de flutuações populacionais não é trivial, não apenas pela possibilidade do sinal de flutuação poder ser perdido com o tempo, mas na maioria das vezes os tamanhos populacionais e níveis de variabilidade genética históricos não são conhecidos (Hoffman *et al.*, 2011). Abordagens utilizando DNA mitocondrial muitas vezes fornecem informações ambíguas, já que, por se tratar de apenas um loco, o sinal de flutuação populacional pode não ser distinguido de varreduras genéticas e seleção. Já em uma abordagem multi-loco o efeito demográfico afetaria todos os locos e a varredura e a seleção apenas aqueles sob seus efeitos (Reich *et al.*, 1999). Aqui, abordagem multi-loco será utilizada em referência a locos de microssatélites.

Hoffman *et al.* (2011) resumem de forma elegante três propostas clássicas para detecção de reduções populacionais utilizando apenas amostras pós-evento. O primeiro é o método considerado mais clássico, desenvolvido por Cornuet & Luikart (1996), baseado no excesso de heterozigotos pós-gargalo. Os autores propuseram que alelos raros seriam rapidamente perdidos durante gargalos populacionais, mas em um primeiro momento, os níveis de heterozigose não seriam diretamente afetados. Isso ocorre porque a perda de alelos raros afetaria o número total de alelos, mas não teria grande efeito sobre a heterozigose. Esse cenário gera um estado transitório de excesso de heterozigotos em relação ao esperado para uma população em equilíbrio com o mesmo número de alelos. Já Luikart *et al.* (1998) sugerem que por conta da perda inicial de alelos raros, haveria uma mudança da moda da distribuição das frequências alélicas. Assim, populações que não sofreram gargalos seriam caracterizadas por uma alta proporção de alelos em frequência mais baixa, enquanto que populações que passaram por gargalos seriam caracterizadas por uma alta proporção de alelos em frequências intermediárias. Por fim, Hoffman *et al.* (2011) citam o teste proposto por Garza-Williamson (2001) – *M-ratio*. Esse teste explora o fato de que após um gargalo, perdas de quaisquer alelos seriam refletidas no número total de alelos (k), entretanto, apenas perdas de alelos de tamanhos

extremos afetariam a distribuição de tamanhos alélicos (r). Com isso, a proporção k/r seria alterada após eventos de gargalo populacional, com as populações afetadas apresentando M menor do que populações em equilíbrio. Hoffman *et al.* (2011) compararam a eficácia desses e concluíram que os mais sensíveis para a detecção de gargalos populacionais recentes são o M -ratio e o excesso de heterozigotos (assumindo o modelo mutacional de alelos infinitos, IAM, Kimura & Crow, 1964), além de métodos Bayesianos não abordados aqui.

Os testes descritos acima buscam sinais de reduções populacionais severas. Para a detecção de expansões populacionais, Reich *et al.* (1999) descrevem dois métodos – um para cada loco separadamente e outro inter-loco, ambos baseados em mudanças de tamanhos alélicos e assumindo o modelo de mutações passo a passo (SMM, Kimura & Ohta, 1978). Segundo os autores, a base do teste para cada loco (*within-locus k test*) é a expectativa que populações de tamanho constante apresentem distribuições dos tamanhos alélicos com várias modas. Já populações em expansão apresentariam distribuições de tamanhos alélicos com apenas uma moda. O teste g (*interlocus g test*) é baseado na expectativa de que o comprimento das distribuições dos tamanhos alélicos seria menor em populações que sofreram expansão do que em populações de tamanho constante, levando em conta, portanto, a variância na distribuição de tamanhos alélicos nos diferentes locos.

1.5. A Ferramenta: Microssatélites (STRs – short tandem repeats)

Uma das ferramentas mais utilizadas para inferências de diferenciação populacional são os marcadores microssatélites. Microssatélites são pequenas sequências de DNA repetidas lado a lado, predominantemente não-codificantes e altamente polimórficas, possibilitando desta forma uma alta resolução tanto em estudos inter quanto intrapopulacionais (Schlötterer, 1998). As mutações que ocorrem internamente nos microssatélites são mudanças no número das unidades de repetição. O mecanismo mais provável para explicar as altas taxas de

mutação seria a ocorrência de erros de pareamento, ocasionados pelo deslizamento das fitas de DNA no momento da replicação (*DNA replication slippage*). Além do alto grau de polimorfismo, os microssatélites são de modo geral seletivamente neutros (Schlötterer, *op. cit.*).

Atualmente, o maior debate em torno da utilização dos microssatélites é o modelo mutacional a ser assumido, que pode ter grande influência no resultado dos testes realizados e, portanto, das inferências subsequentes. São três os modelos mutacionais assumidos para os microssatélites. O modelo de alelos infinitos (*infinite allele model* ou IAM, Kimura & Crow, 1964) é um modelo extremo, para o qual cada mutação gera um novo alelo a uma determinada taxa. O modelo de mutações passo a passo (*stepwise mutation model* ou SMM, Kimura & Ohta, 1978), também é um modelo extremo e considera que cada mutação cria um novo alelo adicionando ou retirando uma unidade de repetição do microssatélite, com mesma probabilidade. Dessa forma, alelos de tamanhos mais próximos seriam mais proximamente relacionados do que alelos de tamanhos mais distantes. Por fim, o modelo de duas fases (*two-phase mutation model* ou TPM, Di Rienzo, *et al.*, 1994) assume que uma porcentagem das mutações dos microssatélites ocorrem seguindo o SMM e uma menor, seguindo o IAM.

Os microssatélites são marcadores efetivos de fluxo gênico e história populacional, mesmo em espécies com variação gênica limitada (Taylor *et al.*, 1997), além de serem muito versáteis e ideais para a identificação das relações entre populações naturais de uma determinada espécie (Queller *et al.*, 1993).

De posse de marcadores polimórficos, torna-se possível a realização de análises de variabilidade interpopulacional, computando-se diferenças alélicas, nas frequências dos alelos e nos tamanhos alélicos. A quantidade de diferenças entre as populações analisadas dependerá diretamente da quantidade de fluxo gênico entre elas (Sunnucks, 2000).

Dentre as aplicações práticas mais interessantes de estudos de diferenciação populacional e estruturação genética com microssatélites é a possibilidade de, se for encontrada variação genética correspondente a áreas geográficas nas populações estudadas, atribuir indivíduos à sua mais

provável população de origem, o que se torna uma ferramenta muito importante tanto para nortear esforços de repatriação, quanto para entender os padrões de captura de e regiões exploradas. Para tanto, são utilizados os testes de atribuição (*assignment tests*).

1.6. Genética da Conservação Aplicada

De acordo com Thornton (1994) Ciência Forense é a ciência específica de aplicação das ciências físicas e naturais para a resolução de questões em um contexto legal, e atua conectando vítima, suspeito e a cena do crime. A investigação forense apresenta três dimensões principais, sendo elas: identificação, individualização e reconstrução. Identificação consiste em classificar itens em categorias com outros semelhantes. Individualização consiste em reconhecer e demonstrar que uma amostra é única, mesmo entre membros da mesma classe, e muitas vezes em provar que uma evidência e uma amostra conhecida partilham a mesma origem. Já reconstrução consiste em juntar os pedaços de informação de um caso para inferir a sequência de eventos que culminaram no crime investigado (Pirsig, 1974).

De acordo com Goddard (2005), o acordo internacional sobre comércio de fauna e flora silvestres (CITES) de primeiro de Julho de 1975 acabou levando a um aumento na fiscalização sobre itens comercializados internacionalmente de espécies ameaçadas, em perigo, ou protegidas. Com isso, nasceu um novo problema para a Ciência Forense: o comércio ilegal de espécies reguladas pelo acordo viria a ocorrer, e ocorreria principalmente na forma de tráfico de partes e produtos dessas espécies. Assim, surgiu a demanda por análises forenses aplicadas à vida silvestre em escala internacional, já que identificações espécie-específicas seriam necessárias para que este acordo fosse posto em prática nos tribunais.

A Ciência Forense voltada para a vida silvestre consiste na utilização de dados científicos em um contexto legal, em crimes envolvendo a natureza - flora, fauna, contaminação ambiental, entre outros. Desde o surgimento deste campo, muitos protocolos foram estabelecidos para lidar com evidências ligadas a esses tipos de crimes. Segundo Goddard (*op. cit.*)

podem ser destacados cinco campos principais: criminalística, química analítica, patologia, morfologia e genética. Atualmente o único laboratório do mundo inteiramente dedicado somente à análise de amostras provenientes de crimes contra a vida silvestre é o *U.S. Fish and Wildlife Service National Forensics Laboratory* (NFL, OR, EUA).

As principais perguntas que a genética pode responder abrangem a definição de a qual espécie ou grupo determinada amostra pertence (definição de espécie), se a amostra encontrada pertence a determinado indivíduo (individualização) e a origem geográfica de determinada amostra (atribuição).

O grande marco da Genética Forense para a vida silvestre são os estudos de Baker & Palumbi (1996) e Palumbi & Cipriano (1998, 1999), no quais inicialmente foi construído um banco de dados com sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) obtidas de DNA extraído de amostras de sangue e/ou tecidos coletadas para diferentes espécies de cetáceos. Através desse banco de dados, os autores conseguiam distinguir com alta confiança sequências de mtDNA de espécies de baleia, assim como de golfinhos. A seguir, o DNA de amostras compradas como carne de baleia minke (a única espécie que o governo japonês tem permissão de caçar para fins científicos e comercializar os despojos restantes) em feiras livres japonesas foi extraído e sequenciado e seus resultados comparados com as sequências do banco de dados. Foi descoberto não só que a carne de baleias ameaçadas de extinção era vendida como sendo de baleia minke, inclusive de baleia azul, como também carne de golfinhos, tartarugas, ovelhas e até cavalos era vendida como sendo carne de baleia de caça permitida. Como resultado a *International Whaling Commission* (IWC), órgão que controla a cota de captura das baleias e o comércio de seus produtos, instituiu a partir de 1999 a análise do mtDNA como método de controle de caça e comercialização de produtos de baleia (Ross *et al.* 2003).

Já um exemplo interessante de atribuição de origem geográfica é o trabalho de Velo-Antón *et al.* (2007), no qual foram utilizadas 153 amostras da tartaruga-de-água-doce europeia, *Emys orbicularis*, representativas da área de ocorrência da espécie na região Ibérica, e sete locos de

microssatélites. Foram encontradas cinco populações com F_{st} médio de 0.12. Com estes dados e utilizando o programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000), os autores conseguiram atribuir 22 de 36 animais com origem desconhecida, provenientes de centros de reabilitação a uma provável população de origem.

A repatriação de animais apreendidos do comércio ilegal de fauna (e devidamente reabilitados) para locais o mais próximo possível de suas reais populações de origem é importante para evitar, entre outros problemas, a ocorrência de depressão por exocruzamento (DE). A DE pode ser definida como uma redução na aptidão (seja pela diminuição na capacidade de cruzar, fertilizar, gerar descendentes, sobreviver ou de se reproduzir) das gerações subsequentes ao cruzamento de populações diferenciadas (Frankham *et al.*, 2011). Segundo Templeton, (1986), a depressão por exocruzamento ocorrerá se forem misturadas populações que evoluíram de formas distintas e que passaram a apresentar adaptação local ou complexos de genes coadaptados. Adaptação local consiste em indivíduos que, com o tempo, tornam-se adaptados às condições locais, como temperatura, pluviosidade, tipos de recursos, entre outros. Já os complexos de genes coadaptados são genes de indivíduos de uma mesma população que são selecionados e passam a funcionar com maior eficiência em bloco, quando são herdados e trabalham de forma conjunta. O maior perigo relacionado à DE consiste no fato de seus efeitos só serem manifestados, em geral, após a F2, quando se dá a quebra dos complexos coadaptados. Por isso, caso não haja um monitoramento cuidadoso, poderá passar despercebida até ser tarde demais.

É importante notar que a ocorrência de DE está diretamente ligada ao isolamento reprodutivo das populações em questão. De acordo com Frankham *et al.* (2011), mesmo baixos níveis de fluxo gênico (com um ou mais migrantes “efetivos” entre as populações, por geração) já seriam suficientes para evitar o desenvolvimento de diferenciação genética significativa (para a ocorrência de DE) na ausência de seleção. Assim, os autores, que propuseram critérios para a predição da possibilidade de ocorrência de DE, sugerem que populações que não apresentam diferenças

cromossômicas fixadas, apresentam fluxo gênico nos últimos 500 anos, habitam ambientes similares, ou, se não, habitam ambientes diferentes há menos de 20 gerações, apresentam pequena probabilidade de desenvolverem DE se for estabelecido fluxo gênico entre elas. Por outro lado, populações que apresentam diferenças cromossômicas fixadas, estão isoladas há mais de 500 anos ou habitam ambientes substancialmente diferentes há mais de 20 gerações apresentam maior probabilidade de desenvolverem DE caso seja estabelecido fluxo gênico entre elas.

A atribuição de origem geográfica de indivíduos apreendidos do tráfico de fauna faz parte do arcabouço teórico necessário para a aplicação da Ciência Forense em crimes envolvendo natureza. Para que testes de atribuição sejam realizados com amostras provenientes de apreensão do comércio ilegal de fauna, de forma a nortear esforços de repatriação, e entender os padrões de captura dos animais na natureza, é necessário o desenvolvimento de marcadores moleculares apropriados para cada um desses fins.

1.7. Testes de Atribuição

Em Manel *et al.* (2002) pode ser encontrado um resumo sobre os principais tipos de testes de atribuição. De acordo com os autores, esses testes podem ser divididos de acordo com o método estatístico utilizado – baseado em frequência, baseado em frequência e em estatística Bayesiana ou puramente Bayesiano.

Uma das primeiras perguntas que culminaram nos estudos de atribuição foi se os indivíduos provenientes de uma mesma população se agrupariam melhor do que os de populações diferentes. Neste contexto, o trabalho de Paetkau *et al.* (1995) que teve como objetivo analisar a estrutura populacional de ursos polares, ao tentar explicitar o quão indicativo o genótipo de um indivíduo era em relação à população na qual foi amostrado, acabou por levar à criação do primeiro método de atribuição. Os principais métodos de atribuição para dados genéticos são baseados na probabilidade de que um genótipo multi-loco do indivíduo a ser atribuído ocorra em cada

uma das populações candidatas (e.g. Cornuet *et al.*, 1999; Manel *et al.*, *op cit.*).

A atribuição baseada em frequência (Paetkau *et al.*, 1995), resumidamente, computa as frequências alélicas em cada uma das populações candidatas e as probabilidades do genótipo do indivíduo testado ocorrer em cada uma das populações. Então atribui o indivíduo à população na qual a probabilidade de ocorrência de seu genótipo é a mais alta.

O método de exclusão (Cornuet *et al.*, 1999) utiliza um método parcialmente Bayesiano para realizar comparações da probabilidade do genótipo em questão, obtida da mesma forma do método de Paetkau *et al.* (*op cit.*), a uma distribuição de probabilidades de genótipos simulados para cada uma das populações candidatas. Se a probabilidade do genótipo testado estiver fora da cauda da distribuição, será excluído como tendo origem naquela população. Se todas as populações menos uma forem excluídas, o indivíduo pode ser atribuído. Se a real população de origem do indivíduo não estiver presente na amostra, este teste excluirá todas as candidatas, portanto não requer que a real população de origem esteja amostrada. Como este teste computa a probabilidade de atribuição a cada população candidata separadamente, permite a realização do teste com apenas uma população candidata.

Já o teste de atribuição de Pritchard *et al.* (2000) é baseado em estatística bayesiana. Segundo Manel *et al.* (2002), este teste computa a probabilidade de um genótipo multi-loco ser proveniente de uma população dentre as amostradas, e a compara a um limiar pré-determinado (T). No entanto, esse valor T é obtido comparando-se as probabilidades relativas entre as populações candidatas. Assim, tem como pressuposto que a origem real esteja entre as candidatas. Isso significa que o teste pode não atribuir a amostra a nenhuma população caso T não seja atingido, como no exemplo de Balding *et al.* (2007) no qual o T escolhido foi 0.999 e três populações fictícias apresentaram probabilidades relativas de 0.990, 0.000 e 0.10. Por outro lado, pode ocorrer uma situação exemplificada pelos mesmos autores na qual três populações fictícias teriam reais probabilidades de atribuição de 0.998999 (A), 0.001 (B) e 0.000001 (C). Caso apenas as duas últimas

tivessem sido amostradas (B e C), como o método calcula as probabilidades relativas, a atribuição seria feita para a segunda população (B) com $T > 0.999$. Por fim, como este método utiliza probabilidades relativas, não permite a realização de teste de atribuição com apenas uma população candidata.

Para que a atribuição de um indivíduo a uma determinada população ou espécie seja possível, diversas etapas de desenvolvimento científico são imprescindíveis: o desenvolvimento de marcadores moleculares eficientes, a padronização das reações e, principalmente, a obtenção de um grande número de amostras de toda a distribuição geográfica do grupo em questão. A finalidade é criar um banco de dados representativo das frequências alélicas populacionais para que as amostras apreendidas a serem processadas possam ser comparadas com as informações do banco de dados gerado, e atribuídas a esta ou aquela população/espécie.

1.8. O Problema: Tráfico de Fauna no Brasil

Atualmente o tráfico de fauna configura uma das maiores ameaças à biodiversidade brasileira. Pode ser definido pela retirada de espécimes da natureza para que possam ser vendidos no mercado interno brasileiro ou para o exterior (IBAMA, 2007). Estima-se que mundialmente o comércio ilegal de fauna seria a terceira atividade ilegal mais lucrativa, atrás apenas do tráfico de drogas e de armas (Barber-Meyer, 2010; RENCTAS, 2002; Sarney Filho - CPITRAFI, 2003).

De acordo com as duas principais fontes atuais de informações sobre o tráfico de fauna no Brasil, o Relatório da CPI do tráfico (Sarney Filho - CPITRAFI, *op cit.*) e o Primeiro Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre (RENCTAS, *op cit.*), o tráfico de fauna figura hoje como uma das principais ameaças à fauna silvestre brasileira, junto com a perda e degradação de habitats e a caça para a subsistência. Ainda segundo as mesmas fontes, o tráfico de fauna poderia ser dividido em quatro vertentes principais: 1) o tráfico para abastecer colecionadores particulares e zoológicos, que teria como alvos principalmente espécies raras e/ou ameaçadas, cujos espécimes tendem a ser muito caros; 2) a biopirataria, para fins científicos e de produção de medicamentos, que prioriza indivíduos

peçonhentos ou venenosos que possam vir a conter princípios ativos interessantes para medicamentos; 3) o comércio ilegal para abastecer a demanda por animais de estimação, sendo esta a modalidade que mais incentiva o tráfico de animais silvestres no Brasil, visa principalmente a répteis, aos pequenos mamíferos e de forma muito acentuada, às aves canoras, aos papagaios e às araras; e 4) a demanda por partes e produtos de fauna, que constitui uma grande parte do comércio internacional ilegal da vida selvagem, e engloba desde produtos para remédios das culturas locais, até supostos afrodisíacos e souvenirs, como ornamentos, peles, dentes, penas, patas, produtos feitos de ossos, couros, cascos, etc.

No Brasil, os animais alvos do tráfico têm como destino principal os Estados do Sudeste, tanto para abastecer o mercado local quanto para deixar o país pelos portos e aeroportos (RENTAS, 2002). Países que fazem fronteira com o Brasil podem também servir como intermediários gerando documentação falsa para os animais (RENTAS *op.cit.*). De acordo com o IBAMA (2007), este tráfico se inicia com o indivíduo que reside junto ao ambiente natural capturando e aprisionando os animais para depois vendê-los diretamente aos turistas ou aos primeiros atravessadores, que montam as grandes cargas os transportam para os grandes centros de compra. Entre os principais meios de transporte destes animais podem ser citados os barcos na região norte e os caminhões, ônibus e carros particulares nas outras regiões do País (IBAMA *op. cit.*).

Devido à natureza ilegal da atividade, poucos são os estudos que adotaram uma metodologia científica para a quantificação do comércio ilegal de animais no Brasil. Uma tentativa interessante foi o trabalho de Regueira & Bernard (2012), que procurou analisar o impacto dessa atividade através de dados qualitativos e quantitativos obtidos para sete “feiras-de-rolô” na periferia de Recife, estimando que apenas os mercados analisados comercializem 50.000 animais e movimentem por volta de 630.000,00 dólares por ano. A RENTAS (2002) realizou uma estimativa baseando-se em dados oficiais de apreensões realizadas no Rio de Janeiro e concluiu que o tráfico de animais silvestres retira por ano cerca de 38 milhões de espécimes da natureza no Brasil, movimentando o montante de cerca de

dois bilhões e quinhentos milhões de reais por ano. Segundo um levantamento realizado pelo IBAMA (2007), em 2002 os Núcleos de Fauna e os Centros de Triagem de Animais Silvestres receberam um total de 44.355 espécimes provenientes de apreensões, sendo que destes, 82,71% eram aves, 13,75% répteis e 3,54% mamíferos. As aves são os maiores alvos do comércio ilegal não só pela enorme demanda – é um traço cultural de o brasileiro querer possuir aves de gaiola em casa – mas também por sua riqueza e relativa facilidade de captura. As aves mais procuradas são os Passeriformes e os Psittaciformes (RENCTAS, 2002). De acordo com um levantamento realizado pela Polícia Militar Ambiental do Estado de São Paulo (Governo do Estado de São Paulo, 2007), com dados referentes ao ano de 2006, apenas no ano de 2006 e apenas no Estado de São Paulo, foram apreendidos pela PMA (excetuando-se então apreensões realizadas pelas polícias Civil e Federal e diretamente pelo IBAMA) 30.216 animais, sendo que destes 26.313 eram aves. Em uma extrapolação baseada em números mínimos de animais provenientes do semiárido nordestino apreendidos na capital paulista por mês – cerca de cinco mil – a ong SOS Fauna estima que em 15 anos, pelo menos 900.000 indivíduos daquela região foram comercializados ilegalmente em São Paulo (Marcelo Rocha, comunicação pessoal 2012). Além disso, estimando-se que 5% desse número tenham sido apreendidos – 45 mil indivíduos – praticamente não se tem notícia daqueles animais que foram reabilitados e repatriados. Esta estimativa nivelada pelos números mínimos mostra o volume de animais retirados de forma regular da natureza brasileira, e evidencia o impacto que pode ter nos ecossistemas.

No Brasil a constituição de 1988 já versa sobre a proteção à fauna no artigo 225, § 1º, VII da Constituição Federal (Constituição da República Federativa do Brasil, 1988), “incumbe ao Poder Público proteger a flora e a fauna, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção das espécies ou submetam os animais à crueldade”

A legislação específica é constituída de uma Lei e um Decreto como os principais instrumentos legais: Lei nº 9.605/98 e Decreto nº 6.514, de

2008. (Peters & Pires, 2002 e Palácio do Planalto, website acessado em 2011), além dos artigos da Lei nº 5.197/67 que não foram substituídos pela Lei de Crimes Ambientais de 1998. Esta define como crimes contra a fauna silvestre sua utilização, perseguição, caça ou apanha, e comercialização, exceto em casos especificados na forma da lei, e dependendo da expedição de licenças do órgão competente. Entretanto, a 5.197 pode ser considerada como um retrocesso em relação à Lei nº 5.197/67, já que além de não tipificar o crime de tráfico de fauna (apenas transporte, comércio e posse ilegais), permite um abrandamento das penas - posse ilegal de fauna silvestre passou a ser crime de menor potencial ofensivo, com a reclusão podendo ser substituída pela restrição de liberdade, serviços comunitários, prestação pecuniária, entre outros.

Além disso, o parágrafo primeiro do artigo 25 do capítulo três prevê a libertação dos animais apreendidos em seu habitat. A reintegração de fauna é um assunto controverso, e para que não traga maiores danos ao ambiente, necessita um enorme embasamento científico, pois com ela corre-se o risco de introduzir patógenos nas populações naturais, gerar depressão genética por exocruzamento, além de existir uma grande chance de que os indivíduos soltos acabem todos morrendo pelas mais diversas razões, desde a incapacidade de encontrar alimento no ambiente natural até disputas territoriais se soltos em locais inadequados (Frankham *et al.*, 2002).

Outro grande problema desta lei encontra-se no parágrafo segundo do artigo 29 do capítulo cinco, que diz que no caso de guarda doméstica de espécie silvestre não ameaçada de extinção, o juiz pode deixar de aplicar a pena. No entanto, uma das melhores formas de coibir a atividade ilegal é atacar sua demanda, e enquanto a guarda doméstica de espécies silvestres não for considerada crime, o que deseduca a população, a demanda continuará.

O Decreto nº 6.514/08 dispõe sobre as condutas infracionais ao meio ambiente e suas respectivas sanções administrativas. Um pequeno avanço deste decreto encontra-se no artigo 107, inciso I, o qual prevê a possibilidade de libertação dos animais apreendidos em seu habitat. O parágrafo quinto (incluído pelo Decreto nº 6.686 de 2008), afirma que a libertação dos animais

deverá observar os critérios técnicos previamente estabelecidos pelo órgão ou entidade ambiental competente. Tal afirmação pode parecer simples, mas é de grande valia para evitar solturas indevidas.

Ainda assim as penas e multas aplicáveis no caso de comércio ilegal de fauna e flora silvestres são muito pequenas, o que torna esta atividade tão degradante para o ambiente mais lucrativa e menos perigosa para os infratores do que outras atividades ilegais. Neste contexto de crescimento dos crimes contra a vida silvestre e falta de conhecimento para repatriar indivíduos sadios, a Ciência Forense para a Vida Silvestre pode gerar dados que auxiliem tanto a condenação de criminosos quanto o destino de animais provenientes de apreensão.

1.9. *Saltator similis* (Lafresnaye & d'Orbigny, 1837) e *Paroaria dominicana* (Linnaeus, 1758), Passeriformes: Aves

A nomenclatura e sistemática adotadas aqui seguem aquelas do CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2011). Segundo um relatório da Polícia Militar Ambiental do Estado de São Paulo (Governo do Estado de São Paulo, 2007), até Setembro de 2007 o número de animais apreendidos vítimas do tráfico já havia superado os totais de 2005 e 2006, de 25,1 mil e 30,2 mil animais respectivamente. Destes, a grande maioria é composta por aves, sendo que Psitacídeos e pássaros canoros figuram entre os mais procurados pelos compradores (Marcelo Rocha, comunicação pessoal, 2007; CPITRAFI, 2003; RENCTAS, 2002), com a desculpa de que faz parte da cultura brasileira possuir aves silvestres em casa.

Os Passeriformes galo-de-campina (*Paroaria dominicana* - Linnaeus, 1758 - Thraupidae) e trica-ferro-verdadeiro (*Saltator similis* - Lafresnaye & d'Orbigny, 1837 – Thraupidae) configuram sistematicamente nas listas de dez espécies mais traficadas a cada ano (Governo do Estado de São Paulo, *op. cit.*; Balazina, 2007) e suas áreas de ocorrência abrangem os biomas do Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. O interesse destas espécies para o comércio legal reside no fato de serem aves canoras e belas, muito apreciadas como aves de gaiola (Sick, 1997). Até recentemente, *P.*

dominicana era classificada como parte da família Emberizidae e *S. similis* era classificada como Cardinalidae.

De acordo com Sick (1997), *Saltator similis* (Figura 1.1), trinca-ferro-verdadeiro ou picharro, ocorre principalmente nas beiras das matas e clareiras, tanto nas baixadas quanto nas montanhas. É encontrado no leste do Brasil, da Bahia ao Rio Grande do Sul, no Brasil central e na Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai. Tem cerca de 20 cm, bico robusto com forma característica e cauda avantajada. Com exceção da cauda possui o lado superior verde-oliva, xistácea em ambas as faces, garganta branca, estria malar realçada de branco e bochechas xistáceas. As características mais marcantes da espécie são a garganta branca e a longa faixa superciliar branca (Ridgely & Tudor, 2001). Alimenta-se de insetos e frutos. Não apresenta dimorfismo sexual e durante o período reprodutivo, forma casais que defendem ativamente o território. Os indivíduos começam a se reproduzir, pelo menos em cativeiro, com um ano de idade (Mariano Amabis, comunicação pessoal).

Essa espécie é extremamente explorada como ave de gaiola, sendo que existem até mesmo concursos de cantos específicos para trinca-ferro. Em geral, tipo de canto preferido dos donos de aves desta espécie é conhecido pelos “passarinheiros” como “boi-cheio”, característico de regiões de Minas Gerais (Marcelo Pavlenko, comunicação pessoal).

Figura 1.1: Desenho de *Saltator similis* (Lafresnaye & d'Orbigny, 1837 – Thraupidae) adulto (Grantsau, 2010).

De acordo com Burns (1997), a maioria dos gêneros de Thraupinae (que na época do estudo não incluía o gênero *Saltator*) possui um ancestral comum anterior às glaciações Pleistocênicas (3 a 5 milhões de anos), o que sugere que muitas das espécies dos gêneros são recentes.

Paroaria dominicana (Figura 1.2), galo-de-campina ou cardeal-do-nordeste, é endêmico da Caatinga, ocorrendo no Nordeste brasileiro, do sul do Maranhão ao interior de Pernambuco. Tem em média 17,2 cm, apresenta plumagem da cabeça vermelha, curta e ereta. Ao contrário de outras espécies congêneras, não possui gravata negra. Apresenta as partes superiores cinzentas, exceto o dorso anterior, coberto de penas negras no ápice e brancas na base. O dorso posterior e as coberteiras superiores das asas são manchados de negro, e a mandíbula cinzento-clara enquanto a maxila é anegrada. Não há dimorfismo sexual, mas indivíduos imaturos (que vão atingir a maturidade sexual aos dez meses) possuem as partes superiores pardo-anegradas, barriga branca e cabeça ferrugínea (Sick, 1997).

Figura 1.2: Desenho de *Paroaria dominicana* (Linnaeus, 1758 - Thraupidae) adulto (Grantsau, 2010).

É uma espécie que pode ser encontrada predominantemente em mata baixa rala e ensolarada, é granívora, com preferência por gramíneas, forrageando em grupos diretamente no solo. Forma casais durante o período reprodutivo e o macho defende o território. Dependendo do local pode apresentar de uma ninhada ao ano (Caatinga nordestina, no período chuvoso) a duas a quatro ninhadas por temporada, cada uma com dois a

três ovos. O período de incubação é de cerca de 13 dias (Sick, 1997). Apesar de o status de ameaça de acordo com a IUCN ser pouco preocupante (*least concern*), é uma espécie que merece atenção, por ser endêmica de um bioma ameaçado e, além disso, ser uma das espécies mais visadas pelo comércio ilegal de animais silvestres.

Em um estudo filogenético do gênero *Paroaria*, Nodari (2008) concluiu que há evidências suficientes para suportar a hipótese de que o gênero seja monofilético. Através da análise de marcadores mitocondriais, inferiu a idade da cladogênese de *P. dominicana* e *P. coronata* como sendo entre 3,4 a 2,7 milhões de anos (M.a.), no Plioceno. O autor sugere que essa cladogênese possa ter relação com as mudanças climáticas decorridas do soerguimento dos Andes centrais, que ocorreu entre 3,5 e 2,3 M.a.

O autor também realizou análises filogeográficas para a espécie *P. dominicana* e não apenas não conseguiu detectar estruturação genética populacional, e nem inferir possíveis barreiras geográficas para a espécie em diferentes cenários testados, como encontrou desvios da neutralidade compatíveis com seleção positiva, ou seleção negativa atuando concomitantemente ou não a uma expansão populacional recente. Apesar de não poder testar a hipótese, Nodari (*op. cit.*) propõe que o cenário de expansão populacional recente seria compatível com o proposto por Wang *et. al.* (2004), de que o último período de aumento de pluviosidade no nordeste brasileiro – e consequente retração da Caatinga – seria datado de 15 mil anos atrás. Desde então a região estaria passando por um período de menor pluviosidade, com expansão do bioma. Neste contexto, uma expansão populacional concomitante de uma espécie endêmica do bioma seria plausível.

Ao finalizar, o autor enfatiza a importância de estudos com marcadores nucleares para elucidar o cenário e, assim, compreender melhor o que está ocorrendo com esta espécie muito traficada e endêmica de um ambiente ameaçado.

Borges *et al.* (2006) em um diagnóstico da fauna silvestre apreendida e recolhida pela Polícia Militar em Juiz de Fora (entre 1998 e 1999), encontraram que o grupo predominante foi o das Aves, correspondendo a

53,28% do total. Das diversas espécies de aves apreendidas, as pertencentes aos gêneros *Sporophila*, *Sicalis* e *Saltator* corresponderam a cerca de 60% dos Passeriformes. Apesar do número de indivíduos apreendidos não ter sido citado para nenhuma das espécies, *P. dominicana* também está citada entre os passeriformes apreendidos. Já no levantamento realizado por Rocha *et al.* (2006) sobre a comercialização ilegal de aves nas feiras livres de Campina Grande (Pa), o cardeal-do-nordeste aparece entre as espécies preferidas e mais comercializadas, podendo atingir os maiores preços.

Segundo o relatório da Polícia Militar Ambiental (Governo do Estado de São Paulo, 2007), as duas espécies estudadas no presente trabalho figuram entre as dez mais apreendidas pelo órgão em 2006, mostrando que não apenas são comercializadas em suas áreas de ocorrência, como são transportadas por longas distâncias, o que dificulta muito a mitigação dos impactos gerados por esta atividade.

2. Objetivos

A ideia que motivou este trabalho foi avaliar a possibilidade de utilização de ferramentas de Genética de Populações para contribuir no entendimento sobre o tráfico de fauna no Brasil, que atualmente está entre as maiores ameaças à nossa biodiversidade. Inicialmente foram selecionadas quatro espécies de passeriformes com presença constante nas listas das dez mais traficadas no país - *Saltator similis*, *Paroaria dominicana*, *Cyanoloxia Brissonii* e *Sporophila frontalis*. A pergunta a partir da qual teve desdobramento este trabalho foi se a partir de um estudo de genética de populações seria possível definir populações geneticamente diferenciadas e, se sim, se seria possível atribuir indivíduos apreendidos do comércio ilegal em São Paulo às suas mais prováveis populações de origem. O grande ponto de interesse é utilizar essas informações em conjunto com outras informações de outras fontes, como, por exemplo, inteligência policial, e através da construção dessas bases de dados, não apenas ajudar a nortear possíveis repatriações, como entender melhor rotas, padrões, e regiões super-exploradas pelo tráfico de fauna. Contudo, a abertura desta linha de pesquisa trouxe consigo a necessidade do desenvolvimento da Ciência de base, que consistiu desde coleta de amostras até o desenvolvimento dos marcadores moleculares e as análises de Genética de Populações propriamente dita. Assim, os passos principais para alcançar os objetivos foram:

- 1) Desenvolver bibliotecas genômicas e selecionar locos polimórficos de microssatélites para *Saltator similis*, *Paroaria dominicana*, *Cyanoloxia Brissonii* e *Sporophila frontalis*;
- 2) Coletar amostras de sangue ou tecidos indivíduos provenientes de apreensão;
- 3) Coletar amostras de sangue ou tecidos de indivíduos ao longo das distribuições das espécies;
- 4) Inferir a estrutura genética populacional e distribuição da variabilidade genética nas espécies para as quais foi obtida amostragem representativa,

assim como procurar entender os processos que levaram à distribuição da variabilidade genética encontrada;

5) Realizar testes de atribuição para inferir as mais prováveis populações de origem de indivíduos apreendidos do comércio ilegal em São Paulo, para a espécie para a qual foi possível descrever *clusters* genéticos diferenciados.

3. Materiais e Métodos

3.1. Coleta das Amostras

Este projeto contou com as licenças ambientais necessárias: IBAMA/SISBIO 13903-1,2 e 3 e IBAMA/CEMAVE 2272351. Foram realizadas 19 viagens e saídas a campo com o intuito de coletar tanto amostras de populações naturais, com origem conhecida, quanto provenientes de animais apreendidos do comércio ilegal:

- .uma viagem à Estação Ecológica de Canudos (ong Biodiversitas), Bahia;
- .quatro viagens à região de Juquitiba e Miracatú, São Paulo;
- .quatro viagens ao Parque Estadual da Serra do Mar, núcleo Curucutú, parte alta, São Paulo;
- .cinco saídas para a APA Capivari-Monos, São Paulo;
- .uma viagem para Ibiúna, São Paulo;
- .uma viagem para Feira de Santana e Vitória da Conquista, Bahia;
- .uma viagem para a região de Cabaceiras, Paraíba, e de Petrolina, Pernambuco;

.uma viagem à Santa Isabel do Rio Preto, fronteira de Minas Gerais e Rio de Janeiro (as amostras da localidade Santa Isabel do Rio Preto foram obtidas de funcionários de uma fazenda que tinham animais em gaiolas. Contudo, a origem do indivíduo só foi considerada nos casos de contato direto com a pessoa que capturou a ave, e caso ela afirmasse que realmente havia capturado a ave na região, e fornecesse detalhes do local de captura. Em um caso, no qual o dono da gaiola afirmou ter comprado a ave, ela foi considerada como sem origem conhecida);

- .uma viagem à Nova Andradina (Mato Grosso do Sul);
- .coleta de amostras provenientes de apreensão de fauna comercializada ilegalmente - Sede da ong SOS FAUNA (Juquitiba, SP) e operações junto à Polícia Civil do Estado de São Paulo em “feiras-de-rolo”.

Nestas saídas foram coletadas 522 amostras com procedência conhecida. Além disso, coleções foram visitadas para a obtenção de amostras previamente coletadas:

- .Museu do Capão da Imbuía (Curitiba, Paraná) - 45 amostras;
- .Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) - 96 amostras;
- .Banco de Tecidos do Laboratório de Genética e Ecologia Molecular de Aves (LGEMA, Universidade de São Paulo) – 24 amostras;
- .Coleção do Laboratório de Ornitologia e Mastozoologia (LORMA, Universidade Estadual de Feira de Santana) - 06 amostras;
- .Banco de Tecidos do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM, Universidade Federal de Minas Gerais) - 28 amostras.

Amostras provenientes de apreensão também foram doadas pelo DEPAVE-3 (divisão de fauna do departamento de parques e áreas verdes do município de São Paulo), que foi um grande colaborador deste trabalho também durante algumas viagens de campo. No apêndice 1 estão descritas apenas as amostras diretamente utilizadas neste trabalho, já que uma tabela com todas as amostras obtidas seria extremamente longa e pouco prática.

Os passeriformes foram capturados com redes de neblina (de 12x2x6 m, malha 36 mm, 4 bolsas) ou alçapões (dependendo do bioma), atraídos com *playback* e/ou ceva e estímulo visual, como uma “chama” viva ou um animal da mesma espécie empalhado (que surtiu grandes efeitos para *S. similis*). Para *P. dominicana* as redes foram posicionadas ao redor de comedouros colocados pelo homem ou outros locais de alimentação (como plantações de sorgo, por exemplo). Para *S. similis* as redes eram posicionadas entre dois poleiros utilizados pelas aves para defesa de território, duas a três redes na horizontal e duas a três na vertical, dependendo da altura dos poleiros. Após caírem nas redes, os indivíduos eram pedados, muitas vezes medidos, anilhados e aproximadamente de 10 a 50µL de sangue eram retirados da veia braquial. Para tanto, a região da asa na qual o sangue era tirado era desinfetada com álcool 70%, um pequeno furo era feito com uma agulha de insulina de 1 mL estéril e, após a formação de uma bolha de sangue, ela era coletada utilizando um cateter (diâmetro interno 1mm), e armazenado em etanol 70%. Após a coleta de sangue, era feita pressão na área com um algodão ou gaze até o estancamento do sangramento. Caso demorasse a estancar era utilizado um algodão pó coagulante (anaseptil). Caso o sangramento estancasse, a área

era tratada com pomada de uso veterinário cicatrizante e bactericida (vetagloss). Após a coleta de sangue eram oferecidas à ave através de uma seringa de insulina algumas gotas de vitamina para pássaros (glipopan) ou eletrolítico PET, diluído conforme indicação do fabricante. Uma vez reidratada e com sangramento estancado, a ave era solta e monitorada para constatar que estava bem e voando normalmente. Em alguns casos foi realizada a coleta de indivíduos de *S. similis* e *P. dominicana* para a obtenção de espécimes-testemunho, todos depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Todas as amostras coletadas foram depositadas no Banco de Tecidos do Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação de Vertebrados (LABEC, departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo), e todos os espécimes coletados foram depositados junto ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Para estes últimos, duplicatas de amostras de tecido também foram depositadas no Banco de Tecidos do LABEC.

3.2. Bibliotecas Genômicas Enriquecidas

Resumidamente, a formação de uma biblioteca genômica enriquecida passa pela digestão do DNA com enzimas de restrição, segue-se então a ligação do DNA digerido a oligonucleotídeos (ou *linkers*), que servem como iniciadores da reação em cadeia da polimerase (pcr, do inglês, *polimerase chain reaction*) para os fragmentos desconhecidos. A seguir realiza-se o enriquecimento da biblioteca em microssatélites, recorrendo à hibridação com sondas biotiniladas. Os fragmentos amplificados por pcr são inseridos em um vetor pela reação de ligação. A reação de transformação é usada para inserir o vetor com o fragmento de interesse nas bactérias competentes. Através das propriedades conferidas pelo vetor, são selecionadas as bactérias transformadas. A partir de sequenciamento, utilizando iniciadores específicos do plasmídeo, é possível conhecer o marcador e as zonas flangeadoras para desenho de iniciadores específicos.

Para a construção das bibliotecas genômicas, realizada no *U.S. Fish and Wildlife National Forensics Laboratory* (NFL), foi necessário adaptar e

juntar duas metodologias (Glenn & Schable, 2005 e Hamilton *et al.*, 1999), o que exigiu muito trabalho e tempo para que fossem adequadas aos equipamentos e reagentes disponíveis. Os passos seguidos estão descritos em detalhe a seguir com o intuito de auxiliar os corajosos que decidirem optar por esta técnica. Os pormenores de cada passo podem ser encontrados nos artigos acima.

O primeiro passo foi extrair o DNA genômico das amostras de sangue ou músculo (método salino - acetato de amônio), que foi posteriormente quantificado em aparelho *Cytofluor 4000* (*Perseptive Biosystems*), com corante picogreen (Invitrogen, diluição 1:200). A seguir as amostras a serem utilizadas para as bibliotecas (duas de cada espécie) foram selecionadas e seu volume foi reduzido para concentração através de secagem a vácuo. Foi então realizada a digestão das amostras simultaneamente com as enzimas de restrição *RsaI*, *XmnI* e *NheIII* (*New England Biolabs*). Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose (1%) para a seleção dos fragmentos com 300 a 800 pares de bases, que foram cortados do gel, para nova extração de DNA, desta vez com o *QIAquick gel extract kit* (QIAGEN). O produto foi novamente quantificado e tratado com *Mung Bean Nuclease* (*New England Biolabs*) para cortar pontas deixadas pelas enzimas de restrição. A seguir foi feita a purificação e concentração com o *QIAquick purification kit* (QIAGEN), cujo produto foi ressuspensionado em *buffer low TE* (TRIS-EDTA). A mistura dos ligantes SNX foi preparada e foi utilizada *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP, *New England Biolabs*) para desfosforilação. Foi feita uma nova etapa de purificação e concentração com o kit *QIAQUICK* e ressuspensão em *buffer low TE*. Foi feita a ligação do DNA resultante com os ligantes SNX, com adição da enzima *XmnI* (*New England Biolabs*) para evitar a formação de polímeros, seguida de uma pcr para verificar o sucesso da ligação (apenas utilizando o ligante *forward*). Para a verificação da existência de bandas na região 300 a 600pb, o produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%. Após a verificação do sucesso, foi feito o primeiro enriquecimento: reação em cadeia da polimerase utilizando a reação de ligação, de forma a aumentar quantidade de fragmentos ligados ao SNX. Verificação em gel de agarose 0,8% para checar o sucesso da pcr.

A seguir, as sondas biotiniladas (GA, CA, GATA) foram diluídas e hibridizadas com o DNA, e o conjunto resultante foi “capturado” com as sondas magnéticas - *dynabeads* (Life Technologies), gerando o chamado “*PureGold*”. Seguiu-se o segundo enriquecimento, que consistiu de outra pcr, utilizando como base o que foi capturado pelas *dynabeads*, para aumentar quantidade do *puregold* de forma a garantir mais adiante que os plasmídeos tenham fragmentos com repetição. A pcr do segundo enriquecimento foi checada em gel de agarose 0,8%. Para as amostras que ficaram fracas foi feito um terceiro enriquecimento: uma nova pcr com o ligante SNX *forward* usando o *puregold* como base, checada em gel de agarose 0,8%.

Finalmente teve início o teste com células competentes HB101 (Promega) e com células não competentes cultivadas no laboratório. Como o sucesso das transformações iniciais foi consistentemente baixo, as células competentes foram tratadas como estoque de células não competentes e tornadas competentes com kit TransforAid (Fermentas). As células agora competentes puderam então sofrer ligação e transformação (ligação dos fragmentos selecionados no passo anterior aos plasmídeos e inserção dos plasmídeos ligados aos fragmentos nas células bacterianas), que foi feito utilizando o kit GeneJet (Fermentas). O plaqueamento foi feito em placas de Petri, quatro réplicas por reação, com meio LB com ágar e ampicilina, já que o plasmídeo utilizado possui um gene que torna as células suscetíveis à ampicilina. A inserção do fragmento ocorre no meio deste gene, tornando-as resistentes à ampicilina caso a inserção e a transformação tenham ocorrido com sucesso. As colônias que se desenvolveram foram coletadas e cultivadas em separado em meio LB. Foi feita uma pcr das colônias com iniciadores SNX para verificação da existência do fragmento inserido através de análise em gel de agarose 0.8%. A seguir, foi feita reação de sequenciamento (ABI3730) diretamente das colônias selecionadas (sem necessidade de extração de DNA), para verificação da existência de motivos repetitivos.

As sequências foram analisadas utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999) e alinhadas utilizando o programa SE-AL 2.0a11 (Rambaud, 1996). De posse das sequências, foram desenhados *primers* específicos para cada

microssatélite obtido (utilizando a ferramenta *online PrimerQuest*, IDT), sendo que cada um foi testado utilizando *pools* de DNA de cada uma das quatro espécies em gradientes de doze temperaturas. Todas as reações foram analisadas em géis de agarose 1%.

Com isso, as condições das reações em cadeia da polimerase puderam ser padronizadas para cada loco em cada espécie e as temperaturas de hibridação dos iniciadores definidas. Além disso, essa etapa serviu como uma triagem inicial, através da qual os locos que não apresentaram boas amplificações foram descartados. O próximo passo foi realizar uma segunda triagem para selecionar os locos polimórficos que seriam subsequentemente analisados em sequenciador automático. Este passo foi necessário devido aos altos custos de *primers* marcados com fluorescências assim como dos reagentes necessários à genotipagem realizada em sequenciador. Para tanto foi utilizado um detector automático de fragmentos MultiNa (Shimadzu), que utiliza quatro chips dentro dos quais pequenas eletroforeses são realizadas. Além de permitir uma seleção prévia de quais iniciadores testar em sequenciador automático para cada espécie, as análises realizadas neste equipamento também permitiram um melhor ajuste do programa de pcr utilizado. Para tanto foram selecionadas oito amostras de cada espécie que foram amplificadas para cada um dos locos selecionados na triagem inicial. Após a pcr, as amostras eram transferidas para placas e analisadas no detector de fragmentos.

A sexagem dos indivíduos em alguns casos foi feita morfológicamente e em outros através de sexagem molecular (Griffiths *et al.*, 1998).

3.3. Genotipagem dos Microssatélites

A genotipagem dos locos em *Saltator similis* e *Paroaria dominicana* foi realizada em parte no NFL, em um sequenciador automático *Applied Biosystems* 3500xl. Parte das genotipagens para estas duas espécies, e todas para *Cyanoloxia brissonii* e *Sporophila frontalis* foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo), em um sequenciador automático *Applied Biosystems* 3730. No caso de genotipagem de amostras para locos já analisados no ABI3500xl, foram

realizadas validações para cada um deles, repetindo no ABI3730 a genotipagem de amostras com alelos representativos da variação presente no loco, com a finalidade de entender como a mudança de equipamento alterou a genotipagem.

As amostras foram amplificadas em reações de volume final 10ul, com 0.2mM de cada dNTP, 1.5mM MgCl₂, 0.35mM de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*), 1 unidade de taq polimerase (GoTaq Flexi, Promega) e 1x *buffer* de amplificação (GoTaq Flexi, Promega). Os produtos da pcr eram diluídos 10 a 50 vezes antes da reação pré-genotipagem. Um microlitro de produto era então transferido para uma placa contendo 8.92ul de Hi-Di e 0.075ul dos marcadores 600-LIZ ou Rox (*Applied Biosystems*) em cada poço. A placa com a reação final era levada ao sequenciador para genotipagem. Cada amostra foi genotipada até três vezes, para garantir a qualidade dos dados e minimizar a ocorrência de dados faltando. Amostras que após três repetições não apresentavam boas genotipagens ou apresentavam variação entre as diferentes réplicas foram descartadas.

3.4. Análise dos Resultados

3.4.1. Genotipagens

O programa GeneMarker v.194 (Softgenetics) foi utilizado para a análise dos eletroferogramas gerados pelos sequenciadores, com a definição da amplitude de cada *bin* (variação esperada de alelos ao redor do tamanho real), construção dos painéis, e geração de tabelas de genótipos. Para aumentar a consistência e confiança dos resultados a definição dos alelos também foi realizada utilizando o programa Allelogram (Morin *et al.*, 2009), o qual fornece uma interpretação visual e direta de distribuição dos alelos obtidos o checar a qualidade do loco, uma vez que é esperado que a distribuição dos tamanhos alélicos seja discreta. A inferência de existência de locos com possíveis alelos nulos, *allelic drop-out*, erros de genotipagem e outros desvios foi realizada utilizando o *programa* Micro-checker (Van Oosterhout, 2004).

3.4.2. Estrutura Populacional e Testes de Atribuição

Os programas Genalex (Peakall & Smouse, 2006) e Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier, 2005) foram utilizados para a confecção dos gráficos das distribuições dos alelos, para checar se as populações definidas *a priori* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, se os locos estão em equilíbrio de ligação, para estimar as frequências alélicas e proporções genotípicas esperadas e observadas, para a obtenção dos números de alelos e alelos privados, assim como para obter estimativas de F_{st} (Wright, 1951), e R_{st} (Slatkin, 1995). Para inferir a possibilidade de isolamento por distância e, portanto, uma distribuição clinal da diversidade genética para *P. dominicana*, foi utilizado o teste de Mantel executado pelo programa Genalex (Peakall & Smouse, 2006).

A identificação de *clusters* genéticos de indivíduos presentes nas amostras sem definição de grupos *a priori* foi realizada utilizando dois programas. Primeiro, foi utilizado o pacote Adegenet (Jombart *et al.*, 2010), executado pelo *programa* R (R development team, 2009). Resumidamente, a DAPC utiliza uma análise de componentes principais como base para a análise discriminante, o que maximiza as diferenças entre e minimiza as diferenças dentro dos *clusters*, evidenciando mesmo padrões de estruturação sutis (Jombart *et al.*, *op cit.*). Para inferir quantos grupos (*clusters* ou *ks*) compõem a amostragem total, o programa utiliza o método de *k-means clustering of principal components* (Lee *et al.*, 2009): o método é testado para diversos valores de *k*, cada qual gerando um modelo estatístico e uma verossimilhança associados. Através do *Bayesian Information Criterion* (BIC), o melhor valor de *k* para os dados é estimado, escolhendo-se o *k* associado ao menor valor de BIC.

Ainda de acordo com Jombart *et al.* (2010), uma grande preocupação no que diz respeito às análises de *clusters* de amostras é o risco de inferir, por conta de artefatos de amostragem, grupos discretos de populações cuja diversidade genética na realidade é distribuída de forma contínua. Os autores dizem que o risco existe e é inerente de qualquer inferência de grupos em amostras cujas populações são desconhecidas, mas sugerem que a representação gráfica dada pelos *scatterplots* pode dar uma indicação

da estrutura genética entre os *clusters* e apresentam exemplos de gráficos que mostram claramente *clusters* distribuídos de forma clinal, contra outros claramente diferenciados e mais próximos ao modelo de ilhas.

O segundo programa utilizado foi o Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), método de partição de amostras que utiliza um algoritmo bayesiano (Pritchard *et al.*, *op cit*). Os parâmetros utilizados foram escolhidos de acordo com o manual (Pritchard *et al.*, 2010) e artigos sobre o tema (e.g. Evanno *et al.*, 2005; Falush *et al.*, 2003; Falush *et al.*, 2007; Husbisz *et al.*, 2009). O número mais provável de *clusters* genéticos presentes na amostragem foi inferido inicialmente calculando valores da probabilidade posterior de $k=1$ até $k=15$, nas análises exploratórias, e depois $k=1$ até $k=6$ para *P. dominicana* e $k=1$ a $k=15$ e depois $k=1$ a $k=7$ para *S. similis*. O comprimento do período de *burnin* utilizado foi de 70.000 e o número de cadeias de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) após o *burnin* foi de 250.000, com 20 réplicas por valor de k . Foi utilizado o modelo que permite que os indivíduos tenham ancestralidade misturada (*admixture model*), com utilização da informação da localidade de coleta, e o modelo de frequências alélicas correlacionadas entre as populações, proposto por Falush *et al.* (2003), que assume que as frequências alélicas em diferentes populações podem ser semelhantes (por migração ou ancestralidade comum). O número de k s mais adequado aos dados foi estimado utilizando o método proposto por Evanno *et al.* (2005), através do *website Structure Harvester* (Dent *et al.*, 2011). As mesmas análises foram repetidas utilizando o modelo que não permite ancestralidade mista (*no admixture*), já que Pritchard *et al.* (2000) afirmam que esse modelo é interessante para revelar estruturação sutil.

O Structure (*op cit.*) também foi utilizado para as análises de atribuição de espécimes sem origem conhecida. Foi utilizado um período de *burnin* de 100.000 cadeias de Markov e 1.000.000 cadeias para a análise propriamente dita, com dez iterações para cada k . Foi utilizado o modelo que assume frequências alélicas correlacionadas entre os *clusters*, assim como o modelo com ancestralidade mista. Foi fornecida ao programa informação de origem para os indivíduos coletados na natureza, em uma das análises com base nos *clusters* propostos na análise anterior, e em outra com base nas

localidades de coleta das amostras. Foi utilizada a opção “POPFLAG=1 ONLY”, que determina que o programa considere informação *a priori* apenas das amostras identificadas com o marcador número 1. A ideia é que com isso o programa não force atribuir todos os indivíduos sem origem conhecida para o mesmo grupo.

3.4.3. Demografia Histórica

A busca por sinais de flutuações populacionais foi realizada como um objetivo paralelo a este trabalho, como uma forma de entender melhor quais eventos levaram as distribuições de variabilidade genética observadas para as duas espécies aos seus estados atuais. Foram utilizados os testes k_g (Reich & Goldstein, 1998; Reich *et al.*, 1999), a distribuição do número de alelos por classe de frequência (Luikart *et al.*, 1998), a relação entre número de alelos e amplitude da distribuição de tamanhos alélicos (Garza & Williamson, 2001) e excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996).

O teste escolhido para a detecção de sinal de expansão foi o k_g test descrito em Reich *et al.* (1999), desenvolvido especificamente para uso com marcadores microssatélites, já que adota o modelo de mutações passo-a-passo (SMM). Foram realizados testes utilizando réplicas na amostragem como um todo (indivíduos com origem e indivíduos provenientes de apreensão), assim como para os grupos obtidos através das análises de diferenciação populacional.

O teste k (*within locus*) detecta expansões populacionais com base nas distribuições dos tamanhos alélicos em cada loco. A distribuição típica para populações de tamanho constante seria multimodal, enquanto que para populações que sofreram expansão uma única moda é esperada (Reich & Goldstein, 1998).

O teste g (*interlocus*) é baseado na expectativa de que a variância nas amplitudes das distribuições de tamanhos alélicos (*range*) ao longo dos locos é geralmente menor em populações que sofreram expansão do que em populações de tamanho constante. Assim, medindo a variância das distribuições dos tamanhos alélicos em cada loco e considerando a variância destas variâncias ao longo dos locos, obtém-se uma estatística que pode ser

comparada com valores esperados para populações em tamanho constante. Em Reich *et al.* (1999) é fornecida uma tabela de valores de significância para g em relação ao número amostral e ao número de locos utilizados.

A distribuição do número de alelos por classe de frequência (Luikart *et al.*, 1998) baseia-se no fato de que os alelos raros seriam os primeiros a ser perdidos em reduções populacionais extremas. Com isso, populações que não sofreram redução apresentariam uma maior proporção de alelos em menor frequência do que populações que sofreram reduções, com as primeiras apresentando gráficos de distribuição de frequências alélicas com uma forma de L, e as últimas, gráficos sem o formato característico.

O teste de Garza-Williamson (2001), que foi implementado através do programa Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier, 2005), analisa a proporção do número total de alelos (k) em relação à amplitude da distribuição dos tamanhos alélicos (r) e baseia-se na expectativa de que perda de alelos em um evento de redução populacional terá efeitos em k , mas apenas alelos perdidos nos extremos da distribuição de tamanhos terá efeitos em r . Como consequência, k tenderá a ter uma redução mais acentuada do que r . Portanto, é esperado que k/r seja menor em populações que sofreram gargalo populacional do que aquelas em equilíbrio. Os autores sugerem que valores de k/r abaixo de 0.7 indicariam a provável ocorrência de gargalo populacional.

O teste de excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996) utilizado é implementado pelo programa Bottleneck v.1.2.02 (Piry *et al.*, 1999). A análise baseia-se na premissa de que os alelos raros são rapidamente perdidos em um evento de redução populacional. Contudo, justamente por serem raros, essa perda, em um primeiro momento, pouco afetaria a heterozigose. O resultado seria uma população com uma maior taxa de heterozigose observada do que a esperada em equilíbrio deriva-mutação para o número de alelos observado (Cristescu *et al.* 2010). Foi utilizado o modelo mutacional de alelos infinitos (IAM - *infinite allele model*, Kimura & Crow, 1964) e os resultados foram analisados utilizando o teste de Wilcoxon, que segundo Luikart & Cornuet (1999), é o mais adequado e robusto para tamanhos amostrais pequenos.

4. Resultados

4.1. Seleção de Marcadores Microssatélites

Foram desenvolvidas quatro bibliotecas genômicas, uma para *Saltator similis*, uma para *Paroaria dominicana*, uma para *Sporophila frontalis* e uma para *Cyanoloxia brissonii*, utilizando 02 amostras de cada espécie (separadamente, não em *pools*), utilizando sondas para GA, CA e GATA. Foram sequenciados 723 fragmentos dos quais 95 apresentaram motivos repetitivos. Foram então desenhados 56 pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos sobre as sequências que apresentaram melhores condições. O sucesso do desenvolvimento da biblioteca para algumas das espécies foi muito superior ao de outras, mesmo as técnicas e reações tendo sido exatamente as mesmas, realizadas ao mesmo tempo. Com isso, foram desenhados 15 iniciadores específicos para *Sporophila frontalis*, 18 para *Cyanoloxia brissonii*, 19 para *Paroaria dominicana* e quatro para *Saltator similis*. Por conta desta grande diferença, foi decidido testar todos os *primers* em todas as espécies.

O próximo passo consistiu em testar cada *primer* em cada uma das quatro espécies para selecionar aqueles que apresentavam boas amplificações, assim como para padronizar as reações em cadeia da polimerase (pcr), principalmente no que diz respeito às temperaturas de hibridação dos *primers*. Para tanto, cada par de iniciadores foi testado em um *pool* de DNA de cada uma das quatro espécies em 12 temperaturas cada. Com essa triagem inicial foi possível descartar aqueles que não apresentavam boas amplificações daqueles que seriam potencialmente informativos. Assim, foram selecionados cerca de 30 pares de iniciadores para cada espécie. Também realizada a padronização das condições de amplificação (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Perfil otimizado do programa de reação em cadeia da polimerase.

Tabela 4.1.1. Protocolo otimizado do programa de reação em cadeia da polimerase.		
Passo	Temperatura	Tempo
1	95 ⁰ C	2 minutos
2	95 ⁰ C	30 segundos
3	TA	40 segundos
4	72 ⁰ C	50 segundos
5	voltar para o passo 2, 30 vezes	
		-
6	72 ⁰ C	20 minutos
7	4 ⁰ C	manter

A seguir, o polimorfismo de cada loco selecionado foi testado em oito indivíduos (de localidades diferentes e/ou de grupos de apreensão) de cada uma das quatro espécies, utilizando o detector automático de fragmentos (MultiNa, Shimadzu). Como resultado foram selecionados 16 locos aparentemente polimórficos e potencialmente informativos para *S. frontalis*, 18 para *S. similis* e *C. brissonii* e 13 para *P. dominicana*, além de alguns poucos locos (aproximadamente quatro por espécie) para os quais foram obtidas amplificações aparentemente monomórficas, mas que por se tratarem de dinucleotídeos - e o polimorfismo poder não ter sido detectado pelo MultiNa - foram também selecionados para teste em sequenciador.

4.1.1. Seleção de Marcadores para Paroaria dominicana

Foram testados 18 locos para *Paroaria dominicana*, sendo que nove apresentaram boas amplificações, foram considerados informativos e genotipados para 15 amostras. O número de alelos variou de dois (loco SF01) a 12 (loco PD03), a heterozigose esperada de 0.404 (loco SF01) a 0.905 (loco PD03) e a observada de 0.266 (loco PD04) a 0.933 (locos PD03 e PD02) (Tabela 4.2). A maior variação nos tamanhos dos alelos foi registrada para o loco CB03, cujos alelos variaram de 312 a 412.

Tabela 4.2: oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites desenvolvidos para *Paroaria dominicana*: nome, motivo repetitivo, sequências dos *primers*, temperaturas de hibridação (TH), número de alelos (NA), diferenças de tamanho entre os menores e maiores alelos (*range*), espécie para a qual o loco foi desenvolvido e heterozigose observada (Ho) e esperada (He). *0.01 ≤ p valor ≤ 0.05, **p valor ≤ 0.01.

<i>P. dominicana</i>	Motivo repetitivo	<i>primers</i> (5'-3')	TH	NA	Range	espécie-específico	Ho	He
SF01	Dinucleotídeo	F:TGACTCTGTCA GGTCTGTCT R:ATGCAGCAAAG TCCATACCC	61C	2	292-294	<i>S. frontalis</i>	0.533	0.404
CB01	Dinucleotídeo	F:GCATCTATTACA CTCAGTAAACCCA GC R:AGGGCTGTGCC TGTGTTTCTTTCT F:ACCAGTAGAGT	67C	8	226 - 244	<i>C. brissonii</i>	0.866	0.862
CB02	Tetranucleotídeo	GCTTTGCCA R:TTGGGTTTCCC AAGCTTTCCCA F:ACAGAATGATG	66C	9	312-412	<i>C. brissonii</i>	0.733	0.816
PD01	Tetranucleotídeo	CATTAGAT R:TTCTGAAGAGG ACCACAG F:ATGAAGTCCAC	59C	10	189-225	<i>P. dominicana</i>	0.800	0.889
PD02	Tetranucleotídeo	CTGTCAATGCAG C R:TGTGCTCTCAG ACCCATATTACA F:AGCTGTAATCC	66C	9	220-264	<i>P. dominicana</i>	0.933	0.896
PD03	Tetranucleotídeo	TCCTCCCACAACA R:CAACAGCTCTT GCACTTGGA F:AAGAAGGACAT	64C	12	309-347	<i>P. dominicana</i>	0.933	0.905
CB03	Tetranucleotídeo	GAGCGCACAGA R:TGGTTCCTGTT GGCAATCCTGA F:CGCTGAAGGTG	67C	11	305-389	<i>C. brissonii</i>	0.800	0.871
SF02	Dinucleotídeo	GGATTCATT R:TTAGCAGCGAC CAGAGTCTT F:GCAGCTGATGA	51C	3	263-267	<i>S. frontalis</i>	0.400	0.503
PD04	Tetranucleotídeo	CGCTGGAATTT R:AGCAAGATTTG GCATGTCGCCT	67C	4	176-188	<i>P. dominicana</i>	0.266	0.724**

A heterozigose média observada foi 0.696 enquanto que a heterozigose média esperada foi 0.764. De todos os locos testados, praticamente nenhum apresentou desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, todos com $p > 0.14$. A exceção foi o loco PD04, que apresentou desvio ($p \leq 0.01$), entretanto, ao aplicar correção para múltiplas comparações, esse valor deixa de ser significativo.

Na figura 4.1 estão representadas as frequências de cada alelo em cada loco, mostrando que todos os locos são polimórficos e potencialmente úteis para estudos populacionais.

Figura 4.1: Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado para *P. dominicana*

Dos dez indivíduos sexados escolhidos aleatoriamente, cinco eram machos e cinco fêmeas. Não foi encontrado nenhum loco ligado a cromossomos sexuais. Não foi identificada possível presença de perda de alelos (*allelic drop-out*), erros de genotipagem ou alelos nulos para quase nenhum loco com exceção de PD04, que foi então retirado das análises subsequentes.

4.1.2. Seleção de Marcadores para Saltator similis

Foram testados 21 locos para *Saltator similis*, sendo que dez foram considerados informativos (Tabela 4.3) e genotipados para dez amostras. A heterozigose observada variou de 0.1 (CB07) a 1.000 (CB03, CB02 e SF03) e a esperada, de 0.189 (CB06) a 0.931 (PD03). O número de alelos por loco variou de dois (SF01 e CB06) a 13 (PD03).

O número médio de alelos observado foi oito, a heterozigose média observada foi 0.608 e a esperada foi 0.772. Foi observado desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos PD02 e CB07, ambos com H_o menor do que H_e . Apenas o p valor para o loco CB07 continua significativo após correção para múltiplas comparações.

Os gráficos das distribuições das frequências alélicas (Figura 4.2) mostram três perfis distintos: dois locos menos polimórficos – SF01 e CB06; locos com um ou dois alelos dominantes – PD03 e CB03; e locos com mais alelos em frequência mais alta – CB05, CB02, CB04, PD02 e CB07, todos potencialmente informativos para estudos populacionais.

Não foi identificada possível de perda de alelos (*allelic drop-out*), erros de genotipagem ou alelos nulos com exceção de CB07, que foi então retirado das análises subsequentes.

Da mesma forma, não foi encontrada indicação de ligação a cromossomo sexual, entretanto, nas sexagens realizadas foram identificadas poucas fêmeas (duas) em relação a machos (oito).

Tabela 4.3: oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites desenvolvidos para *Saltator similis*: nome, motivo repetitivo, sequências dos *primers*, temperaturas de hibridação (TH), número de alelos (NA), diferenças de tamanho entre os menores e maiores alelos (range), espécie para a qual o loco foi desenvolvido e heterozigose observada (Ho) e esperada (He) - *0.01 ≤ p valor ≤ 0.05, **p valor ≤ 0.01.

S. similis	Motivo repetitivo	primer (5'-3')	TH	NA	Range	espécie- específico	Ho	He
SF01	Dinucleotídeo	F: TGA CTCTG TCAGGTCT GTCT R: ATGCAGCAAAGTCCA TACCC	61C	2	285- 287	<i>S. frontalis</i>	0.200	0.442
PD02	Tetranucleotídeo	F: ATGAAGTCCACCTGT CAATGCAGC R: TGTGCTCTCAGACCC ATATTACA F: TCAGCAACAGTATGA	61C	8	226- 270	<i>P. dominicana</i>	0.500	0.879*
CB04	Tetranucleotídeo	GGGCAGT R: AGGCTTGTGCAGGTG TCATT F: GCAAAGGCACAATGA	66C	9	380- 424	<i>C. brissonii</i>	0.800	0.895
CB05	Tetranucleotídeo	AGGAGTCCTGA R: TCAGGCAGTTCTCTC CCAGTATGT F: AAGAAGGACATGAGC	63C	8	251- 287	<i>C. brissonii</i>	0.700	0.879
CB03	Tetranucleotídeo	GCACAGA R: TGGTTCCTGTTGGCA ATCCTGA F: AGCTGTAATCCTCCTC	63C	10	335- 591	<i>C. brissonii</i>	1.000	0.868
PD03	Tetranucleotídeo	CCACAACA R: CAACAGCTCTTGACAC TTGGA F: AGCTCCTGTTCTCCAC	63C	13	321- 405	<i>P. dominicana</i>	0.800	0.931
CB06	Dinucleotídeo	AGAT R: TCGCACAGATTGAGG GACAGAT F: ACCAGTAGAGTGCTTT	63C	2	163- 165	<i>C. brissonii</i>	0.200	0.189
CB02	Tetranucleotídeo	GCCA R: TTGGGTTTCCCAAGC TTTCCCA F: CTGGGAAGGTCTTGG	67C	11	300- 360	<i>C. brissonii</i>	1.000	0.889
SF03	Dinucleotídeo	CATTT R: GTGATGCTCACATCTT TCACAC F: CGCTTCATCCATCCAT	64C	9	146- 200	<i>S. frontalis</i>	1.000	0.868
CB07	Tetranucleotídeo	R: GACATGAGAGGACAC AATGC	61C	8	191- 291	<i>C. brissonii</i>	0.1000	0.889**

Figura 4.2: Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado, para todas as amostras de *S. similis* analisadas em conjunto.

4.1.3. Seleção de Marcadores para *Cyanoloxia brissonii*

Foram testados 18 locos para *Cyanoloxia brissonii*, sendo que destes, oito (Tabela 4.4) foram considerados informativos e genotipados em 73 amostras, em sua grande maioria, de animais provenientes de apreensão e, portanto, sem origem conhecida. Cada uma das 73 amostras foi genotipada para todos os locos até três vezes. Amostras que não apresentaram sucesso de amplificação após as tentativas – três amostras - foram consideradas como dados faltando (*missing data*), resultando em uma base de dados de 70 amostras.

Tabela 4.4: Oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites desenvolvidos para *Cyanoloxia brissonii*: nome, motivo repetitivo, sequências dos *primers*, temperaturas de hibridação (TH), número de alelos (NA), diferenças de tamanho entre os menores e maiores alelos (range), espécie para a qual o loco foi desenvolvido e heterozigose observada (Ho) e esperada (He) - *0.01 ≤ p valor ≤ 0.05, **p valor ≤ 0.01.

<i>C. brissonii</i>	Motivo repetitivo	<i>primer</i> (5'-3')	TH	NA	Range	espécie-específico	Ho	He
CB04	Tetranucleotídeo	F:TCAGCAACAGTATGAG GGCAGT R:AGGCTTGTGCAGGTGT CATT F:ATCCATCCATCCATGCA	67C	13	368-416	<i>P. dominicana</i>	0,901	0,908
CB08	Tetranucleotídeo	TCC R:TTGGCTCTGGTAGGTG ATGAGGTT F:ACCAGTAGAGTGCTTTG	66C	6	146-170	<i>C. brissonii</i>	0,488	0,491
CB02	Tetranucleotídeo	CCA R:TTGGGTTTCCCAAGCTT TCCCA F:TGTTGTGGAGACACCTT	67C	15	296-352	<i>C. brissonii</i>	0,893	0,899
CB09	Heptanucleotídeo	GGCTT R:AAGCGGTTACACCTTC CCAGAA F:GCAGCTGATGACGCTG	66C	9	226-282	<i>C. brissonii</i>	0,790	0,795
PD04	Tetranucleotídeo	GAATTT R:AGCAAGATTTGGCATGT CGCCT F:GCAAAGGCACAATGAA	58C	11	159-199	<i>P. dominicana</i>	0,594	0,828**
CB05	Tetranucleotídeo	GGAGTCCTGA R:TCAGGCAGTTCTCTCCC AGTATGT F:AAGAAGGACATGAGCG	67C	12	253-297	<i>C. brissonii</i>	0,837	0,843
CB03	Tetranucleotídeo	CACAGA R:TGGTTCCTGTTGGCAAT CCTGA F:ACTGTGCTCTCAGACCC	67C	14	321-389	<i>C. brissonii</i>	0,851	0,857
PD02	Tetranucleotídeo	ATATTAC R:ATGAAGTCCACCTGTCA ATGCAGC	66C	15	230-290	<i>P. dominicana</i>	0,876	0,883

O número de alelos variou de seis (CB08) a 15 (CB02), a variação no tamanho dos alelos variou de 24 (CB08) a 68 (CB03) pares de bases (ou seis a 17 unidades de repetição para tetranucleotídeos) e as heterozigoses observada e esperada variaram respectivamente de 0.488 (CB08) a 0.901

(CB04) e 0.491 (CB08) a 0.908 (CB04). Não foi encontrado desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do PD04, cujo desvio foi altamente significativo mesmo após correção para múltiplas comparações.

As distribuições das frequências alélicas (Figura 4.3) mostram que os locos selecionados são todos polimórficos.

Figura 4.3: Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado para *C. brissonii*

Foram sexados 15 indivíduos, dos quais 11 eram machos e quatro fêmeas. Nenhum dos locos apresentou desvios ligados ao sexo, entretanto, todas as fêmeas analisadas são homozigotas para o loco CB08. Todavia, como o número de fêmeas é muito baixo, torna-se muito complicada a realização de uma inferência consistente do posicionamento de locos em cromossomos sexuais.

O programa Micro-checker (Van Oosterhout, 2004) indicou a presença de desvios, possivelmente devido à presença de alelos nulos, no loco PD04, que foi retirado das análises subsequentes.

4.1.4. Seleção de Marcadores para *Sporophila frontalis*

Foram testados 20 marcadores em 25 amostras de indivíduos cedidos pelo Museu Capão da Imbuia (Curitiba, Paraná), coletados em Antonina, Paraná. Infelizmente, dos 20 apenas quatro (Tabela 4.5) apresentaram boas amplificações e genotipagens de qualidade. Assim, esta parte do trabalho tornou-se exploratória.

Tabela 4.5: Oligonucleotídeos iniciadores de microsatélites desenvolvidos para *Sporophila frontalis*: nome, motivo repetitivo, sequências dos *primers*, temperaturas de hibridação (TH), número de alelos (NA), diferenças de tamanho entre os menores e maiores alelos (range), espécie para a qual o loco foi desenvolvido e heterozigose observada (Ho) e esperada (He) - * $0.01 \leq p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

S. <i>frontalis</i>	Motivo repetitivo	primer (5'-3')	TH	NA	Range	espécie-específico	Ho	He
CB01	Dinucleotídeo	F:GCATCTATTACACTCA GTAAACCCAGC R:AGGGCTGTGCCTGTG TTTCTTTCT F:AGCTGTAATCCTCCTC	66C	20	194-246	<i>C. brissonii</i>	0.880	0.936
PD03	Tetranucleotídeo	CCACAACA R:CAACAGCTCTTGCACT TGGA F:TGACTCTGTCAGGTCT	63C	20	315-411	<i>P. dominicana</i>	0.913	0.920
SF01	Dinucleotídeo	GTCT R:ATGCAGCAAAGTCCAT ACCC F:CTGGGAAGGTCTTGG	66C	4	284-290	<i>S. frontalis</i>	0.250	0.562**
SF03	Dinucleotídeo	CATTT R:GTGATGCTCACATCTT TCACAC	63C	13	136-208	<i>S. frontalis</i>	0.760	0.854

O número de alelos variou de quatro (SF01) a 20 (CB01 e PD03) e os tamanhos alélicos, de seis pares de bases (ou três unidades de repetição) para o loco SF01 a 72 pares de bases (ou 36 unidades de repetição) para o loco SF03. A heterozigose observada variou de 0.250 (SF01) a 0.913 (PD03) e a esperada de 0.562 (SF01) a 0.936 (CB01). O loco SF01 apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, que deixa de ser significativo após correção para múltiplas comparações.

As distribuições dos diferentes alelos para cada loco encontram-se na figura 4.4, demonstrando seu polimorfismo.

Figura 4.4: Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado para *S. frontalis*.

Foram sexados 12 indivíduos e não foi detectado nenhum loco ligado a cromossomo sexual. Contudo, o programa Micro-checker (Van Oosterhout, 2004) indicou a presença de desvios, possivelmente devido à presença de alelos nulos, no loco SF01, devido à grande quantidade de indivíduos homozigotos.

4.2. Diferenciação Populacional e Inferência da Estrutura Genética - *Paroaria dominicana*

Foram genotipados 08 locos para 134 amostras de *P. dominicana*, tanto com origem conhecida, quanto provenientes de apreensão (Apêndice 1). As amostras que não apresentaram resultados satisfatórios após três repetições foram consideradas como “dados faltando” (*missing data*). Com isso, cinco amostras que apresentaram muitos dados faltando foram excluídas das análises, que continuaram então com 129 amostras. Destas 129, 71 foram selecionadas dentre as amostras coletadas em natureza, com origem conhecida, e que faziam parte de localidades com no mínimo seis indivíduos amostrados (Figura 4.5).

Figura 4.5: Mapa com todas as localidades para as quais foram obtidas amostras de *Paroaria dominicana*. Localidades com nome e retângulo foram utilizadas nas análises ($n \geq 6$).

As frequências alélicas de todas as amostras analisadas em conjunto são apresentadas na figura 4.6 e mostra que todos os locos são polimórficos. Os locos menos polimórficos (SF02 e SF03) foram mantidos nas análises, pois podem ser informativos para estudos populacionais caso existam diferentes alelos fixados para diferentes populações. A ausência de

alguns alelos na distribuição (por exemplo, loco PD01), provavelmente está ligada à amostragem. Existe também a possibilidade dos locos que apresentam esse perfil não seguirem um modelo de mutação passo-a-passo (SMM, *stepwise mutation model*, Kimura & Ohta, 1978) estrito, com mutações de mais de uma unidade de repetição.

Figura 4.6: Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado, para todas as amostras de *P. dominicana* analisadas em conjunto.

Este banco de dados utilizado, com todas as amostras de *P. dominicana* analisadas como um grande grupo apresenta três locos com desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg: PD01 ($p=0.000$), PD03 ($p=0.000$) e CB02 ($p=0.028$). Também foi inferido que três pares de locos estariam em potencial desequilíbrio de ligação: SF01/PD01 ($0.01 \leq p \leq 0.05$), SF01/SF02 ($0.01 \leq p \leq 0.05$) e PD03/PD02 ($p \leq 0.01$). Todos os desvios, com exceção dos dois primeiros (desvio do HWE para PD01 e PD03) deixam de ser significativos se aplicada correção para múltiplas comparações. Entretanto, esses desvios podem estar indicando que populações diferentes estão sendo misturadas na base de dados com todas as amostras em conjunto, e

podem, portanto, indicar que existe algum tipo de estruturação genética na espécie.

4.2.1. Análise de diferenciação populacional com definição de populações a priori

Foram definidas como populações potenciais as localidades de coleta com no mínimo seis amostras por localidade, totalizando 71 amostras (Figura 4.5):

1. Beira Rio, n=11
2. Canudos, n=8
3. Feira de Santana, n=7
4. Paraíba, n=13
5. Parnaguá, n=7
6. Petrolina, n=13
7. Trindade, n=6
8. Vitória da Conquista, n=6

A análise de variância molecular (AMOVA, tabela 4.6) mostrou que apenas pouco mais de 3% da variação são explicados por diferenças entre as populações.

Tabela 4.6: Análise de variância molecular (AMOVA) para as amostras de *P. dominicana* divididas *a priori*, com base nas localidades de coleta.

Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre populações	32.909	0.09178	3.00380
Entre indivíduos dentro das populações	192.428	0.15953	5.22119
Dentro dos indivíduos	195.000	2.80421	91.77501
Total	420.337	3.05553	

Contudo, a análise de diferenciação populacional apontou diferenças estatisticamente significativas entre diversos pares de populações. Os

valores de F_{st} (Tabela 4.7, A), assim como os de p (Tabela 4.7, B) estatisticamente significativos estão em negrito.

Tabela 4.7: Análise de F_{st} (A) utilizando as amostras de *P. dominicana* divididas *a priori*, com base nas localidades de coleta. Os valores para os quais o p (B) foi significativo estão em negrito.

A)

	Beira Rio	Canudos	Feira	Paraíba	Parnaguá	Petrolina	Trindade	Vitória
1	*							
2	0.05290	*						
3	0.03565	0.03296	*					
4	0.00477	0.02651	0.02359	*				
5	0.02613	0.05524	0.04847	0.03921	*			
6	0.00504	0.02915	0.02534	-0.00712	0.03063	*		
7	0.02970	0.04487	0.04208	0.02134	0.08416	0.02422	*	
8	0.02198	0.08770	0.05566	0.07709	0.04433	0.02837	0.08900	*

B)

	Beira Rio	Canudos	Feira	Paraíba	Parnaguá	Petrolina	Trindade	Vitória
1	*							
2	0.00055	*						
3	0.01469	0.02090	*					
4	0.40855	0.02476	0.03538	*				
5	0.06909	0.00462	0.01937	0.00912	*			
6	0.39970	0.01075	0.02006	0.79687	0.02013	*		
7	0.07554	0.03100	0.02136	0.06836	0.00261	0.03234	*	
8	0.20512	0.00140	0.02396	0.00020	0.07970	0.04007	0.00859	*

De acordo com os resultados apontados na tabela 4.7, *P. dominicana* apresenta, para esta amostragem e os oito locos analisados, uma estruturação genética significativa. Os valores significativos de F_{st} variaram de 0.023 a 0.089, sendo que os pares de localidades com diferenças significativas foram: Beira Rio/Canudos, Beira Rio/Feira de Santana, Canudos/Feira de Santana, Canudos/Paraíba, Canudos/Parnaguá, Canudos/Petrolina, Canudos/Trindade, Canudos/Vitória da Conquista, Feira de Santana/Paraíba, Feira de Santana/Parnaguá, Feira de Santana/Petrolina, Feira de Santana/Trindade, Feira de Santana/Vitória da Conquista, Paraíba/Parnaguá, Paraíba/Vitória da Conquista, Parnaguá/Petrolina, Parnaguá/Trindade, Petrolina/Trindade, Petrolina/Vitória da Conquista e Trindade/Vitória da Conquista. Já os pares de localidades que não apresentaram valores de F_{st} estatisticamente significativos estão descritos na tabela 4.8.

Tabela 4.8: Pares de localidades de coleta de *P. dominicana* que **não** apresentaram valores de *Fst* significativos

<i>Localidade</i>	<i>Localidades em relação às quais o <i>Fst</i> não foi estatisticamente significativo</i>
Beira Rio	Paraíba, Petrolina, Parnaguá, Trindade, Vitória da Conquista
Canudos	-
Feira de Santana	-
Paraíba	Beira Rio, Petrolina, Trindade
Petrolina	Beira Rio, Paraíba,
Parnaguá	Beira Rio, Vitória da Conquista
Trindade	Beira Rio, Paraíba
Vitória da Conquista	Beira Rio, Parnaguá

Como mostrado na tabela 4.8, a localidade de Beira Rio (sudoeste da amostragem) não apresenta diferenciação estatisticamente significativa em relação às localidades Paraíba, Petrolina e Trindade (centro-nordeste da amostragem) e às localidades Parnaguá e Vitória da Conquista (a oeste e sul da amostragem respectivamente). Canudos e Feira de Santana (ambas a leste da amostragem) não se agruparam com amostras de nenhuma outra localidade, indicando que apresentam certo grau de isolamento em relação às outras localidades. Paraíba (nordeste) não pode ser diferenciada das localidades de Beira Rio (sudoeste), Petrolina e Trindade (centro-nordeste). Parnaguá (oeste) não é diferenciada de Beira Rio e Vitória da Conquista (ambas a sudoeste). Petrolina (centro-nordeste) se agrupa com Beira Rio (sudoeste) e Paraíba (nordeste). Trindade (nordeste), não é diferenciada de Beira Rio (sudoeste) e Paraíba (nordeste). Por fim, Vitória da Conquista (sul), se agrupa com Beira Rio e Parnaguá (sudoeste).

Os valores gerados pela análise de *Fst* indicam que há diferenciação significativa entre grupos de amostras que exibem uma discreta correlação com origem geográfica, e que esses grupos de amostras podem ser subestruturados. Beira Rio surge como um conector entre as localidades, com exceção de Canudos e Feira de Santana.

Se for aplicada correção para múltiplas comparações ao valor de alfa, levando em conta oito populações e oito locos, apenas Beira Rio/Canudos e

Paraíba/Vitória da Conquista apresentassem diferenciação populacional estatisticamente significativa.

As amostras das localidades Canudos, Feira de Santana, Parnaguá, Petrolina e Trindade não apresentaram desvios significativos do HWE. As amostras de Paraíba apresentaram desvio significativo no loco PD01 ($p \leq 0.001$), em Beira Rio o desvio foi detectado no loco SF02 ($0.01 \leq p \leq 0.05$). Já as amostras de Vitória da Conquista apresentaram desvio significativo no loco PD03 ($0.01 \leq p \leq 0.05$). Após correção para múltiplas comparações, logicamente apenas o loco PD01 na localidade Paraíba permanece com p valor significativo para desvio do HWE, que pode ser devido ao baixo número amostral ou mesmo a indivíduos homozigotos para alelos raros presentes na amostragem dessa localidade. Nenhum loco apresentou desequilíbrio de ligação após correção para múltiplas comparações.

O teste de Mantel (Figura 4.7), que busca sinais de isolamento por distância, não indicou nenhuma correlação da distância genética com a distância geográfica ($r^2 = 0.0016$).

Figura 4.7: Gráfico de correlação de distância geográfica com distância genética (Mantel) obtido utilizando o programa Genalex (Peakall & Smouse, 2006), com as amostras de *P. dominicana* divididas com base nas localidades de coleta.

Foi realizada também uma análise dos mesmos dados utilizando o Rst (Slatkin, 1995). A análise de variância molecular (Tabela 4.9) indicou que 12% da variação encontram-se entre das populações, proporção maior do que a inferida através do Fst.

Tabela 4.9: Análise de variância molecular (AMOVA, com base no Rst) para as amostras de *P. dominicana* divididas *a priori*, com base nas localidades de coleta.

Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre populações	29743.709	186.89633	12.96403
Entre indivíduos dentro das populações	75062.823	63.11572	4.37801
Dentro dos indivíduos	77030.500	1191.64107	82.65796
Total	181837.032	1441.65312	

Foram encontrados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas no loco PD01, que deixa de ser significativo após correção para múltiplas comparações. Também foram inferidos pares de locos em desequilíbrio de ligação em todas as populações, com imensa variação entre quais e quantos locos estariam em desequilíbrio em cada população, e nenhum significativo após correção para múltiplas comparações.

A importância dos resultados reside no fato de que a tendência geral foi semelhante ao indicado pelo Fst. A maioria das localidades passou a apresentar diferenças significativas com um menor número de localidades em relação aos resultados obtidos para as estimativas de Fst. Esse resultado deve ser devido à grande variância nos resultados obtidos para a estimativa de Rst, assim como à melhor adaptação do Fst aos dados. As exceções foram Beira Rio e Paraíba, que passaram a apresentar diferenças significativas com mais localidades do que em relação ao Fst. Beira Rio passou a se diferenciar de Parnaguá, Petrolina e Trindade, enquanto que Paraíba passou a apresentar diferenciação em relação a Trindade. Petrolina continuou apresentando diferenças significativas com cinco localidades, porém ao invés de Feira de Santana, passou a ser diferenciada de Beira Rio. Com a correção para múltiplas comparações apenas Beira Rio e Canudos continuam com diferenciação significativa.

4.2.2. Análise de diferenciação populacional através de dois métodos de partição de amostras: DAPC e Structure

Inicialmente foi realizada a análise discriminante de componentes principais – DAPC (Jombart *et al.*, 2010), sem definição *a priori* de quais seriam as populações, através do método de partição das amostras em diferentes grupos.

O programa identificou três *clusters* na base de dados (Figura 4.8), cujas distribuições não apresentaram correlação clara com a geografia, entretanto, é possível notar uma diferença de frequência de cada um nas diferentes localidades (figura 4.9).

Figura 4.8: Valores do *Bayesian Information Criterion* (BIC) para diferentes números de *clusters* inferidos da base de dados parcial de *Paroaria dominicana* (esquerda) e gráfico dos três *clusters* inferidos (direita), ambos utilizando a análise discriminante de componentes principais (DAPC) do pacote Adegenet (Jombart *et al.*, 2010)

Dois fatores chamam a atenção na figura 4.9. O primeiro é que a presença do *cluster* #1 (azul) apenas nas localidades Beira Rio, Parnaguá, Petrolina e Vitória da Conquista, sendo predominante nesta última. O segundo, é a proximidade das frequências observadas para Trindade em relação a Canudos, e Paraíba em relação a Feira de Santana, todas apenas com os *clusters* #2 e #3, mas com diferença em relação a qual é o mais comum em cada localidade - #2 para Trindade e Canudos e #3 para Paraíba e Feira de Santana.

Figura 4.9: Gráficos mostrando a diferença de frequência de cada *cluster* inferido pelo programa Adegenet em cada localidade de coleta de amostras de *Paroaria dominicana*.

A seguir, foram realizadas análises com programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), que também identificou a presença de três *clusters* (Figura 4.10). O gráfico de barras gerado nesta análise inicial (figura 4.11), que teve como base as localidades de coleta, mostra três grupos distintos, apesar da mistura entre as localidades. Um grupo foi formado pelas localidades Canudos e Feira de Santana (#4 e #5) com predominância de azul, um grupo formado pelas localidades Paraíba, Petrolina e Trindade (#6, #7 e #8), com predominância de vermelho e um grupo formado pelas localidades de Parnaguá e Vitória da Conquista (#2 e #3), com predominância de verde. Por fim, a localidade Beira Rio (#1), que apresenta predominância de vermelho seguido de verde, e que poderia ser agrupada tanto com Parnaguá e Vitória, quanto com Paraíba, Petrolina e Trindade.

Figura 4.10: DeltaK (Evanno *et al.*, 2005) obtido dos dados do programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), com a inferência do mais provável número de *clusters* presentes na amostragem (K=3).

Figura 4.11: Gráfico de barras gerado pelo programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), com as amostras separadas em localidades de coleta. #1=Beira Rio, #2=Parnaguá, #3=Vitória da Conquista, #4=Canudos, #5=Feira de Santana, #6=Paraíba, #7=Petrolina, e #8=Trindade.

Figura 4.12: Gráfico triângulo gerado pelo programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), com as amostras separadas em localidades de coleta. #Vermelho=Beira Rio, #Azul=Parnaguá, #Verde=Vitória da Conquista, #Lilás=Canudos, #Amarelo=Feira de Santana, #Azul-claro=Paraíba, #Laranja=Petrolina, e #Roxo escuro=Trindade.

O gráfico triângulo (figura 4.12) gerado pela mesma análise mostra a relação descrita acima de forma mais clara, com Canudos e Feira de Santana (lilás e amarelo) agrupadas entre si e isoladas das outras localidades, Trindade, Paraíba e Petrolina (roxo escuro, azul claro e laranja) agrupadas entre si, Parnaguá e Vitória da Conquista (azul e verde, respectivamente) agrupadas, e os últimos dois grupos ligados por Beira Rio (vermelho).

Através da realização de outra análise, dessa vez assumindo *a priori* que existem três grupos na amostragem ($k=3$), o programa alocou cada amostra a cada um deles. O *cluster* #1, denominado nordeste, foi formado pelas localidades de coleta Beira Rio, Petrolina, Trindade e Paraíba. O *cluster* #2, denominado leste, foi formado pelas localidades Feira de Santana e Canudos e o #3, denominado sudoeste, por Vitória da Conquista e Parnaguá (Figura 4.13). A Figura 4.13 mostra que os *clusters* são bem definidos e são diferenciados.

Figura 4.13: Gráfico de barras gerado pelo programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) quando são assumidos três *clusters*. #1 (nordeste) =Beira Rio, Petrolina, Trindade e Paraíba, #2 (leste) =Canudos e Feira de Santana e #3 (sudoeste) Vitória da Conquista e Parnaguá.

A seguir, foi realizada uma análise uma nova análise de diferenciação populacional estimando o F_{st} . Foi testada a diferenciação entre os três *clusters* sugeridos pelo Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) – com Beira Rio agrupada ao nordeste. Foi obtida uma diferenciação altamente significativa, com os valores de F_{st} variando de 0.022 (entre o *cluster* do nordeste com Beira Rio e os outros dois) e 0.036 entre o sudoeste e o leste (Tabela 4.10, A). Os valores de p variaram de 0.00020 a 0.00069 (Tabela 4.10, B). Mesmo após correção para múltiplas comparações, os valores de p continuariam altamente significativos.

Tabela 4.10: Análise de F_{st} (A) utilizando os *clusters* inicialmente sugeridos pelo Structure, agrupando Beira Rio com o *cluster* nordeste. Os valores para os quais o p (B) foi significativo estão em negrito.

A)

	Ne/Beira	Sudoeste	Leste
1	0.00000		
2	0.02224	0.00000	
3	0.02266	0.03655	0.00000

B)

	Ne/Beira	Sudoeste	Leste
1	*		
2	0.00020	*	
3	0.00069	0.00040	*

Todavia, não apenas os gráficos gerados pelo programa Structure mostram que a localidade de Beira Rio surge como uma ligação entre os grupos nordeste e sudoeste da amostragem, como as análises utilizando F_{st} com base nas localidades de coleta mostram um padrão semelhante. O programa Structure agrupou Beira Rio com o *cluster* nordeste, entretanto, geograficamente faria sentido manter essa localidade agrupada com o grupo

sudoeste (Figura 4.5), inclusive como uma conexão entre as localidades de Parnaguá e Vitória da Conquista.

Para determinar o melhor agrupamento das amostras, foram realizadas três novas análises: (1) com o programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) agrupando Beira Rio com o *cluster* do sudoeste (#1 Paraíba, Trindade e Petrolina; #2 Canudos e Feira de Santana e #3 Parnaguá, Beira Rio e Vitória) – figura 4.14; (2) com o programa Structure, mas desta vez utilizando o modelo que não permite ancestralidade mista para os indivíduos, o que seria interessante para revelar uma estruturação genética sutil e; (3) outra estimativa de F_{st} utilizando o mesmo agrupamento, com Beira Rio no *cluster* sudoeste.

Na nova análise realizada com o programa Structure (Prichard *et al.*, *op. cit.*) foi obtida uma divisão clara, no entanto, com uma maior mistura dos clusters #2 (Canudos e Feira de Santana) e #3 (Paraíba, Petrolina e Trindade), evidenciada pelo gráfico de barras (Figura 4.14).

Figura 4.14: Gráfico em barras obtido utilizando o programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.* 2000), quando são assumidos três grupos na amostragem ($k=3$), com Beira Rio agrupada ao *cluster* sudoeste. *Cluster* #1=sudoeste, #2=leste e #3=nordeste.

Na análise realizada sem a possibilidade de ancestralidade mista é possível notar, além da mistura entre os *clusters*, um indivíduo possivelmente oriundo do *cluster* nordeste (vermelho, #1), representado no *cluster* leste (azul, #2) – Figura 4.15.

Figura 4.15: Gráfico em barras obtido utilizando o programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), quando são assumidos três grupos na amostragem ($k=3$), sem ancestralidade em mais de um *cluster*. Vermelho=nordeste, azul=leste e verde=sudoeste.

Já na nova análise de F_{st} foi detectada diferenciação significativa entre os três *clusters* (Tabela 4.11, A) com valores de p altamente significativos (0.00004 a 0.0015) - Tabela 4.11, B. O valor de F_{st} mais alto encontrado foi entre o grupo sudoeste em relação ao leste (0.037) e o menor entre os grupos nordeste e leste (0.0187). Mesmo realizando correção para múltiplas comparações realizadas, todos os valores de F_{st} continuam estatisticamente significativos.

Tabela 4.11: Análise de F_{st} (A) utilizando três *clusters* com Beira Rio agrupada ao sudoeste.. Os valores para os quais o p (B) foi significativo estão em negrito.

A)	Nordeste	Sudoeste/Beira	Leste
1	*		
2	0.0209	*	
3	0.0187	0.0375	*
B)	Nordeste	Sudoeste/Beira	Leste
1	*		
2	0.0002	*	
3	0.0015	0.00004	*

A proximidade entre os *clusters* nordeste e leste demonstrada pelas análises acima é confirmada pelos valores de estimativa de número de migrantes entre os *clusters*, cujos valores são semelhantes entre nordeste e sudoeste e nordeste e leste (Tabela 4.12).

Tabela 4.12: número absoluto de migrantes entre os três *clusters* inferidos com base nos valores de F_{st} .

Matriz de valores de M ($M=2Nm$, dados diplóides)			
	nordeste	sudoeste (com Beira)	leste
nordeste	*		
sudoeste	26.24170	*	
leste	26.21785	13.70125	*

As análises seguintes foram realizadas assumindo que a presente amostragem de *P. dominicana*, utilizando os oito locos selecionados, pode ser dividida em três *clusters* principais, que podem apresentar subestruturação, e que têm relação com a geografia, sendo um localizado a nordeste da amostragem, um a leste e um a sudoeste. Também está sendo assumido que Beira Rio faz parte do *cluster* sudoeste e que funciona como uma ligação em relação ao *cluster* nordeste.

4.2.3. Estrutura genética obtida para a amostragem de *P. dominicana*

A tabela 4.13 mostra o tamanho amostral (N), número de alelos (N_a) e heterozigotes observada (H_o) e esperada (H_e) por loco por *cluster*. Já a tabela 4.14 apresenta as médias de H_o e H_e .

Foram detectados diferentes níveis de desequilíbrio de ligação inferidos para todos os *clusters*, que variou em termos de quantidade de locos e quais pares estariam ligados para cada *cluster*. Se for realizada uma correção do valor de alfa para múltiplas comparações, nenhum par de locos continua apresentando desequilíbrio estatisticamente significativo. Entretanto, esse desequilíbrio pode representar alguma subestruturação dentro dos *clusters*, como evidenciado pelos valores de F_{st} para cada localidade de coleta. Não foi detectado desvio de Hardy-Weinberg significativo em praticamente nenhum loco para nenhum *cluster*, com exceção do loco PD01 para o *cluster* nordeste, com valor de p significativo ($p \leq 0.001$). Entretanto, esse desvio ocorre somente na localidade Paraíba, e pode estar sendo inferido pela presença de dois alelos raros na amostragem que aparecem apenas em homozigose nesta localidade.

Tabela 4.13: Tamanho amostral (N), número de alelos (Na) e heterozigoses observada (Ho) e esperada (He) por loco por *cluster*. *p significativo após correção para múltiplas comparações.

<i>Cluster</i>	<i>Loco</i>	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
Sudoeste	SF01	24	3,000	0,363	0,321
	PD01	24	13,000	0,750	0,911
	PD03	24	8,000	0,478	0,772
	CB02	22	15,000	0,863	0,926
	CB01	24	12,000	0,750	0,910
	PD02	24	11,000	0,666	0,835
	SF02	24	2,000	0,291	0,311
	CB03	23	15,000	0,833	0,861
Leste	SF01	14	2,000	0,533	0,404
	PD01	15	10,000	0,800	0,889
	PD03	15	12,000	0,933	0,905
	CB02	13	9,000	0,733	0,816
	CB01	15	8,000	0,866	0,862
	PD02	15	9,000	0,933	0,896
	SF02	14	3,000	0,400	0,503
	CB03	15	11,000	0,800	0,871
Nordeste	SF01	30	3,000	0,225	0,206
	PD01	32	14,000	0,625*	0,896
	PD03	32	14,000	0,843	0,883
	CB02	30	22,000	0,928	0,948
	CB01	32	11,000	0,968	0,876
	PD02	32	8,000	0,875	0,814
	SF02	32	3,000	0,483	0,465
	CB03	32	19,000	0,935	0,934

Tabela 4.14: Número médio de alelos e médias das heterozigoses observada (Ho) e esperada (He) por *cluster*. *p significativo após correção para múltiplas comparações.

	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
Nordeste	11.75	0.735*	0.753
Sudoeste	9.87	0.624	0.731
Leste	8.00	0.750	0.768

A figura 4.16 mostra que as frequências alélicas por loco para cada um dos *clusters* são, no geral, distintas entre os *clusters*, assim como mostram também a presença alelos exclusivos em cada *cluster*.

Figura 4.16: Frequências alélicas para cada loco em cada *cluster* inferido para *P. dominicana*.

Com o objetivo de entender melhor a influência dos locos que apresentaram maiores desvios do equilíbrio de ligação, foram realizadas outras três análises exploratórias da mesma base de dados. A primeira, sem os locos PD01 e PD03, a segunda sem PD02 e PD03 e a terceira sem o loco PD01. Na primeira nenhum *cluster* apresentou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, entretanto leste e sudoeste passam a apresentar potencial desequilíbrio de ligação em outros pares de locos. Na segunda, todos os *clusters* apresentam outros pares em potencial desequilíbrio de ligação, e leste e nordeste apresentam desvio significativo de Hardy-Weinberg no loco PD01. Por fim, na análise sem o loco PD01, apenas nordeste apresentou desvio do EHW no loco PD03, entretanto os

três *clusters* apresentaram desequilíbrio de ligação em outros pares de locos.

Portanto, é possível concluir, a partir da análise dos resultados de *clustering* obtidos com o programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), dos resultados do Fst mostrados acima, e com base na localização de cada ponto de coleta em questão, que faz sentido manter Beira Rio agrupada com Parnaguá e Vitória da Conquista, tendo em mente no entanto que esta localidade é um centro de fluxo gênico com o grupo aqui chamado de nordeste (Paraíba, Petrolina e Trindade). A maior proximidade do *cluster* nordeste (#3) com o leste (#2) pode ser explicada, como mencionado anteriormente, pela proximidade geográfica entre localidades alocadas em nordeste e leste.

4.2.4. Inferências sobre a história demográfica de P. dominicana

Foram realizadas algumas análises procurando entender quais fatores geraram a distribuição atual da variabilidade genética de *P. dominicana*, assim como para testar a hipótese de expansão populacional recente proposta por Nodari (2008). Foram utilizados testes que detectam sinais de flutuações populacionais passadas: um de expansão – *kg test* (Reich *et al.*, 1998) – e três de gargalo populacional – variação na frequência de alelos raros (Luikart *et al.*, 1998), relação entre número de alelos e amplitude da distribuição de tamanhos alélicos (Garza & Williamson, 2001) e excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996). Os testes foram realizados utilizando réplicas tanto da amostragem como um todo (indivíduos com origem e indivíduos provenientes de apreensão), assim como para os grupos obtidos através das análises anteriores (três *clusters*, com Beira Rio agrupada com Parnaguá e Vitória da Conquista).

Não foram obtidos valores estatisticamente significativos nem para o teste para cada loco (*k*) e nem para o teste entre locos (*g*) – Tabela 4.15, o que significa que a análise não identificou sinal de expansão populacional recente.

Tabela 4.15: Testes de expansão populacional kgtest (Reich *et al.*, 1999) para *P. dominicana* para as amostras em conjunto e para os *clusters* nordeste, leste e sudoeste.

	Nordeste: Paraíba, Petrolina, Trindade	Sudoeste: Beira Rio, Parnaguá, Vitória	Leste: Canudos, Feira	Todas as amostras
nº de locos com valores de K negativos	6	6	4	5
p valor (teste k)	0,1257	0,1257	0,6034	0,3310
teste g	1,0896	0,6257	0,6831	0,8323
Valor de corte para o g	0,19	0,19	0,19	0,15

O teste de frequência de alelos raros apresentou a forma “L” esperada para populações que não sofreram gargalos populacionais recentes (Figura 4.17).

Figura 4.17: Distribuição do número de alelos para cada classe de frequência (Luikart *et al.* 1998), para todas as amostras de *P. dominicana* analisadas em conjunto e em cada um dos *clusters*.

Já os testes de relação entre número de alelos e amplitude da distribuição de tamanhos alélicos e excesso de heterozigotos indicaram a

possível ocorrência de um gargalo populacional recente para a espécie (Tabelas 4.16 e 4.17), o que surge como uma nova e interessante hipótese a ser testada mais a fundo futuramente.

Tabela 4.16: Teste Garza & Williamson (2001) para *P. dominicana* para as amostras em conjunto e para os *clusters* nordeste, leste e sudoeste.

	<i>P. dominicana</i>	Sudoeste	Leste	Nordeste
Média	0.36287	0.32471	0.32768	0.33107

Tabela 4.17: Teste excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996) para *P. dominicana* para as amostras em conjunto e para os *clusters* nordeste, leste e sudoeste.

<i>Modelo mutacional</i>	<i>Todas as amostras em conjunto</i>	<i>Nordeste</i>	<i>Sudoeste</i>	<i>Leste</i>
IAM	excesso de het p=0.0019	excesso de het p=0.0097	excesso de het p=0.0019	excesso de het p=0.0019

4.2.5. Teste de atribuição e inferências sobre a mais provável origem de indivíduos de *P. dominicana* apreendidos do comércio ilegal em São Paulo

Foi realizada uma análise de atribuição dos indivíduos de apreensão em relação aos três *clusters* descritos – nordeste, sudoeste e leste.

Em todas as 40 réplicas realizadas, as amostras sem origem conhecida foram atribuídas ao *cluster* nordeste. Todas as atribuições realizadas apresentaram probabilidade maior do que 50%, entre 0.554 e 0.713 para o modelo com ancestralidade mista, e 0.782 e 0.999 para o modelo sem ancestralidade mista.

Os gráficos de barras (Figuras 4.18 e 4.19) mostram a proximidade do grupo de amostras apreendidas (#0) com o *cluster* nordeste (#1) nos modelos com (A) e sem (B) ancestralidade mista.

Figura 4.18: Gráfico fornecido pelo programa Structure após análise de atribuição das amostras provenientes de apreensão, no modelo com ancestralidade mista. #0=apreensão, #1=nordeste, #2=leste e #3=sudoeste.

Figura 4.19: Gráfico fornecido pelo programa Structure após análise de atribuição das amostras de *P. dominicana* provenientes de apreensão, no modelo sem ancestralidade mista. #0=apreensão, #1=nordeste, #2=leste e #3=sudoeste.

Outra representação gráfica interessante é dada pelo gráfico triângulo (Figura 4.20), na qual pode-se perceber claramente a proximidade das amostras apreendidas (pontos vermelhos) com o *cluster* nordeste (pontos verdes) e a maior distância em relação aos *clusters* leste (azul) e sudoeste (amarelo). É interessante notar que foi utilizado o comando “POPFLAG=1 ONLY”, que diz ao programa em quais amostras utilizar a informação de potencial população de origem. Assim, foi dado ao programa o comando para utilizar a informação *a priori* sobre população de origem apenas para as amostras pertencentes aos *clusters*, e não utilizar informação alguma para as amostras sendo atribuídas. Desta forma, o programa poderia atribuir diferentes amostras a diferentes *clusters*. Isto tanto é verdade, que uma amostra do *cluster* leste, com informação de origem *a priori* foi atribuída ao *cluster* nordeste, mostrando que as amostras de apreensão devem mesmo ter vindo dos mesmos locais.

Figura 4.20: Gráfico triângulo fornecido pelo programa Structure após análise de atribuição das amostras de *P. dominicana* provenientes de apreensão, #vermelho=apreensão, #verde=nordeste, #azul=leste e #amarelo=sudoeste.

Por fim, foi realizada uma análise considerando três *clusters*, mas com informação de localidade de coleta fornecida ao programa.

Figura 4.21: Gráfico triângulo fornecido pelo programa Structure após análise de atribuição das amostras de *P. dominicana* provenientes de apreensão, utilizando as localidades de coleta. #vermelho=apreensão, #verde=Beira Rio, #azul=Parnaguá, #amarelo=Vitória da Conquista, #lilás=Paraíba, #azul claro=Petrolina, #laranja=Trindade, #marrom=Canudos e #ocre=Feira de Santana.

O gráfico triângulo gerado mostra claramente a localidade Vitória da Conquista (amarela) mais isolada, próxima de Parnaguá (azul escuro) e Beira Rio (verde), que por sua vez encontra-se muito próxima da Petrolina (azul claro). As amostras provenientes de apreensão (vermelho) posicionam-se entre Petrolina (azul claro) e Paraíba (lilás), com Trindade (laranja) próxima, e Canudos (marrom) e Feira de Santana (ocre), também próximas, mas mais isoladas das localidades do nordeste e mais próximas entre si. A exceção é uma amostra coletada em Canudos que repetidamente é atribuída ao *cluster* nordeste (Figura 4.21).

4.3. Diferenciação populacional e inferência da estrutura genética – *Saltator similis*

Foram obtidas – entre coletas realizadas e doações - 162 amostras de *S. similis*, entre indivíduos coletados na natureza, com origem conhecida, e indivíduos provenientes de apreensões do comércio ilegal de fauna (Apêndice 1). Entretanto, algumas amostras apresentaram problemas de extração, amplificação e/ou genotipagem e foram retiradas da base de dados, que ficou então com 149 amostras. Destas, 73 tinham origem conhecida, das quais sete eram de localidades com menos de cinco amostras. As localidades com cinco ou mais amostras que foram utilizadas neste trabalho estão na figura 4.22, totalizando 66 amostras.

Figura 4.22: Mapa com todas as localidades para as quais foram obtidas amostras de *Saltator similis*. Localidades com nome e retângulo foram utilizadas nas análises, localidades sem nome e sem retângulos foram desconsideradas por causa do baixo tamanho amostral do ponto (<5). MGN=Bocaiúva, Turmalina, Virgem da Lapa e Jequitinhonha, MGL=Nova Lima, Araponga e Caratinga.

Inicialmente foi feita uma tentativa de agrupar amostras de localidades relativamente próximas, de forma a aumentar o número amostral de cada população potencial, contudo, dada a disparidade nas distâncias entre as localidades, a maior parte das análises acabou sendo realizada com os

quatro pontos de coleta para os quais foi obtida melhor amostragem, sendo eles: Barra do Choça, Correntina, Nova Andradina e Santa Isabel do Rio Preto. As distribuições de frequências dos alelos para todas as 149 amostras estão apresentadas na figura 4.23. Alguns aspectos chamam a atenção, entre os quais podem ser citados: um alelo muito dominante nos locos CB06 e SF01, a falta (provavelmente devido a um artefato de amostragem) do alelo 168 no loco SF03, e a distribuição dos alelos do loco CB03, com frequência muito maior de alelos de tamanho menor em relação aos de tamanho maior, além de grande diferença de número de pares de bases entre os alelos de tamanhos extremos. Essa diferença poderia indicar não apenas que este loco possui altas taxas de mutação, mas também que não apresenta restrições de tamanho, ao contrário da maioria dos locos (Estoup & Cornuet, 2003), o que poderia minimizar o risco do surgimento de alelos com homoplasia de tamanho (SH, do inglês, *size homoplasia*).

Figura 4.23: Distribuição das frequências alélicas em cada loco selecionado, para todas as amostras de *S. similis* analisadas em conjunto.

Foram inferidos diversos pares de locos em potencial desequilíbrio de ligação, entretanto, nenhum continua significativo após correção para múltiplas comparações. Dos seis locos com desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, quatro continuam com desvios significativos após correção para múltiplas comparações (PD03, CB05, CB04 e PD02). Tal cenário pode tanto ser explicado no caso de amostras de populações diferenciadas serem analisadas em conjunto, indicando a existência de algum tipo de estruturação genética, como pode ser consistente com gargalo populacional recente, indicando que flutuações populacionais possam ser responsáveis pela distribuição atual da variabilidade genética da espécie.

Como para *P. dominicana*, a análise da estrutura genética populacional de *Saltator similis* foi dividida em duas abordagens principais: com e sem definição de populações potenciais *a priori*.

4.3.1. Análise de diferenciação populacional com definição de populações a priori

Inicialmente cada localidade (em um raio de aproximadamente 100 km) foi considerada como uma população potencial e localidades isoladas com número amostral menor do que cinco foram desconsideradas (Figura 4.22):

1= Minas Gerais Leste (MGL), N=12

2= Barra do Choça, N=10

3= Minas Gerais Norte (MGN), N=7

4= Correntina, N=11

5= São Paulo, N=5

6= Nova Andradina, N=11

7= Santa Isabel do Rio Preto, N=1

O tamanho amostral (número de cópias do gene), número de alelos, e heterozigose observada e esperada por loco para a todas as amostras da espécie analisadas em conjunto (*S. similis*), e por localidade estão descritos na tabela 4.18.

Tabela 4.18: Tamanho amostral (N), número de alelos (Na) e heterozigos observada (Ho) e esperada (He) para todas as amostras em conjunto e por localidade de coleta de amostra de *Saltator similis*. * p valor significativo após correção para múltiplas comparações.

Localidade de Coleta	Loco	N	Na	Ho	He
<i>S. similis</i>	PD03	292	23	0.801*	0.936
	CB06	286	6	0.167	0.194
	CB05	294	12	0.714*	0.897
	CB02	292	20	0.787	0.896
	SF01	284	3	0.246	0.292
	CB04	294	19	0.775*	0.913
	PD02	294	13	0.639*	0.868
	SF03	292	14	0.815	0.887
	CB03	292	43	0.842	0.931
MGL	PD03	24	14	0.833	0.942
	CB06	22	2	0.181	0.173
	CB05	24	8	0.750	0.862
	CB02	24	12	1.000	0.894
	SF01	24	2	0.166	0.391
	CB04	24	11	0.833	0.902
	PD02	24	8	0.500	0.851
	SF03	22	10	0.727	0.883
	CB03	24	12	1.000	0.880
Barra do Choça	PD03	20	10	0.900	0.9368
	CB06	-	-	-	-
	CB05	18	9	0.777	0.895
	CB02	16	10	1.000	0.900
	SF01	18	2	0.222	0.366
	CB04	20	10	0.700	0.889
	PD02	20	7	0.700	0.773
	SF03	18	7	0.666	0.823
	CB03	18	13	0.888	0.960
MGN	PD03	12	9	1.000	0.939

	CB06	12	2	0.500	0.530
	CB05	14	7	0.714	0.879
	CB02	14	8	0.857	0.912
	SF01	14	2	0.428	0.362
	CB04	14	9	0.428	0.945
	PD02	14	5	0.428	0.736
	SF03	14	5	0.571	0.802
	CB03	14	10	0.857	0.945
Correntina	PD03	22	10	0.909	0.922
	CB06	22	3	0.181	0.177
	CB05	22	8	0.454*	0.896
	CB02	22	7	0.545	0.770
	SF01	22	2	0.090	0.367
	CB04	22	12	0.727	0.913
	PD02	22	8	0.636	0.883
	SF03	22	9	0.909	0.913
	CB03	20	14	0.600*	0.957
SP	PD03	10	9	0.800	0.977
	CB06	10	4	0.600	0.533
	CB05	10	6	0.600	0.866
	CB02	10	5	0.400	0.822
	SF01	-	-	-	-
	CB04	10	6	0.800	0.911
	PD02	10	7	0.800	0.933
	SF03	10	5	0.600	0.822
	CB03	10	9	1.000	0.977
Nova Andradina	PD03	22	12	0.909	0.930
	CB06	20	2	0.300	0.268
	CB05	22	10	0.636	0.922
	CB02	22	10	0.545	0.926
	SF01	22	2	0.181	0.311
	CB04	22	12	0.727	0.930
	PD02	22	9	0.909	0.883
	SF03	22	8	1.000	0.883
	CB03	22	14	0.909	0.952
Santa Isabel do Rio Preto	PD03	20	12	0.600	0.942
	CB06	20	3	0.300	0.278
	CB05	20	8	0.700*	0.900
	CB02	20	10	0.900	0.915
	SF01	20	2	0.300	0.268
	CB04	20	13	0.900	0.942
	PD02	20	7	0.600	0.784
	SF03	20	9	0.900	0.905
	CB03	20	10	0.700	0.915

O número de alelos (N_a) e heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e) médios para todas as amostras da espécie e por localidade estão descritos na tabela 4.19. É possível notar um número de alelos médio alto por localidade, que está diretamente relacionado com o tamanho amostral – as localidades com menor número médio de alelos são justamente aquelas com menor n , SP ($n=5$) e MGN ($n=7$). A mesma relação não é vista para a heterozigose, sendo que a mais baixa heterozigose observada foi para Correntina (H_o 0.561, $n=11$).

Tabela 4.19: Número médio de alelos (N_a) e médias das heterozigoses observada (H_o) e esperada (H_e) por localidade de coleta de amostra de *Saltator similis*.

	<i>N_a</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>
<i>S. similis</i>	17.00	0.643	0.757
MGL	8.77	0.665	0.753
Barra do Choça	8.50	0.731	0.818
MGN	6.33	0.642	0.783
Correntina	8.11	0.561	0.755
SP	6.37	0.700	0.855
Nova Andradina	8.77	0.679	0.778
Santa Isabel do Rio Preto	8.22	0.655	0.761

A análise de variância molecular (Tabela 4.20) indicou, com base nos nove locos analisados, que apenas 0.1% da variância estaria distribuído entre as populações, um forte indicador de ausência de estrutura genética populacional.

Tabela 4.20: Análise de variância molecular (AMOVA) para sete localidades de coleta de amostras de *S. similis*.

Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre populações	24.516	0.00354	0.10234
Entre indivíduos dentro das populações	240.571	0.57188	16.54473
Dentro dos indivíduos	192.000	2.88117	83.35293
Total	457.087	3.45659	

Os valores de F_{st} par a par estimados utilizando localidades de coleta como populações potenciais apresentaram apenas uma comparação estatisticamente significativa, entre Barra do Choça e o norte de Minas Gerais (MGN) – grupo que é composto de amostras das localidades Bocaiúva, Turmalina e Virgem da Lapa (Tabela 4.21). A média de distância entre Barra do Choça e MGN é de 300 km e a única grande diferença entre elas é o fato de a maior parte das amostras da primeira ser proveniente de uma área de transição entre Caatinga e Mata Atlântica e da segunda ser proveniente de áreas de Cerrado. Entretanto, se este fato fosse relevante, então diferenças significativas entre as outras localidades de biomas diferentes também seriam esperadas, o que não ocorreu. Além disso, o valor de p é limítrofe (0.045) e deixa de ser significativo após correção para múltiplas comparações. Logo, pode-se inferir que a diferença obtida para estas localidades seja devida ao acaso ou por desvios inseridos por conta da amostragem.

Tabela 4.21: Análise de F_{st} (A) utilizando as localidades de coleta de *S. similis* como populações potenciais. Os valores para os quais o p (B) foi significativo estão em negrito.

(A)							
	MGL	Barra	MGN	Correntina	SP	Andradina	Sta Isabel
1	*						
2	0.00175	*					
3	0.02717	0.03126	*				
4	0.00416	0.00120	0.01296	*			
5	0.01858	0.02574	0.02085	-0.00313	*		
6	0.00444	0.00734	0.00731	0.00349	0.00044	*	
7	0.01006	-0.01412	0.01190	0.00789	0.01739	0.01582	*
(B)							
	MGL	Barra	MGN	Correntina	SP	Andradina	Sta Isabel
1	*						
2	0.65479	*					
3	0.06197	0.04554	*				
4	0.63845	0.72923	0.43352	*			
5	0.26285	0.15890	0.30601	0.95525	*		
6	0.50302	0.36858	0.46847	0.73290	0.77784	*	
7	0.33007	0.97426	0.35066	0.59905	0.37650	0.14909	*

Todas as localidades apresentaram desequilíbrio de ligação potencial em diversos pares de locos, que variaram de acordo com a localidade. Contudo, nenhum continua estatisticamente significativo após a correção para múltiplas comparações. Dos locos com desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), apenas CB05 ($p \leq 0.00003$) e CB03 ($p = 0.000$) para

Correntina e CB05 ($p \leq 0.00024$) para Santa Isabel continuam significativos após correção para múltiplas comparações.

Nesta análise chama atenção o fato do loco CB05 aparecer com desvios significativos do HWE em duas das sete localidades, o que poderia estar ligado à presença de indivíduos aparentados na amostragem. Existe também a possibilidade de que a espécie ou alguma população tenha passado por flutuações populacionais recentes, como um gargalo populacional.

Gráficos de frequências de cada loco por população potencial (Figura 4.24) mostram não apenas que existem diferenças de frequência entre localidades diferentes, como também existe um grande número de alelos privados, como também mostra a tabela 4.22.

Figura 4.24: Frequências dos alelos de cada loco em cada localidade de coleta de amostras de *S. similis*.

Tabela 4.22: Alelos privados por localidade de coleta de amostras de indivíduos de *S. similis*.

Localidade	Loco	Alelo	Frequência
MGL	PD02	270	0,042
	SF03	200	0,045
	CB03	387	0,083
	CB03	407	0,042
	CB03	591	0,083
	CB03	615	0,042
Barra do Choça	CB04	364	0,050
	CB03	391	0,056
	CB03	483	0,056
MGN	CB02	388	0,056
Correntina	PD03	341	0,045
	SF03	194	0,045
	CB03	375	0,100
	CB03	467	0,050
	CB03	475	0,050

SP	PD03	337	0,100
	CB06	161	0,100
	CB03	423	0,100
Nova Andradina	CB05	291	0,091
	CB05	295	0,045
	CB04	372	0,045
	CB03	403	0,045
	CB03	415	0,045
	CB03	507	0,045
	CB03	603	0,045
Santa Isabel do Rio Preto	CB06	155	0,050
	PD02	218	0,050
	SF03	168	0,050
	CB03	379	0,050
	CB03	435	0,050
	CB03	447	0,100

Foram realizadas então novas análises apenas com as localidades no extremo da distribuição da amostragem e com maior número de amostras, para tentar evitar algum desvio inserido na amostragem por conta do agrupamento das amostras de Minas Gerais.

1= Barra do Choça, N=10

2= Correntina, N=11

3= Nova Andradina, N=11

4= Santa Isabel do Rio Preto, N=10

A análise de variância molecular (Tabela 4.23) passou a indicar que 0.3% da variação podem ser explicados entre as populações. Apesar de ter dobrado de valor em relação à análise anterior, ainda assim é um valor extremamente baixo.

Tabela 4.23: Análise de variância molecular (AMOVA) para quatro localidades de coleta de amostras de *S. similis*.

Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre populações	12.271	0.01033	0.29975
Entre indivíduos dentro das populações	144.122	0.45068	13.08025
Dentro dos indivíduos	122.500	2.98452	86.62001
Total	278.893	3.44553	

A análise de diferenciação populacional utilizando estimativas de F_{st} (Tabela 4.24) não indicou nenhum par de localidades como significativamente diferente.

Tabela 4.24: Valores de F_{st} (A) utilizando quatro localidades de coleta nos extremos da amostra obtida para *S. similis* como populações potenciais e (B) valores de p.

(A)

	Barra	Correntina	Andradina	Sta Isabel
1	*			
2	0.00234	*		
3	0.01492	0.01314	*	
4	0.01681	-0.01774	0.00755	*

(B)

	Barra	Correntina	Andradina	Sta Isabel
1	*			
2	0.51286	*		
3	0.22778	0.21936	*	
4	0.17983	0.99338	0.45312	*

Tanto o número de pares de locos com potencial desequilíbrio de ligação, quanto os locos com desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg variaram muito em relação à análise anterior. De todas as estimativas, nenhum par de locos continuou apresentando desequilíbrio de ligação significativo após correção para múltiplas comparações, e apenas um loco continuou apresentando desvio do HWE, PD03 na localidade Barra do Choça ($p \leq 0.00093$), que na análise anterior não apresentou desvio.

Na análise utilizando estimativa de R_{st} , a comparação entre as quatro localidades utilizadas na acima continua sem nenhum par com diferenciação significativa. Já utilizando todas as localidades, a única mudança é que o

agrupamento MGN (Turmalina, Virgem da Lapa e Bocaiúva) passou a apresentar diferenciação significativa em relação a Correntina ($R_{st}=0.102$, $p\leq 0.038$) e em relação a Nova Andradina ($R_{st}=0.156$, $p\leq 0.0146$), nenhum dos dois valores de p continua significativo após correção para múltiplas comparações.

Em suma, não foi possível detectar estruturação genética para *Saltator similis* utilizando uma base de dados de 66 amostras e 09 locos de microssatélites através do método de análise de diferenciação populacional com populações definidas *a priori* nem utilizando o F_{st} e nem o R_{st} .

4.3.2. Análise de diferenciação populacional através de dois métodos de partição de amostras: DAPC e Structure

Assim como para *P. dominicana*, a análise da estrutura genética populacional de *Saltator similis* foi dividida em duas abordagens principais: com e sem definição de populações potenciais *a priori*. O primeiro passo para avaliar a presença de estruturação genética foi através da análise de *clustering* implementada pelo pacote Adegnet (Jombart *et al.*, 2010), parte do *programa* R (R development team, 2009), e que é baseada na análise discriminante de componentes principais (DAPC). Jombart *et. al.* (2010) entendem que esse é um tipo valioso de análise, por não apresentar pressupostos sobre modelos populacionais, ou de equilíbrio de Hardy Weinberg e de ligação.

Inicialmente foi realizada a análise discriminante de componentes principais – DAPC (Jombart *et al.*, 2010), sem definição *a priori* de quais seriam as populações, através do método de partição das amostras em diferentes grupos.

A análise de DAPC com o *data set* de 73 amostras (mesmo aquelas localidades com poucos indivíduos por ponto de coleta) apontou a existência de três *clusters* na amostragem (Figura 4.25), que apesar de apresentarem algumas diferenças de frequência em relação à representação de cada localidade em cada *cluster*, não apresentaram nenhuma correlação com a origem geográfica. Assim, apesar das diferenças de frequência, este resultado parece ser devido à tentativa do programa de maximizar as

diferenças entre os *clusters*, do que por uma estruturação genética real da espécie.

Figura 4.25: Inferência do número de *clusters* presentes na amostragem de *S. similis* utilizando a análise discriminante de componentes principais (DAPC, Jombart *et al.* 2010). Esquerda: número de *clusters* (k) em relação ao valor do *Bayesian Information Criterion* (BIC), e direita: gráfico das amostras divididas nos três grupos.

Figura 4.26: Diferenças nas frequências de cada *cluster* inferido pela análise de DAPC em cada localidade de coleta de amostras de *S. similis*.

A análise utilizando o programa Structure v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) apresentou grande variação em relação ao número de *clusters* mais provável na amostragem, com inferências apontando para dois ou três *clusters* (Figuras 4.27).

Figura 4.27: Inferência de $k=3$ (para todas as amostras) e $k=2$ (apenas para as quatro localidades Barra do Choça, Correntina, Nova Andradina e Santa Isabel do Rio Preto), obtidas para as amostras de *S. similis* com informação de localidade de coleta fornecida ao programa.

Inicialmente, as análises foram realizadas com todas as localidades. Contudo, por conta da variação no tamanho amostral de cada localidade, foram realizadas também análises com apenas quatro localidades (Figura 4.30), que não apenas encontram-se nos extremos da distribuição da amostragem, como têm número amostral semelhante, sendo elas: Barra do Choça ($n=10$), Correntina ($n=11$), Nova Andradina ($n=11$) e Santa Isabel do Rio Preto ($n=10$) (Figura 4.30).

Na figura 4.28, fica evidente uma grande mistura das amostras, praticamente sem possibilidade de diferenciação entre as sete localidades analisadas. Entretanto, as localidades #1 Barra do Choça e #3 MGL apresentam respectivamente dois e três indivíduos muito diferentes de todos os outros. Curiosamente, os indivíduos de MGL são todos do mesmo ponto de coleta, Araponga (MG). Existe uma possibilidade de estes indivíduos serem aparentados, e inclusive provenientes de soltura de alguma outra localidade não amostrada. Entretanto, o próprio gráfico de barras mostra que os *clusters* representados pelas cores vermelha e azul também foram amostrados nas outras localidades, apenas em menor frequência.

Figura 4.28: Gráfico de barras, barra gerado pelo programa Structure, demonstrando a divisão proposta para $k=4$.

Figura 4.29: Gráfico de barras gerado pelo programa Structure, para $k=2$ e 4 localidades de origem das amostras: #1=Barra do Choça, #2=Correntina, #3= Nova Andradina e #4= Santa Isabel do Rio Preto.

Na figura 4.29, existe uma aparente diferença de frequência do *cluster* “verde” nas diferentes localidades, sendo mais frequente justamente nas localidades #1 e #2, respectivamente Barra do Choça e Correntina, ambas no sul da Bahia. A proximidade entre as localidades #3 – Nova Andradina (MS) – e #4 – Santa Isabel do Rio Preto (RJ) impressiona, por se tratarem de localidades tão distantes, aproximadamente 950 km em linha reta.

Em resumo, apesar de os programas de partição de amostras terem indicado a presença de dois, três ou quatro *clusters* na amostragem, não é possível identificar grupos claros, o que provavelmente é devido a uma ausência de estrutura genética.

Entretanto, devido aos desvios detectados em relação aos equilíbrios de ligação e de Hardy-Weinberg, torna-se interessante a investigação da demografia histórica da espécie, buscando por sinais de flutuações populacionais e processos que geraram a distribuição atual da diversidade genética da espécie.

4.3.4. Inferências sobre a história demográfica de S. similis

As análises anteriores não permitiram refutar a hipótese de pan-mixia para *S. similis*. Assim, não foi detectada estruturação genética e por isso não puderam ser definidas populações diferenciadas. Por conta disso, os testes que buscam sinais de flutuações populacionais foram realizados utilizando todas as amostras de *S. similis* como um único grupo.

A busca por um possível sinal de expansão populacional, foi realizada utilizando o teste k , descrito em Reich *et al.* (1999), cujos resultados estão descritos na tabela 4.25

Tabela 4.25: Teste de expansão populacional para cada loco (k) e inter-loco (g) (Reich *et al.*, 1999) para *S. similis*.

	Todas as amostras com origem
nº de locos com valores de K negativos	6
p valor (teste k)	0.1257
teste g	1,785
Valor de corte para o g	0.15

Não foram encontrados valores significativos, indicando que não houve expansão populacional marcada, ou apenas não houve uma expansão populacional detectável em *S. similis* com as informações disponíveis.

A detecção de sinal de gargalo populacional foi inicialmente realizada utilizando o teste de alteração na frequência de alelos raros Luikart *et al.* (1998), segundo o qual populações com maior quantidade de alelos em frequências média/alta poderiam ter sofrido gargalos populacionais recentes.

Figura 4.31: Distribuição das frequências alélicas para as amostras de *S. similis* em conjunto.

Não foi encontrado sinal de gargalo populacional recente (Figura 4.30), entretanto, a quase ausência de alelos em frequências mais altas (0.201-1.00) chama a atenção.

Foi utilizado também o teste de excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996), implementado pelo programa Bottleneck v.1.2.02 (Piry *et al.*, 1999), utilizando o IAM. Os resultados foram analisados utilizando o teste de Wilcoxon, que segundo Luikart & Cornuet (1999), é o mais adequado e robusto para tamanhos amostrais pequenos. Foi encontrado sinal de gargalo populacional recente para a espécie (excesso de heterozigotos $p \leq 0.0078$), que é condizente com os desvios detectados para a amostragem analisada em conjunto.

O teste de relação entre número de alelos e amplitude da distribuição de tamanhos alélicos (Garza-Williamson, 2001) também apresentou forte sinal de gargalo populacional. Garza & Williamson sugerem que valores de k/r abaixo de 0.7 indicariam a provável ocorrência de gargalo populacional. Honnen *et al.* (2010) utilizaram o limite conservativo de 0.68. O valor é surpreendentemente baixo - 0.283, ou seja, há forte apoio para a hipótese de gargalo populacional para *S. similis*.

Um cenário como o obtido, sem diferenciação significativa encontrada entre as localidades de amostragem não permite a definição de populações

entre as quais há certa restrição de fluxo gênico assim como, logicamente, impede a realização de testes de atribuição de qualquer natureza. Balloux & Lugon-Moulin (2002) afirmam que a troca de genes entre populações homogeneíza as frequências alélicas, e determina os efeitos relativos da seleção e da deriva genética. Assim, os autores afirmam, citando Barton & Hewitt (1985), que um alto nível de fluxo gênico evitaria a adaptação local, impedindo também, portanto, o processo de isolamento e, logo, de especiação. Com isso, apesar de existir a possibilidade de haver algum tipo de adaptação local ao longo da distribuição de *S. similis*, a probabilidade de ocorrência de depressão por exocruzamento no caso de mistura de indivíduos de localidades diferentes é praticamente nula. Entretanto, seria de extrema relevância aumentar tanto o número amostral por localidade, quanto a quantidade de localidades, além de buscar a construção de uma base de dados sem relações de parentesco muito próximas, evitando ao menos a presença de pais e filhotes.

5. Discussão

5.1. Seleção de Marcadores Microssatélites

A seleção de marcadores microssatélites através do método de bibliotecas genômicas enriquecidas, baseada em clonagem, pode ser considerada como um método manual e quase obsoleto atualmente, por conta do rápido desenvolvimento da tecnologia do sequenciamento em larga escala (exemplo - método 454, Malausa *et al.*, 2011). Entretanto, o aprendizado do funcionamento e pormenores da técnica foi de enorme valia.

Segundo Primmer *et al.* (1996), é esperado um sucesso de amplificação e de detecção de polimorfismos de 50% em média para espécies de Passeriformes que divergiram até há aproximadamente 11 milhões de anos. Assim, baseando-se na premissa de que a amplificação com iniciadores heterólogos tem sido utilizada com cada vez mais sucesso, foi tomada a decisão de testar todos os oligonucleotídeos iniciadores em todas as espécies e não restringir a amplificação cruzada às famílias. Esta estratégia mostrou-se acertada, uma vez que e que a taxonomia das aves é complicada e em mudança constante. No início deste trabalho, *S. similis* e *C. brissonii* eram classificadas como parte da família Cardinalidae e *S. frontalis* e *P. dominicana* de Emberizidae. Pouco mais de dois anos depois, *S. similis* e *P. dominicana* passaram a ser classificadas como Thraupidae e *S. frontalis* e *C. brissonii* continuaram respectivamente como parte das famílias Emberizidae e Cardinalidae (CBRO, 2011).. Curiosamente, os iniciadores desenvolvidos para *C. brissonii* foram os que geraram melhores resultados para *S. similis*, espécies que agora são classificadas em famílias diferentes.

Foi registrada uma grande variação de tamanho em alguns locos, como por exemplo, o loco CB03 para *P. dominicana*, cuja diferença entre o maior e menor alelo foi 100 pares de bases (pb), ou os locos CB03, CB07 e PD03 para *S. similis*, com respectivamente 256, 100 e 84 pb de diferença entre o maior e o menor alelo. Entretanto, esse número toma sua real proporção ao notar-se que são tetranucleotídeos e que essas diferenças representam, na verdade, 25, 84, 25 e 21 unidades de repetição. Segundo

Estoup & Cornuet (2003), a maior parte dos microssatélites atinge o tamanho de algumas dezenas de unidades de repetição, portanto os locos CB07 e PD03 para *S. similis* e CB03 para *P. dominicana* apresentam variação dentro do esperado. O loco CB03 para *S. similis* de fato apresenta uma grande variação de tamanho, o que poderia estar relacionado a uma alta taxa de mutação e, conseqüentemente, à possibilidade de presença de alelos com homoplasia de tamanho (*size homoplasy*, SH). Entretanto, de acordo com Estoup *et al.*, (2002), a SH precisaria ser objeto de maior preocupação se o loco além de apresentar alta taxa de mutação fosse analisado também para um grande número de amostras e apresentasse certa constrição no tamanho dos alelos. Um número amostral mais restrito e uma variação ampla no tamanho dos alelos (ou seja, um maior número de estados alélicos possíveis) poderiam em tese compensar a alta taxa de mutação e o risco de encontrar alelos homoplásicos seria reduzido.

Foram obtidos números iguais de machos e fêmeas para *P. dominicana* e *S. frontalis*, sendo que a primeira não apresenta dimorfismo sexual e a segunda apresenta. Já para *C. brissonii* e *S. similis* (a primeira tem dimorfismo e a segunda não), foi obtida uma quantidade muito maior de machos em relação a fêmeas. Este resultado pode ser explicado com base no comportamento das espécies. Enquanto que *P. dominicana* e *S. frontalis* se alimentam em grupos, o que acaba favorecendo a captura de ambos os gêneros, as outras duas defendem territórios em casais. Apesar de as fêmeas também cantarem e apresentarem comportamento de defesa de território, em *S. similis* e *C. brissonii*, esse comportamento é mais agressivo nos machos.

Em futuros estudos populacionais será possível, através da sexagem de um número maior de indivíduos, não apenas inferir possíveis diferenças na dispersão de machos e fêmeas, como analisar a proporção de machos que são apreendidos do comércio em relação a fêmeas. Caso a proporção de machos seja marcadamente maior do que a de fêmeas, como ocorre no caso de espécies em que o macho é mais apreciado, como *C. brissonii*, é possível que as regiões onde os animais são coletados apresentem um desvio na razão sexual, com o número de fêmeas muito maior do que o de

machos. Se essa situação chegar ao extremo, é possível que as fêmeas tenham dificuldades de encontrar machos para acasalar, ou mesmo que um mesmo macho acabe acasalando com um número muito grande de fêmeas, fazendo com que as proles tenham alto grau de parentesco, o que pode trazer sérias consequências para a espécie.

De acordo com Ribon *et al.* (2003), *S. similis* é hoje a espécie mais valorizada pelo comércio ilegal na região de Viçosa (MG), e por conta disso, muito explorada por esta atividade. Os autores ressaltam que a espécie ainda é comum na região, mas já é objeto de preocupação pela possibilidade de a história de sua exploração estar indo pelo mesmo caminho das histórias de *Cyanoloxia brissonii* (na época do artigo – 2003 – *Passerina brissonii*) e *Sporophila angolensis* (então *Oryzoborus angolensis*), antes abundantes na região e na época do artigo, extintos localmente. Atualmente, traficantes e compradores ilegais de aves têm preferência por *S. similis* de Minas Gerais por conta do tipo de canto, o chamado “boi cheio” (observação pessoal e Marcelo Rocha, comunicação pessoal 2010), mais um indício de que a situação da espécie na região precisa de atenção.

Conclusão - Seleção de Marcadores

Foram descritos neste trabalho oito, nove, sete e quatro locos polimórficos de microsatélite para *Paroaria dominicana*, *Saltator similis*, *Cyanoloxia brissoni* e *Sporophila frontalis*, respectivamente. Estes locos foram desenvolvidos com base em quatro bibliotecas genômicas, cada uma desenvolvida para uma das espécies supracitadas, as quais juntas levaram ao sequenciamento de mais de 700 clones. Contudo, todos os locos foram testados para todas as espécies e muitos dos locos selecionados foram desenvolvidos para uma das outras espécies, até mesmo de famílias diferentes.

O trabalho de selecionar marcadores microsatélites não se resume ao processo de seu desenvolvimento, mas estende-se ao aprendizado da análise, que é feita a partir do zero, sem conhecimento algum daquele loco ou de quais são os alelos. Por este motivo, muitas vezes torna-se necessário reanalisar os mesmos dados diversas vezes, construir painéis baseados em

diferentes tamanhos de alelos, mudar a amplitude de cada alelo (*bins*). Todo esse processo é imprescindível para gerar genotipagens consistentes e minimizar os erros. Aliás, devido à proximidade durante este trabalho com um laboratório que lida com Ciência Forense, a qualidade dos dados gerados sempre foi a principal preocupação deste projeto, o que inspirou muito cuidado e gerou muito estudo e muitas reanálises.

Os marcadores desenvolvidos, assim como as frequências alélicas obtidas, podem, em um futuro próximo, não apenas fazerem parte de estudos de estrutura genética populacional destas espécies ameaçadas pelo tráfico de fauna, como podem vir a ser extremamente úteis para a realização de testes de paternidade em animais potencialmente provenientes de criadores legalizados, como uma forma de controle por amostragem desta atividade, tanto para evitar a legalização de animais provenientes do comércio ilegal (animais ilegais passando por criadores, recebendo anilhas e documentação falsos, e vendidos como tendo sido criados em cativeiro), quanto para gratificar, através de um “selo verde”, aqueles criadores que de fato investem em reprodução e produzem filhotes em cativeiro. Da mesma forma, os testes de paternidade podem vir a tornar-se um meio eficaz de controle também de criadores amadoristas e emissão de licenças para criação (a criação amadora não permite comércio, mas permite troca entre criadores de filhotes nascidos em cativeiro). Para tanto é necessário ainda realizar análises de validação dos marcadores para esse fim, como, por exemplo, o sequenciamento dos alelos obtidos, a confecção de escadas alélicas e a inferência de probabilidades de mutação entre pais e filhotes (e.g. Linacre *et. al.*, 2011).

A Ciência tem muito a contribuir com a conservação de espécies ameaçadas e/ou super-exploradas, e no combate ao tráfico de fauna. Entretanto, deve ser entendido pela sociedade que esse tipo de contribuição só poderá ser realizado se antes for desenvolvido um amplo arcabouço teórico, com desenvolvimento de marcadores, análises de genética de populações e, principalmente, a coleta de amostras representativas de toda a distribuição das espécies em questão, o que leva tempo e necessita investimentos.

5.2. Inferência da estrutura genética e da mais provável origem de indivíduos de Paroaria dominicana apreendidos do comércio ilegal

Os resultados das análises de diferenciação populacional para *Paroaria dominicana* tanto com definição de populações *a priori*, quanto através de métodos de partição de amostras, mostraram que é possível detectar estruturação genética populacional significativa com os locos e as amostras utilizadas.

Foi escolhido utilizar estimativas de F_{st} ao invés do R_{st} para as análises de diferenciação populacional com definição de populações *a priori*. A principal diferença entre elas é o modelo mutacional adotado para cada uma. Balloux & Lugon-Moulin (2002) apresentam uma rica discussão com comparações dos dois métodos para a inferência de estruturação genética utilizando microssatélites. De acordo com os autores, o parâmetro F_{st} , correlação entre dois alelos escolhidos ao acaso dentro de subpopulações em relação a dois alelos escolhidos ao acaso na população total (Wright, 1951), é calculado assumindo o modelo de alelos infinitos - IAM (Kimura & Crow, 1964), um modelo extremo, para o qual cada mutação gera um novo alelo a uma determinada taxa. Com isso, alelos idênticos em estado seriam também, necessariamente, idênticos por descendência. Já o R_{st} (Slatkin, *op. cit.*), desenvolvido especificamente para a utilização com microssatélites e para lidar com sua alta taxa de mutação, utiliza outro modelo extremo, o modelo de mutações passo a passo – SMM (Kimura & Ohta, 1978), para o qual cada mutação criaria um novo alelo adicionando ou retirando uma unidade de repetição do microssatélite, com mesma probabilidade. Dessa forma, alelos de tamanhos mais próximos seriam mais proximamente relacionados do que alelos de tamanhos mais distantes. No entanto, apesar de utilizar o modelo SMM, que representaria melhor a evolução dos microssatélites, o R_{st} tende a apresentar grande variância, o que muitas vezes faz com que os valores obtidos por esse parâmetro não sejam as melhores. Essa diferença de modelos mutacionais traz uma das mais importantes características das estimativas obtidas com os parâmetros F_{st} e R_{st} , que é o fato do primeiro não levar em conta o fenômeno da homoplasia,

enquanto o segundo permite sua ocorrência. Com isso, como o F_{st} entende alelos idênticos por estado como idênticos por descendência, irá considerar alelos homoplásicos como idênticos por descendência. No entanto, com altas taxas de mutação, a probabilidade de identidade de dois alelos diminui (Rousset, 1996) e desta forma a estimativa obtida para o F_{st} tenderá a ser “desinflada” e a não levar em conta uma possível diferenciação das subpopulações.

O F_{st} é derivado da variância das frequências alélicas em cada subpopulação, enquanto que o R_{st} é derivado da variância dos tamanhos alélicos. O R_{st} , entretanto, só é independente da taxa de mutação sob o modelo de mutação passo a passo estrito, o que muitas vezes não é o caso para diversos locos. Assim, Balloux & Lugon-Moulin (2002) concluem que mais importante do que o modelo e taxa de mutação em si, é a relação entre mutação e migração. Quanto maior o fluxo gênico, menor a importância relativa da mutação.

Ao comparar as performances de inferência de estrutura genética populacional utilizando F_{st} e R_{st} , Balloux (2000) afirma que o segundo será superior em relação ao primeiro em populações altamente diferenciadas, ou em análises de divergência interespecífica, situações nas quais a mutação adquire uma importância relativa maior do que a migração. Balloux & Lugon-Moulin (2002) concluem que o F_{st} apresenta um desempenho melhor em análises intraespecíficas, especialmente de populações com diferenciação leve.

A grande variação de tamanho e o grande número de alelos obtidos para os locos CB02 e CB03 podem estar relacionados a altas taxa de mutação nos locos, o que poderia ser preocupante devido à possibilidade de surgimento de alelos com homoplasia de tamanho (SH, *size homoplasy*), ou seja, idênticos em estado, mas não por descendência, o que levaria a uma estimativa de diferenciação populacional mais baixa do que a real (e.g. Balloux & Lugon-Moulin 2002; Estoup *et al.*; 2002, Goldstein, & Schötterer, 2003). Entretanto, Estoup *et al.* (1995), ao analisar sequências de eletromorfos (fragmentos de microssatélite de mesmo tamanho em pares de bases mas não necessariamente idênticos por descendência) de

microssatélites imperfeitos de *Apis mellifera*, encontraram indícios de homoplasias apenas em subespécies distantes, sugerindo que esse fenômeno ocorra com maior frequência em subdivisões taxonômicas mais profundas do que o nível populacional. De acordo com Estoup *et al.* (2002), a SH precisaria ser objeto de maior preocupação se o loco, além de apresentar alta taxa de mutação, fosse analisado também para um grande número de amostras e apresentasse certa constrição no tamanho dos alelos. Um número amostral mais restrito e uma variação ampla no tamanho dos alelos (ou seja, um maior número de estados alélicos possíveis) poderiam, em tese, compensar a alta taxa de mutação e o risco de encontrar alelos homoplásicos seria reduzido. Essa afirmação é condizente com Balloux & Lugon-Moulin (2002), segundo os quais um número restrito de estados alélicos poderia aumentar o risco de homoplasia de tamanho.

Para tentar inferir se possíveis homoplasias nesses locos poderiam estar influenciando os resultados obtidos, foram realizadas análises com o mesmo *data set*, mas sem um e depois sem o outro loco. No caso de altos níveis de homoplasia, a retirada desses locos deveria agir aumentando a diferenciação entre as subpopulações, uma vez que na presença de homoplasia, alelos idênticos por estado, mas não idênticos por descendência seriam considerados como idênticos por descendência pelo *F_{st}*, que assume o modelo mutacional de alelos infinitos, IAM (Kimura & Ohta, 1978). Contudo, foi observada para o loco CB03 uma diminuição marcada nas comparações par a par estatisticamente significativas. O mesmo foi observado para o loco CB02, com exceção de Beira Rio e Parnaguá, que passaram a ser diferenciadas. Com isso, é possível inferir que mesmo que haja alelos homoplásicos na amostragem desses dois locos, eles não devem estar interferindo de forma substancial na inferência da estrutura genética.

Assim, tanto devido às características de cada estimador, quanto da espécie estudada e da base de dados utilizada, é mais provável que o *F_{st}* ofereça, neste caso, estimativas de diferenciação que reflitam de forma mais fiel à realidade do que o *R_{st}*. Tendo em mente o exemplo dado por Balloux & Lugon-Moulin (*op cit.*), os valores obtidos nesta análise adquirem um novo significado. Lee *et al.* (2001), analisando a estrutura genética populacional

da escrevedeira-amarela (*Emberiza citrinella*) com marcadores microssatélite, encontraram valores de F_{st} significativos que variaram entre 0.017 e 0.026. Os autores também citam diversos estudos que registaram valores semelhantes para passeriformes, variando entre 0.014 e 0.027 (e.g. Gibbs *et al.* 2000, Haavie *et al.* 2000, Crochet 2000). Da mesma forma, Francisco *et al.* (2007) analisaram a estrutura genética do tangará (*Chiroxiphia caudata*) em um transecto de habitat contínuo na Mata Atlântica e encontraram diferenciação moderada, mas altamente significativa, com valores de F_{st} que variaram de 0.016 a 0.023.

Os grupos obtidos através das análises par a par Beira Rio/Feira de Santana, Canudos/Feira de Santana, Canudos/Paraíba, Canudos/Petrolina, Canudos/Trindade, Feira de Santana/Paraíba, Feira de Santana/Parnaguá, Feira de Santana/Petrolina, Feira de Santana/Trindade, Paraíba/Parnaguá, Parnaguá/Petrolina, Petrolina/Trindade e Petrolina/Vitória apresentaram valores de F_{st} entre 0.023 a 0.048. Já os pares Beira/Canudos, Canudos/Parnaguá, Canudos/Vitória, Feira/Vitória, Paraíba/Vitória, Parnaguá/Trindade e Trindade/Vitória, como mencionado acima, apresentaram valores de F_{st} de 0.052 a 0.089. Os valores obtidos para os três *clusters* propostos variaram de 0.0187 a 0.0375. Todos os valores de F_{st} obtidos para as comparações realizadas para *P. dominicana* (localidades ou *clusters*), além de altamente significativos ($p < 0.05$), são condizentes com - ou mesmo mais altos do que - a média dos valores obtidos pelos trabalhos citados acima, que foi de cerca de 0.02. Isso demonstra que, se em um primeiro momento a diferenciação registrada para *P. dominicana* parece fraca, ela é no mínimo moderada e pode ter um significado biológico relevante. Mesmo em subpopulações com diferenciação profunda, o valor de F_{st} ainda pode ficar muito aquém de um, assim, valores de F_{st} tão baixos como 0.05 podem de fato indicar uma diferenciação genética importante (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Contudo, por mais que a diferenciação genética obtida seja relevante e significativa, ao que tudo indica, há altos níveis de fluxo gênico entre os *clusters*. Neste contexto, torna-se possível também a utilização do número absoluto de migrantes estimado pelo programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier,

2009) com base nos valores de F_{st} e que leva em conta duas populações sorteadas de um grupo de populações e que trocam uma fração de migrantes. Também considera que a taxa de mutação é desprezível em relação à taxa de migração. Os valores estimados (Tabela 4.12) indicam que existe, de fato, grande troca de migrantes entre os *clusters*, mais acentuadamente entre nordeste e sudoeste, provavelmente devido ao papel de Beira Rio, e nordeste e leste, provavelmente devido à proximidade geográfica entre estas duas localidades, assim como ao tráfico de fauna e suas consequências, como solturas. Mesmo sendo mais restrito, o fluxo entre sudoeste e leste ainda assim é relevante e, da mesma forma como os anteriores, pode ser tanto natural quanto devido ao tráfico de fauna e solturas. Entretanto, mesmo esse alto fluxo gênico ainda não é suficiente para que os *clusters* apresentem uma situação de pan-mixia.

Os desequilíbrios de ligação e de Hardy-Weinberg detectados podem indicar que os *clusters* propostos são subestruturados, o que é esperado, já que cobrem áreas muito extensas. A presença de subestruturação é condizente com os resultados obtidos para as estimativas de F_{st} , como, por exemplo, o isolamento de Canudos em relação a Feira de Santana e a diferenciação significativa de Petrolina em relação a Trindade. Da mesma forma, foi detectada uma leve diferenciação de Vitória da Conquista em relação a Beira Rio e Parnaguá evidenciada tanto pela maior frequência do *cluster* azul inferida pela DAPC, como pelo leve isolamento mostrado pelo gráfico triângulo da figura 4.12.

Laan & Pääbo (1997) afirmam que o desequilíbrio de ligação pode ser causado por um ou mais dentre cinco fatores: (1) mutação recente no loco; (2) efeito fundador (ou gargalo populacional); (3) mistura entre populações diferentes; (4) seleção; e (5) história demográfica. Em relação ao item (5) – história demográfica – os autores explicam que populações de tamanho constante tendem a apresentar maiores níveis de desequilíbrio de ligação do que aquelas que sofreram expansão, o que também é afirmado por outros autores (e.g. Gray *et al.*, 2009, Slatkin, 1997, Reich *et al.*, 2001). Segundo Hartl & Clark (2010), alelos de genes que não estão ligados, mesmo genes em diferentes cromossomos, podem mostrar um desequilíbrio de ligação

quando populações com diferentes frequências alélicas gaméticas são misturadas por fusão populacional ou altos níveis de migração.

Falush *et al.* (2003) descrevem três tipos de desequilíbrio de ligação, também mencionados por Kaeuffer *et al.* (2007). O primeiro – *mixture linkage disequilibrium* – surge em marcadores não ligados fisicamente devido à variação na ancestralidade dos indivíduos amostrados e à consequente correlação das frequências alélicas, uma vez que indivíduos com grande componente de ancestralidade na população k apresentarão excesso de alelos comuns na referida população. O segundo tipo – *admixture LD* – é a correlação que surge entre marcadores ligados em populações miscigenadas recentemente. Por fim, o desequilíbrio de ligação “de fundo” – *background LD* – que ocorre entre locos muito próximos nos cromossomos.

A última versão do programa Structure consegue lidar com os dois primeiros tipos, mas não com o terceiro. Todavia, como exposto por Kaeuffer *et al.* (2007), para muitas espécies a falta de um mapa genômico impossibilita a diferenciação entre o desequilíbrio de ligação “de fundo” e os outros dois, o que a princípio dificultaria a análise. Além disso, os autores citam diversos trabalhos nos quais outros fatores, como gargalos populacionais ou outras mudanças demográficas acentuadas poderiam gerar fortes desequilíbrios de ligação.

Em uma análise sobre a influência de locos ligados para a inferência do número de ks presentes na amostragem, Kaeuffer *et al.* (*op cit.*) corroboraram o que já havia sido citado por Falush *et al.* (2003), de que o desequilíbrio de ligação ou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg poderiam levar a uma super-estimativa do número de ks pelo algoritmo do programa Structure. Isso ocorreria, pois o programa busca por partições na amostragem que minimizem esses desequilíbrios. No caso de *P. dominicana*, isso significaria que ao invés dos três *clusters* inferidos haveria, na realidade, dois ou mesmo apenas um grande grupo na amostragem obtida. Entretanto, não apenas os três métodos utilizados (Fst, Structure e DAPC) corroboram a presença dos *clusters* propostos, como no caso dos dois primeiros, os grupos apresentaram certa correlação com geografia e são plausíveis biologicamente. Além disso, uma nova análise do mais provável número de

ks na amostragem utilizando o programa Structure sem os locos PD01 e PD03 também aponta para a presença de três *clusters*.

Levando em conta os resultados de todas as análises realizadas, com definição de populações *a priori* e através de partição de amostras, o cenário mais parcimonioso encontrado foi de três *clusters*, com diferenciação significativa e provavelmente subestruturados, um no leste, composto pelas localidades Canudos e Feira de Santana, um no nordeste, composto por Petrolina, Trindade e Paraíba, e um no sudoeste, composto por Parnaguá, Beira Rio e Vitória da Conquista, sendo que estes dois últimos provavelmente apresentam algum tipo de ligação através da localidade Beira Rio. Assumindo que este padrão esteja de fato refletindo a estruturação genética da espécie, surgem quatro questões muito interessantes para serem tratadas em estudos futuros.

A primeira é relativa a uma possível dispersão diferencial entre os gêneros da espécie. Nodari (2008) realizou um estudo de filogeografia de *P. dominicana* utilizando DNA mitocondrial, que reflete a linhagem matrilinear, e não encontrou nenhum tipo de estruturação genética detectável. Além disso, os machos apresentam comportamento de defesa de território no período reprodutivo (Sick, 1997). A estrutura detectada no presente estudo indica que provavelmente *P. dominicana* apresenta dispersão diferencial, com filopatria dos machos. Esta hipótese pode ser testada com a coleta e sexagem de um maior número de indivíduos e a realização de novas inferências sobre a estrutura genética, separadas por machos e fêmeas.

A segunda questão levantada aqui diz respeito ao que teria levado a espécie a apresentar o padrão atual de distribuição da variabilidade genética. Houve, na história da espécie expansões ou gargalos populacionais significativos detectáveis com a presente amostragem e o número de locos utilizado? Existe sinal de expansão populacional congruente com a expansão pleistocênica da Caatinga ou existe algum sinal de redução populacional e impacto significativo da colonização deste bioma nas últimas centenas de anos?

Nodari (2008) realizou um estudo de filogeografia e demografia histórica de *P. dominicana* utilizando marcadores de DNA mitocondrial e

encontrou evidências condizentes com um cenário de expansão populacional recente. Entretanto, ressalta que o mesmo sinal poderia também ter sido obtido no caso da molécula de mtDNA estar sofrendo algum processo de seleção: “os dados podem ser explicados por efeitos de seleção positiva (fases pré e pós-fixação) ou negativa atuando concomitantemente ou não a uma expansão populacional recente”. O autor cita também a congruência da hipótese de expansão recente com o que foi proposto por Wang (2004), segundo o qual a Caatinga estaria em processo de expansão devido à diminuição da pluviosidade nos últimos 15 mil anos. A análise com locos nucleares é uma forma para conseguir diferenciar entre as duas hipóteses, já que expansão populacional deixaria sinal em todos os locos, enquanto seleção apenas influenciará o loco diretamente sob seleção e aqueles ligados a ele (Reich *et al.* 1999).

Nenhum resultado do teste χ^2 (Tabela 4.XX) teve valor de p significativo, não sendo possível detectar sinal de expansão populacional nem para a espécie como um todo, nem para os *clusters*. Contudo, estes testes levam em conta os tamanhos alélicos e não suas frequências, sendo que testes baseados nas frequências alélicas talvez pudessem levar a resultados diferentes. Além disso, estes testes são fortemente influenciados pela representatividade da amostragem (é necessário ter uma amostragem representativa para inferir se os locos apresentam uma ou mais modas), e pelas características dos locos - modelo e taxa de mutação e presença ou não de restrição e tamanho. Locos que não evoluem de acordo com o SMM provavelmente irão violar a expectativa relativa à distribuição das variâncias, já que alelos poderiam gerar novos alelos de tamanho muito diverso a partir de um único evento de mutação. Além disso, locos com taxas de mutação muito diferentes em um mesmo painel também inserem desvios na análise, uma vez que locos com taxa de mutação maior naturalmente apresentarão uma distribuição de tamanhos mais ampla do que aqueles com taxa menor. Por fim, é conhecido o fato de que alguns locos apresentam restrições no tamanho máximo (Estoup & Cornuet, 2003), o que certamente influenciaria a variância das distribuições dos tamanhos alélicos.

Assim, este resultado permite duas interpretações: é possível que não tenha sido detectado sinal de expansão populacional simplesmente porque talvez não tenha havido uma, o que discordaria da hipótese de congruência com a expansão pleistocênica da Caatinga. No entanto, é possível que tenha havido a expansão, mas que o teste apenas tenha falhado em detectá-la, seja pelo baixo número amostral, pelo baixo número de locos, pelo fato do sinal poder ter sido perdido após estabilização do crescimento, ou mesmo pelos desvios citados acima.

Com o objetivo de entender também um pouco sobre a demografia recente da espécie, também foram utilizados três métodos de detecção de gargalos populacionais recentes: variação na frequência de alelos raros (Luikart *et al.* 1998), relação entre número de alelos e amplitude da distribuição de tamanhos alélicos (Garza & Williamson, 2001) e excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996).

A distribuição do número de alelos por classe de frequência (Luikart *et al.* 1998) baseia-se no fato de que os alelos raros seriam os primeiros a ser perdidos em reduções populacionais extremas. Com isso, populações que não sofreram redução apresentariam uma maior proporção de alelos em menor frequência do que populações que sofreram reduções, com as primeiras apresentando gráficos de distribuição de frequências alélicas com uma forma de L, e as últimas, gráficos sem o formato característico. O resultado obtido foi condizente com um cenário de população que não sofreu gargalo populacional recente, ou pelo menos não um detectável. Esta análise foi realizada tanto utilizando todas as amostras em conjunto, quanto para cada um dos *clusters* inferidos por este trabalho. Todas revelaram perfis de distribuição de classes de frequência de alelos esperados para populações em equilíbrio deriva-mutação, com uma maior proporção de alelos em menor frequência, justamente os que seriam mais rapidamente perdidos em eventos de gargalo populacional. Entretanto, segundo Cristescu *et al.* (2010), a análise de excesso de heterozigotos poderia detectar gargalos populacionais de 0.5 a 5 N_e gerações após a redução, enquanto que a distorção na frequência de alelos raros conseguiria realizar essa detecção para um intervalo menor de tempo, 2 a 4 N_e gerações. Da mesma

forma, Hoffman *et al.* (2011) detectaram redução populacional para *A. gazella* utilizando o método do excesso de heterozigotos e métodos Bayesianos e não conseguiram detectar a redução utilizando o método de distorção de frequência dos alelos raros.

As médias dos valores obtidas com o teste de Garza-Williamson (2001) para cada *cluster*, assim como para a espécie como um todo são surpreendentemente baixos, variando de 0.32 a 0.36, ou seja, há forte apoio para a hipótese de gargalo populacional para *P. dominicana*. Todavia, este teste pode ser influenciado por locos com alta taxa de mutação, o que poderia fazer com que as amplitudes de suas distribuições alélicas fossem extremamente altas, desviando a proporção k/r para valores baixos. Entretanto, os valores obtidos são muito baixos. Se este resultado fosse fruto apenas de artefatos de um ou dois locos, dentre os oito utilizados, seria esperado encontrar valores mais próximos dos limites sugeridos por Garza & Williamson (2001) e por Honnen *et al.* (2010). Hoffman *et al.* (2011) afirmam que o teste de relação entre número de alelos e amplitude da distribuição de tamanhos alélicos é mais informativo mesmo do que o de excesso de heterozigotos em casos nos quais a população pré-gargalo era grande ou que a população passou por recuperação demográfica. Assim, é plausível assumir que, para este teste, há detecção de gargalo populacional para *Paroaria dominicana*.

O resultado obtido utilizando o teste de excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996), implementado pelo programa Bottleneck v.1.2.02 (Piry *et al.*, 1999), foi interessante já que o programa detectou excesso de heterozigotos significativo para todos os grupos, inclusive para todas as amostras em conjunto. Esse teste consegue detectar reduções populacionais drásticas consideravelmente recentes, sendo que, de acordo com Luikart *et al.* (1998), “recente” representa algumas dúzias de gerações. Para *P. dominicana* esta análise testa um possível impacto da ocupação mais acentuada na região da Caatinga nas populações da espécie, que trouxe consigo, além da degradação ambiental e da ocupação propriamente dita, a grande exploração decorrente do hábito de manter aves de gaiola. Diversos estudos concluíram que, ao utilizar o teste de excesso de

heterozigotos através do *programa* Bottleneck, o modelo mutacional de alelos infinitos é de fato o mais sensível para a detecção de gargalos populacionais, como Cristescu *et al.* (2010) com populações de coalas (*Phascolarctos cinereus*), Le Page *et al.* 2000 com o walabi *Macropus eugenii*, Hoffman *et al.* (2011) com lobo-marinho-antártico (*Arctocephalus gazella*), e o mesmo foi citado pelos próprios Cornuet & Luikart (1996).

Com base no exposto acima, a hipótese de que a espécie *Paroaria dominicana* passou por um gargalo populacional recente torna-se plausível. Para testar essa possibilidade mais a fundo, seria muito interessante, mais uma vez, não apenas aumentar a amostragem para minimizar os desvios, mas aumentar o número de locos utilizados. Além disso, a utilização de programas que permitem a construção de cenários demográficos complexos que utilizam abordagem Bayesiana poderiam aumentar o poder de detecção do provável gargalo, como registrado por Hoffman *et al.* (2011). Como mencionado anteriormente, a redução populacional pode estar relacionada à ocupação da Caatinga, assim como aos efeitos da captura de animais para o comércio ilegal.

A terceira questão que surgiu deste trabalho envolve as possíveis barreiras ao fluxo gênico para essa espécie. *P. dominicana* apresenta alta capacidade de dispersão (Sick, 1997) e seus hábitos provavelmente maximizam a possibilidade de fluxo gênico, uma vez que forrageia em grupos, adaptou-se muito bem à antropização - encontrando áreas de forrageio em currais, terreiros, e mesmo em ruas de cidades (observação pessoal e Olmos *et al.*, 2005), mas os machos apresentam alguma filopatria no período reprodutivo, já que defendem territórios (Sick, *op. cit.*; Nodari, 2008). Seria extremamente interessante testar quais as possíveis barreiras geográficas para essa espécie, como, por exemplo, rios e serras, e se o potencial corredor de fluxo gênico ao longo do Rio São Francisco, conectando o grupo sudoeste e o nordeste, realmente facilita a movimentação dos indivíduos, já que é uma característica da espécie o forrageio à beira de corpos de água (Sick, 1997), e beiras de cursos de água perenes podem constituir corredores de dispersão.

A localidade de Beira Rio surge como um centro de mistura entre os *clusters* sudoeste e nordeste, uma vez que não apresenta diferenciação estatisticamente significativa em relação às localidades Paraíba, Petrolina e Trindade do nordeste e às localidades Parnaguá e Vitória da Conquista do sudoeste. O potencial fluxo gênico observado pode ser tanto devido à mistura gerada comércio ilegal, quanto a um possível corredor ao longo do Rio São Francisco, que ligaria, através de Beira Rio as porções sudoeste e nordeste da amostragem. Entretanto, Beira Rio é um centro de tráfico menos importante do que Canudos, Feira de Santana e Vitória da Conquista, e, se o comércio ilegal fosse o único responsável, estas últimas localidades apresentariam uma mistura muito maior em relação às outras. A não diferenciação de Petrolina em relação às localidades Paraíba e Beira Rio corrobora a hipótese do possível corredor de dispersão entre Beira Rio e Petrolina.

Para investigar as barreiras ao fluxo gênico mais a fundo, seria interessante obter amostras de ambos os lados do Rio São Francisco ao longo do transecto Beira Rio – Petrolina, assim como mais amostras de cada uma destas localidades, e de localidades em diferentes altitudes e de lados opostos de serras ou chapadas, não apenas aumentando o número de locos utilizados e o número amostral por localidade, mas procurando amostrar localidades entre os *clusters* propostos, investigando fluxo gênico, zonas de transição ou mesmo a existência de variação clinal da diversidade.

A figura 5.1 (e um mapa mais detalhado de curvas de nível não apresentado) mostra que as localidades de coleta de amostras de *P. dominicana* variam de 200 a 1000 metros de altitude. Vitória da Conquista e Beira Rio estão entre as localidades de maior altitude, entre 400 e 1000 metros. Já Canudos e Feira de Santana encontram-se em média de 200 a 500m. Por fim, Paraíba, Trindade e Petrolina estão em média a 500m de altitude.

Figura 5.1: Mapa de curvas de nível (IBGE) mostrando os três *clusters* propostos, as altitudes de cada localidade de coleta de amostras e a bacia hidrográfica do Rio São Francisco.

A figura 5.2, um mapa de relevo mais simplificado, mostra mais uma vez como o Rio São Francisco pode ser um facilitador da dispersão entre Beira Rio e Petrolina, e que, apesar de a espécie ocorrer em altitudes mais elevadas, é possível que a dispersão seja dificultada por áreas mais altas entre localidades (como por exemplo entre Vitória da Conquista e Feira de Santana), assim como é possível que o deslocamento possa ser facilitado pela presença de cursos de água perenes. Da mesma forma, existe a possibilidade de que seja mais fácil para indivíduos de áreas mais altas (como Beira Rio) dispersarem para áreas mais baixas do que vice-versa. As flechas contínuas pretas mostram propostas de dispersão de indivíduos entre localidades dentro de um mesmo *cluster*, enquanto que as flechas vermelhas pontilhadas mostram propostas de dispersão entre *clusters*. Entretanto, estas são hipóteses que precisam de amostragem e testes específicos para serem validadas ou negadas.

Figura 5.2: Mapa de relevo (IBGE) mostrando propostas de como ocorreria a dispersão dentro de cada *cluster* (flechas pretas contínuas) e entre os *clusters* (flechas vermelhas pontilhadas)

Por fim, a questão mais interessante que surgiu deste trabalho, consistiu em testar se a diferenciação genética encontrada e o número de locos descritos permitiria a inferência de origem de indivíduos apreendidos do comércio ilegal.

Balloux & Lugon-Moulin (2002) afirmam que a troca de genes entre populações homogênea as frequências alélicas, e determina os efeitos relativos da seleção e da deriva genética. Os autores afirmam, citando Barton & Hewitt (1985), que um alto nível de fluxo gênico evitaria a adaptação local, impedindo também, portanto, o processo de especiação. Com isso, apesar de misturas populacionais deverem sempre ser evitadas (com exceção de casos de resgate genético), a probabilidade de ocorrência de depressão por exocruzamento é remota para *P. dominicana*. Entretanto, a inferência de origem de indivíduos apreendidos do comércio ilegal vem a adicionar valiosas informações aos dados de inteligência coletados pela polícia, que juntos podem ser utilizados não apenas para ajudar a nortear

esforços de repatriação, mas podem ajudar a compreender melhor os padrões de captura de diferentes espécies, e assim permitir o desenvolvimento de planos para coibir essa atividade e mesmo evitar que os animais sejam transportados por tão longas distâncias. A apreensão dos animais traficados mais perto de onde foram coletados, assim como a prevenção desta atividade fariam com que o processo de reabilitação e soltura fosse mais rápido, barato e seguro, e o comércio ilegal fosse menos lucrativo.

Foi realizada uma análise de atribuição dos indivíduos de apreensão em relação aos três *clusters* descritos – nordeste, sudoeste e leste. Todas as atribuições realizadas apresentaram valores maiores do que 50%, entre 0.554 e 0.713 para o modelo com ancestralidade mista, e 0.782 e 0.999 para o modelo sem ancestralidade mista. Este último provavelmente não reflete a realidade, dado o provável alto fluxo gênico indicado pelas análises de estrutura populacional, mas foi interessante para evidenciar os resultados, que foram exatamente iguais aos do modelo com ancestralidade mista. O interessante dos resultados do teste de atribuição foi que em todas as 40 réplicas realizadas, em 100% das vezes todos os indivíduos provenientes de apreensão e sem origem conhecida foram atribuídos ao *cluster* do nordeste. É importante ressaltar que o programa poderia ter atribuído diferentes amostras do grupo de apreensão para diferentes *clusters*, contudo todas foram sempre atribuídas ao mesmo, demonstrando uma tendência clara que pode trazer informações relevantes. Foi realizado também um teste de atribuição assumindo três *clusters*, mas ao invés de informação sobre os *clusters*, foi dada ao programa informação sobre a localidade de coleta de cada amostra. A figura 4.21 mostra claramente como todas as amostras provenientes de apreensão foram englobadas pelas localidades de Petrolina e Paraíba, indicando que a região do norte da Bahia, Pernambuco e Paraíba são as mais exploradas pelos traficantes de galo-da-campina.

Estes resultados, inclusive, estão de acordo com trabalhos investigativos da ONG SOS Fauna em colaboração com a Polícia Civil do Estado de São Paulo e com a Polícia Rodoviária Federal da Bahia, que já haviam apontado a tendência de que muitos carregamentos de *P.*

dominicana seriam provenientes de locais mais ao norte da Bahia (Marcelo Rocha, comunicação pessoal, 2012). O próximo passo consiste em aumentar a amostragem ao longo da distribuição da espécie, mas com atenção maior às áreas mencionadas acima, de forma não apenas a refinar as atribuições, mas também a procurar entender limites e transições entre os *clusters* nordeste e leste, que também configura uma área muito relevante para o comércio ilegal.

5.3. Inferência da estrutura genética de Saltator similis

A análise de diferenciação populacional de *Saltator similis* com populações definidas *a priori* não conseguiu identificar grupos diferenciados nas amostras utilizadas, apesar de a hipótese de trabalho inicial ser a de haver estruturação genética para a espécie. O cenário de diferenciação era esperado por conta da convergência de características que apontavam para essa direção, entre elas, o comportamento muito marcado de defesa de território, que poderia implicar em filopatria, a distribuição da espécie por uma área extensa e atualmente fragmentada, o que poderia constituir barreiras para a espécie – que depende de bordas de mata, e a marcada variação de dialetos de canto com alguma correlação geográfica. Por conta disso, os resultados obtidos para a análise de F_{st} , principalmente a realizada apenas com as quatro localidades – Barra do Choça, Correntina, Nova Andradina e Santa Isabel do Rio Preto – constituíram uma surpresa, já que apesar da boa amostragem e da utilização de nove locos polimórficos, ainda assim não foi detectado nem um par de localidades com diferenciação significativa, mesmo a distância em linha reta entre as localidades sendo muito extensa: Santa Isabel-Nova Andradina aproximadamente 950 km, Correntina-Santa Isabel 922 km, Santa Isabel-Barra do Choça 899 km, Barra do Choça-Nova Andradina 1505 km, Barra do Choça-Correntina 410 km e Correntina-Nova Andradina 1307 km, além de serem localidades em diferentes biomas: Mata Atlântica, Cerrado, transição entre Caatinga e Mata Atlântica. Entretanto, foram detectados muitos alelos privados (Tabela 4.19), de um até sete por localidade.

Segundo Hartl & Clark (2010), o valor do F_{st} é determinado pela variância nas frequências alélicas das populações, e por isso é mais afetado por alelos polimórficos em frequências intermediárias. Ainda de acordo com os autores, alelos raros presentes em uma população, mas ausentes em outras, dificilmente têm efeito sobre o F_{st} . Curiosamente, a maioria dos alelos privados detectados pertence ao loco CB03. Os outros locos apresentam de um a três alelos privados, contra 17 de CB03. Esse loco, portanto, aparentemente apresenta alta taxa de mutação e ausência de constrição de tamanho. A alta taxa de mutação do loco poderia estar

relacionada a altos níveis de homoplasia, como mencionado para *Paroaria dominicana*. Entretanto, a ausência na constrição de tamanho deve contrabalancear a alta taxa de mutação, já que foi realizada uma análise de diferenciação populacional sem esse loco e o resultado foi exatamente o mesmo, com Barra do Choça com diferenciação significativa em relação ao grupo de amostras denominado MGN (Bocaiúva, Turmalina e Virgem da Lapa) e nenhum outro par de localidades com diferenciação (dados não apresentados). Se o loco apresentasse altos níveis de homoplasia, a estimativa do F_{st} tenderia a ser desinflada, e a retirada do loco poderia até revelar alguma diferenciação, o que não ocorreu. Da mesma forma, a estimativa de R_{st} apenas fez com que MGN fosse diferenciada de Correntina e Nova Andradina, entretanto as outras localidades continuam sem diferenciação alguma. O alto número de alelos privados identificados pode estar relacionado à provável presença de indivíduos aparentados na amostragem. Apesar de ter sido feito um esforço para evitar a ocorrência dessa situação, indivíduos de fragmentos próximos podem apresentar parentesco.

Os métodos de partição de amostras também não apresentaram resultados claros. Os *clusters* propostos pela DAPC não apresentam correlação com a geografia, e resultados como a localidade SP apresentar apenas um dos *clusters* são muito provavelmente devidos ao pequeno número amostral obtido para a região. O programa Structure indicou a existência de quatro *clusters* na amostragem com todas as localidades, mas o gráfico de barras gerado não permite a identificação clara de diferentes grupos. A única conclusão que é possível tirar do gráfico de barras é que foram amostrados alguns indivíduos em Nova Andradina e outros em Araponga (MGL) que apresentam uma proporção de *clusters* inferidos (Figura 4.28) maior do que o restante da amostragem. Porém, é interessante também lembrar como o programa faz a inferência da presença de *clusters* na amostragem – realiza uma busca por partições de amostras que minimizem desequilíbrios de Hardy-Weinberg e de ligação. Se por algum motivo – flutuações populacionais, parentesco na amostragem, entre outros – esses desvios ocorrerem, o programa tenderá a super-estimar o valor de

ks (Falush *et al.*, 2003), o que explicaria a inferência de dois, três e quatro *clusters*.

Assim, a análise utilizando o Structure, a DAPC, o Fst e mesmo a ocorrência de alelos privados encontrados para as localidades mostram que não é possível detectar diferentes *clusters* genéticos com a presente amostragem e com os locos utilizados. O foco deste trabalho foi buscar de forma detalhada por um sinal de diferenciação genética ao longo da distribuição da espécie, o que teria influência no manejo de indivíduos provenientes de apreensão. Mesmo que houvesse uma estrutura genética muito sutil para a espécie, seria esperado que a base de dados e os métodos utilizados detectassem ao menos algum sinal. Portanto, não é possível refutar a hipótese de pan-mixia para *Saltator similis*.

Esse cenário pode estar refletindo uma pan-mixia histórica, uma vez que, apesar de não existirem estudos publicados sobre capacidade de dispersão para *S. similis*, com a recente ocupação das áreas de mata e Cerrado nos últimos 300 anos, dificilmente haveria corredores de dispersão para essa espécie que cobrissem uma área tão ampla do território brasileiro. Ou seja, existe a possibilidade da pan-mixia ainda ser detectada, pois a provável fragmentação recente ainda não teve tempo de ser refletida nos genes, assim como é possível que a capacidade de dispersão da espécie seja grande e as áreas fragmentadas não constituam barreiras à dispersão e a pan-mixia esteja ocorrendo nos dias de hoje.

Pode-se argumentar também que o grande volume de indivíduos comercializados ilegalmente, aliado ao grande número de solturas realizadas em locais diferentes da origem dos animais, poderia contribuir para esta situação. Entretanto, se esta hipótese fosse real, seria esperado que pudesse ser detectado ao menos um resquício da estruturação histórica, o que não ocorreu.

Frankham *et al.* (2011), em um trabalho sobre técnicas que auxiliam a predição de depressão por exocruzamento, afirmam que a DE tem maior probabilidade de ocorrer em populações diferenciadas e que apresentem pelo menos uma das seguintes características: diferenças cariotípicas fixadas, que estejam isoladas há mais de 500 anos, ou então que habitem

ambientes substancialmente diferentes há mais de 20 gerações. Caso contrário, a probabilidade de ocorrência por exocruzamento torna-se muito pequena.

Para Frankham *et al.* (*op cit.*) é necessário procurar maximizar a similaridade entre populações a serem cruzadas, de forma a minimizar a possibilidade de ocorrência de DE. Entretanto, a Biologia da Conservação está diretamente relacionada com a ação rápida baseada na melhor informação disponível no momento (Soulé, 1985), e, na maioria das vezes, faltam recursos e/ou tempo para testar de forma detalhada os efeitos da hibridização, principalmente em países em desenvolvimento, e para espécies não carismáticas. Ainda segundo os autores, muitas populações poderiam se beneficiar do fluxo gênico com outras populações, principalmente no que diz respeito ao risco de sofrerem depressão por endocruzamento. Com isso, Frankham *et al.* (2011) defendem que se as populações não apresentam uma das características citadas acima, até poderiam se beneficiar do estabelecimento de fluxo gênico com outras populações. Da mesma forma, é necessário fazer uma escolha em relação aos animais apreendidos e reabilitados. Não foi encontrado nenhum indício de diferenciação profunda entre as localidades analisadas para *S. similis*. Do ponto de vista genético (que de forma alguma é o único que deve ser levado em consideração em solturas, repatriações, reintroduções e translocações de fauna), uma vez que o presente trabalho não pode refutar a hipótese de pan-mixia, os dados sugerem que caso aconteça alguma mistura entre indivíduos de *S. similis* de origens diferentes, a probabilidade de ocorrência de depressão por exocruzamento (DE) é praticamente nula.

A ausência de estrutura genética, assim como os desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrados para as amostras de *S. similis* analisadas como um único conjunto, pode ter relação com flutuações populacionais históricas. O teste que busca detectar sinais de expansão populacional (teste χ^2 , Reich *et al.*, 2010) não apresentou valores significativos. Entretanto, dois testes (Cornuet & Luikart, 1996 e Garza-Williamson, 2001) que detectam gargalos populacionais recentes, apresentaram fortes indícios de ocorrência deste fenômeno. O teste de

detecção de gargalo populacional baseado em alteração na frequência de alelos raros (Luikart *et al.*, 1998) não apresentou indícios de ocorrência de diminuição populacional marcada, entretanto, o gráfico da figura 4.31 mostra que há predominância de alelos em frequência muito baixa, com a quase ausência de alelos em frequência moderada e alta (0.2 a 1.0). Apesar de não ter sido detectado sinal de expansão populacional, esse cenário poderia ser condizente com uma expansão recente após a ocorrência de gargalo. Além disso, os impactos da maior ocupação do Cerrado e Mata Atlântica ocorrida nos últimos 200 anos, que trouxe perda e degradação de habitat e super-exploração da espécie para suprir o comércio ilegal, poderiam explicar a ocorrência de um gargalo populacional em *S. similis*. Como mencionado para *P. dominicana*, diversos estudos sugerem que a utilização dos métodos de proporção do número total de alelos em relação à amplitude da distribuição dos tamanhos alélicos (Garza-Williamson, 2001) e de excesso de heterozigotos (Cornuet & Luikart, 1996) utilizando o IAM estão entre os mais robustos para detecção de gargalos populacionais recentes (*e.g.* Cristescu *et al.*, 2010; Le Page *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2011). Com isso, a hipótese de gargalo populacional recente para *S. similis* pode ser considerada plausível.

Curiosamente, concomitante com a falta de estrutura genética populacional, a espécie apresenta variação marcada de dialetos nos cantos. Este cenário pode ser devido à variação na transmissão de sons em habitats diferentes, de acordo com a hipótese da adaptação acústica (Morton, 1995 *apud* Nicholls *et al.*, 2006). Essa hipótese propõe que a estrutura de sinais acústicos utilizados para comunicação de longa distância é adaptada para minimizar a degradação do sinal, ou a variabilidade da degradação, sob as condições ambientais predominantes do habitat do indivíduo que envia o sinal (Brown & Handford, 2000 *apud* Tubaro & Lijtmaer, 2006). Assim, de acordo com o esperado por previsões teóricas, muitos estudos encontraram diferenças estruturais entre dialetos de aves de habitats abertos e fechados (Tubaro & Lijtmaer, *op cit*).

Nicholls *et al.* (2006) compararam a divergência genética obtida para locos de microssatélites com variações no dialeto de canto de *Ptilonorhynchus*

violaceus, pássaro-cetim ou santin-azul, na costa leste australiana, buscando entender se há congruência entre a estrutura genética detectada na variação neutra e os diferentes grupos vocais registrados. Os autores encontraram tanto populações geneticamente diferenciadas quanto proximamente relacionadas com dialeto semelhante, assim como divergência vocal em populações com altos níveis de fluxo gênico. A conclusão do trabalho foi de que os resultados claramente demonstraram a independência da divergência vocal em relação à estrutura detectada para a variação neutra nesta espécie.

S. similis habita primariamente bordas de matas, e ocorre tanto no Cerrado quanto em Mata Atlântica e áreas de transição. Contudo, a forma como o canto se propaga em uma borda de Mata Atlântica, cercada por floresta, deve de fato ser diferente da forma como se propaga em uma borda de mata de Cerrado, com maior quantidade de áreas abertas. Portanto, é possível que a divergência nos dialetos observada para *S. similis* não seja acompanhada por algum tipo de vicariância não detectada, mas sim resultante de variação vocal a diferentes ambientes, uma hipótese interessante para ser testada em estudos futuros.

Ao citar Wright *et al.* (2005), Nicholls *et al.* (2006) ainda argumentam que a discordância entre dialeto e estrutura genética populacional seria típica de espécies que aprendem as vocalizações. Este é justamente o caso de *S. similis*, que é muito apreciado como pássaro canoro para competições, e a técnica de ensinar as variações de canto mais apreciadas é totalmente dominada pelos criadores. Assim, é muito provável que, assim como o pássaro-cetim, *S. similis* apresente variações de dialeto de canto relacionadas à estrutura de habitat e não à divergência genética. Essa situação, assim como o domínio das técnicas de ensino de canto e o conhecimento de alguns dialetos e suas regiões de ocorrência, pode ser aliada de possíveis futuros esforços de soltura de animais apreendidos e reabilitados

6. Conclusões

6.1. Paroaria dominicana

Os resultados de análises de diferenciação populacional e flutuações populacionais históricas encontrados pelo presente estudo indicam que:

(1) a espécie *Paroaria dominicana* não pode ser considerada como pan-mítica, tendo sido detectados neste trabalho três potenciais *clusters* representados pelas amostras obtidas para a região nordeste da amostragem, a região sudoeste e a região leste;

(2) apesar de ter sido encontrada diferenciação populacional significativa para os *clusters*, o fluxo gênico e a migração entre eles são altos;

(3) com o provável alto fluxo gênico entre os *clusters* a possibilidade de ocorrência de depressão por exocruzamento no caso de mistura de indivíduos de diferentes origens é reduzida;

(4) existe uma grande chance de haver dispersão diferencial entre machos e fêmeas em *P. dominicana*, o que explicaria a ausência de estrutura no marcador matrilinear e presença nos locos nucleares;

(5) não foi possível detectar sinal da expansão populacional com a presente amostragem e número de locos, o que não significa que ela não tenha ocorrido;

(6) os dados indicam que a espécie passou por gargalo populacional recente que pode estar relacionado à ocupação da Caatinga e à captura de aves para suprir a demanda do comércio ilegal; e

(7) existe uma chance de que a maioria dos indivíduos de *P. dominicana* traficados para a região sudeste seja proveniente da região mais ao norte da amostragem obtida, especialmente da região norte da Bahia, e o Estado de Pernambuco, como apontam as informações policiais e a tendência obtida nos testes de atribuição realizados.

6.2. *Saltator similis*

Após as análises realizadas, pode-se concluir que:

(1) não foi possível detectar nenhum sinal de estruturação genética em *Saltator similis* com os locos e a as amostras utilizados, não permitindo refutar a hipótese nula de pan-mixia;

(2) de acordo com os dados deste trabalho, é muito improvável a ocorrência de depressão por exocruzamento nesta espécie por mistura de indivíduos de diferentes origens;

(3) a variação no dialeto no canto deve estar relacionada à propagação do som nos diferentes ambientes e não a um isolamento genético entre populações;

(4) não foi detectado sinal de expansão populacional recente;

(5) foram obtidas evidências de um possível gargalo populacional para a espécie que pode estar relacionado à ocupação do Cerrado e Mata Atlântica e à captura de aves para suprir a demanda do comércio ilegal.

6.3. Conclusões Gerais

Este trabalho consistiu um esforço de muitas pessoas para a abertura de uma linha de pesquisa que tem por objetivo não apenas o desenvolvimento de Ciência básica, mas o de conhecimento que pode ser aplicado em esforços de conservação, principalmente no auxílio a esforços de investigação na tomada de decisões visando à mitigação dos efeitos do tráfico de fauna.

A pesquisa mostrou que, logicamente, a possibilidade de geração de informações úteis para o manejo depende de espécie para espécie, mas que com uma boa amostragem é possível gerar dados que auxiliem essa tomada de decisões. O desenvolvimento das análises populacionais levou ao surgimento de novas hipóteses e perguntas acerca da história evolutiva das espécies, assim como de possíveis barreiras ou corredores de dispersão, que tornam-se interessantes pontos de partida para estudos futuros.

Para *P. dominicana* a amostragem permitiu a inferência de três grandes *clusters*, inclusive com a realização de testes de atribuição de espécimes apreendidos. Para *S. similis* a impossibilidade de reconhecer

populações diferenciadas também traz informações importantes para o manejo da espécie e dos indivíduos apreendidos, mesmo não sendo possível realizar testes de atribuição. Já para *S. frontalis* e *C. brissonii* o desenvolvimento de marcadores moleculares polimórficos foi muito importante, entretanto, ficou claro que para continuar este trabalho será necessário o desenvolvimento de estratégias de campo específicas para a coleta de mais amostras de cada uma das espécies.

Em suma, este trabalho mostrou que é possível aliar a geração imparcial de conhecimento científico básico à sua aplicação para questões urgentes de manejo, e que é sim possível e necessário utilizar ferramentas da Genética de Populações em conjunto com informações ecológicas, morfológicas, biogeográficas e policiais para um maior entendimento sobre o tráfico de fauna no Brasil.

**“O que me preocupa não é o grito dos maus, mas o
silêncio dos bons”.**

(Martin Luther King).

Artigos que serão gerados:

Paper #1:

Primer note: development of polymorphic microsatellite markers to four bird species exploited by the illegal wildlife trade in Brazil

Paper #2:

Inference of the population genetic structure of Paroaria dominicana (Aves: Passeriformes: Thraupidae) using eight new microsatellite markers and implications to the investigation of wildlife trafficking

Paper #3:

*Lack of population structure in a tanager (*Saltator similis*: Aves: Thraupidae) highly exploited by wildlife illegal trade and implications to the management of seized individuals*

7. Resumo

O comércio ilegal de fauna é hoje uma das principais ameaças aos animais silvestres brasileiros, junto com a perda e degradação de habitats. O grupo pelo qual existe maior demanda é o das aves, principalmente as canoras. Paralelamente, o número de apreensões de aves provenientes do comércio ilegal tem crescido a cada ano. Apesar de um grande número de indivíduos não sobreviver, dos que sobrevivem, muitos são recuperados e estão, em teoria, aptos a voltarem à vida livre. Contudo, esforços de repatriação devem ser vistos com extrema cautela, já que grandes prejuízos podem ser trazidos para as populações naturais se inseridos nelas indivíduos de grupos genéticos diferentes. Com isso, tornam-se extremamente necessários estudos demográficos e de estrutura genética de espécies com grande demanda no comércio ilegal. Além de auxiliar tomadas de decisões sobre possíveis esforços de repatriação, estes estudos contribuirão com o maior conhecimento das espécies.

Este projeto teve como objetivo o estudo da genética de populações de quatro espécies de passeriformes sabidamente de grande interesse para o comércio ilegal, procurando abranger a maior área possível de suas distribuições: o azulão (*Cyanoloxia brissonii*), o trinca-ferro (*Saltator similis*), o galo-da-campina (*Paroaria dominicana*) e o pixoxó (*Sporophila frontalis*). Foram realizadas 19 viagens a campo, coletadas 522 amostras (entre amostras de apreensão e de populações naturais) e outras foram obtidas por colaboração com diversas instituições. Foram construídas quatro bibliotecas genômicas com o intuito de desenvolver oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de marcadores microsatélites espécie-específicos, que foram posteriormente testados para as outras três espécies. Partido de mais de 700 clones sequenciados, foram descritos oito locos informativos para *P. dominicana*, nove para *S. similis*, sete para *C. brissonii* e quatro para *S. frontalis*. Por conta de dificuldade de obtenção de amostragens representativas, as análises populacionais foram realizadas com *P. dominicana* e *S. similis*.

As análises de estrutura genética populacional (com 74 amostras) indicaram estruturação populacional sutil, porém significativa ($p < 0.01$) para *P. dominicana*, com a descrição de três *clusters*: (1) nordeste, que englobou as localidades de coleta Paraíba, Trindade e Petrolina, e apresentou heterozigose observada (H_o) média de 0.736 e heterozigose esperada (H_e) média de 0.753; (2) sudoeste, composto pelas localidades Parnaguá, Beira Rio e Vitória da Conquista, com H_o 0.624 e H_e 0.731; e (3) leste, composto por Canudos e Feira de Santana, H_o 0.750 e H_e 0.768. A presença de estrutura genética nos marcadores nucleares e ausência no DNA mitocondrial (observada em estudos anteriores) podem indicar que existe filopatria dos machos e dispersão diferencial em *P. dominicana*. O

teste kg não identificou sinal de expansão populacional, portanto, a hipótese de expansão populacional recente da espécie com base na expansão da Caatinga datada de quinze mil anos não foi corroborada. Foram encontrados sinais significativos de gargalo populacional recente com dois testes diferentes (*Bottleneck* e *M-ratio*) condizentes com a ocupação e degradação da Caatinga e a super-exploração da espécie nos últimos 200 anos. Além disso, os resultados permitiram o surgimento de uma nova hipótese, interessante para ser tratada em trabalhos futuros: um possível corredor de fluxo gênico entre os *clusters* nordeste e sudoeste, ao longo do Rio São Francisco. Por fim, foram também realizados testes de atribuição com 49 amostras de indivíduos da espécie provenientes de apreensões de fauna comercializada ilegalmente em São Paulo e todas foram atribuídas com probabilidade que variou de 0.554 a 0.713 ao *cluster* nordeste. Essa tendência é relevante, e deverá ser levada em conta tanto para esforços de prevenção do tráfico da espécie, quanto o desenvolvimento de planos de repatriação dos indivíduos apreendidos. Contudo, vale mencionar que, mesmo sempre sendo de suma importância que indivíduos apreendidos e reabilitados sejam soltos o mais próximo possível de sua real população de origem, dificilmente a mistura entre indivíduos de *clusters* diferentes levaria a uma depressão por exocruzamento.

Não foi encontrada estrutura genética populacional significativa para *S. similis* (66 amostras) nem com a análise de diferenciação com populações definidas *a priori*, e nem através de duas análises de partição de amostras (análise discriminante de componentes principais e a realizada pelo Structure, baseada em algoritmo Bayesiano). Logo, não foi possível refutar a hipótese nula de pan-mixia. A espécie apresentou heterozigose média observada 0.643 enquanto que a esperada foi de 0.757. Os altos níveis de Hardy-Weinberg detectados sugerem que o cenário observado possa ser devido a efeitos demográficos. Os testes kg não identificaram sinal de expansão populacional recente. Entretanto, dois testes de gargalo populacional (*Bottleneck* e *M-ratio*) indicaram sinais de redução populacional recente, condizentes com a maior ocupação e degradação da Mata Atlântica e do Cerrado nos últimos 200 anos. A variação nos dialetos do canto observada para a espécie provavelmente está ligada à propagação do som nos diferentes ambientes e não a um isolamento genético entre populações. A ausência de estrutura genética permite afirmar que a probabilidade de ocorrência de depressão por exocruzamento causada por fluxo gênico entre indivíduos de origens diferentes é praticamente nula para *S. similis*.

8. Abstract

Wildlife trafficking is a major threat to Brazilian biodiversity, with millions of specimens withdrawn from nature every year to supply the consumer markets. In Brazil, the pet trade generates a major demand for birds. After seizure from the illegal trade, rehabilitation and release is one way of mitigating the negative impacts on wild bird populations, but those releases could create more problems for the natural populations. Knowledge of the species' genetic structure is crucial to help avoid the possibility of outbreeding depression and to guide responsible releases.

This project's main goal was the study of the genetic structure of four passerine species, among the most trafficked birds in Brazil: ultramarine grosbeak (*Cyanoloxia brissonii*), green-winged saltator (*Saltator similis*), red-cowled cardinal (*Paroaria dominicana*) and buffy-fronted seedeater (*Sporophila frontalis*). We obtained 522 tissue/blood samples (from individuals with known origin as well as those seized from the illegal trade) both in field work trips and through collaboration with various institutions. We built four species-specific genomic libraries, all of which were cross-tested in the other three species. From over 700 sequenced clones, we developed eight informative microsatellite loci for *P. dominicana*, nine for *S. similis*, seven for *C. brissonii* and four for *S. frontalis*. Genetic structure analyses were performed only for *P. dominicana* and *S. similis* due to the difficulty of obtaining representative samples for the other two species. Data was analyzed both with and without *a priori* definition of populations using discriminant analysis of principal components, Bayesian clustering algorithms, and fixation indices.

Genetic structure of *P. dominicana* was inferred using 71 samples with known origin and subtle but significant ($p < 0.01$) genetic structure was found, with the description of three clusters: (1) northeast, which encompass the sampling localities of Paraíba, Trindade e Petrolina, with mean observed heterozygosity (H_o) of 0.736 and mean expected heterozygosity (H_e) of 0.753; (2) southwest, which encompass the localities Parnaguá, Beira Rio e Vitória da Conquista, with H_o 0.624 and H_e 0.731; and (3) east, which encompass Canudos and Feira de Santana, with H_o 0.750 and H_e 0.768. Occurrence of outbreeding depression for this species is unlikely due to high gene flow among clusters. The presence of genetic structure for nuclear markers not detected for mtDNA (previous studies) indicates male philopatry and different dispersion patterns between male and females. No population expansion signal was detected using τ tests, which precludes us from corroborating a previously proposed hypothesis of population expansion congruent with the Caatinga expansion 15 thousand years ago. Two tests (Bottleneck e M -ratio) indicated the occurrence of recent population bottlenecks for *P. dominicana*, which can be explained by the intense occupation, habitat degradation and over-exploitation of the Caatinga in the last 200 years. We also propose a

new hypothesis, to be tested in future studies: the existence of a dispersion route along the Sao Francisco river, promoting gene flow between northeast and southwest clusters. Furthermore, we performed assignment tests in 49 samples from specimens seized from the illegal trade in Sao Paulo. All of them were assigned to the same “northeast” cluster with probability 0.554-0.713, showing a clear trend and a relevant result which corroborates police intelligence information.

For *S. similis*, no significant genetic structure was detected (using 66 samples), so we could not refute the pan-mixia null hypothesis. Although this species’ range is a large, and now fragmented area, the possibility of outbreeding depression resulting from mixing populations is highly unlikely, which does not preclude consideration of other characteristics prior to release into the wild. The observed heterozygosity was 0.643 while the expected was 0.757. High levels of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium may be due to population fluctuations. No population expansion signal was detected (kg test), but two tests (Bottleneck e M-ratio) indicate the occurrence of recent population bottlenecks, which could be related to the intense occupation, habitat degradation and over-exploitation of the Cerrado and Atlantic Forest in the last 200 years. Variation in song dialects observed in this species is probably related to characteristics of sound propagation in different environments, rather than to genetic isolation.

Knowledge of genetic structure is one of the most important steps towards intelligent management of rehabilitated seized animals.

9. Referências Bibliográficas

- AMOS, W. & BALMFORD, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity*, 87: 257-265.
- AVISE, J.C. 1996. The scope of conservation genetics. *In*: (Avice, J.C. & Hamrick, J.L. eds.) Conservation Genetics. Case Histories from Nature. Chapman & Hall, New York. p. 1-9.
- BAKER, C.S. & PALUMBI, S.R. 1994. Which whales are hunted? Molecular genetic evidence for illegal whaling. *Science*, 265: 1538-1539.
- BALAZINA, A. 2007. Cresce apreensão de animais traficados. Folha de São Paulo, cotidiano, C5.
- BALDING, D.J.; BISHOP, M. & CANNINGS, C (eds). 2007. Handbook of statistical genetics, vol 2, 3rd ed. Willey. 637p.
- BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology*, 11: 155-165.
- BALMFORD, A.; MACE, G.M. & GINSBERG, J.R. 1998. The challenges to conservation in a changing world: putting processes on the map. *In*: Conservation in a changing world (eds Mace, G.M.; Balmford, A. & Ginsberg, J.R.). Cambridge University Press, Cambridge, p:1-28.
- BARBER-MEYER, S.M. 2010. Dealing with the clandestine nature of wildlife trade Market surveys. *Conservation Biology*, 24: 918-923.
- BORGES, R.C.; OLIVEIRA, A.; BERNARDO, N.; MARTONI, R. & COSTA, M.C. 2006. Diagnóstico da fauna silvestre apreendida e recolhida pela Polícia Militar de Meio Ambiente de Juiz de Fora, MG (1998 e 1999). *Revista Brasileira de Zoociências*, 8(1):23-33.
- BRASIL. Constituição, 1988. 1990. Constituição da República Federativa do Brasil: promulgada em 5 de outubro de 1988. Organização do texto: Juarez de Oliveira. 4 ed. São Paulo, Saraiva. 168 p.
- BRON HANDFORD. 2000.
- Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO). 2011. <http://www.cbro.org.br/CBRO/pdf/AvesBrasil2011.pdf>
- CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J. & TANG, J. 2008. Enhanced Bayesian modeling in BAPS software for learning genetic structure of populations. *BMC Bioinformatics*, 9: 539.
- CORNUET, J.M. & LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- CORNUET, J.M.; PIRY, S.; LUIKART, G.; ESTOUP, A. & SOLIGNAC, M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153:1989-2000.

- COWLING, R.M. & PRESSEY, R.L. 2001. Rapid plant diversification: planning for an evolutionary future. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 98: 5452-5457.
- CROZIER, R.H. 1997. Preserving the information content of species: Genetic diversity, phylogeny, and conservation worth. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28: 243-268.
- CRANDALL K.A.; BININDA-EMONDSO.R.P., MACE, G.M. & WAYNE, R.K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 290-295.
- DI RIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDES, A.M.; SLATKIN, M. & FREIMER, N.B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 3166-3170.
- EARL, D.A. & VONHOLDT, B.M. 2011. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- EIZIRIK, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics*, 19: 23-29.
- Elmer, K.; Dávila, J. & Loughheed, S. 2006. Isolation of simple and compound polymorphic tetranucleotide microsatellites for the neotropical leaf litter frog *Eleutherodactylus ockendeni* (Leptodactylidae). [Molecular Ecology Notes](#), 6(3):891-893.
- ERNEST, H.B.; BOYCE, W.M.; BLEICH, V.C.; MAY, B.; STIVER, S.J. & TORRES, S.G. 2003. Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conservation Genetics*, 4: 353-366.
- ESTOUP, A.; TAILLIEZ, C.; CORNUET, J.M. & SOLIGNAC, M. 1995. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution*, 12: 1074-1084.
- ESTOUP, A. & CORNUET, J.M. 2003. Microsatellite evolution: inferences from population data. In: GOLDSTEIN, D.B. & SCHLÖTTERER, C (eds). 2003. *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press. New York. 352p.
- ESTOUP, A.; JARNE, P. & CORNUET, J.M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.

- FALUSH, D.; STEPHENS, M. & PRITCHARD, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M. & PRITCHARD, J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574-578.
- FRANCISCO, M.R.; GIBBS, H.L.; GALETTI, M.; LUNARDI, V.O. & GALETTI JUNIOR, P.M. 2007. Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 16: 4908-4918.
- FRANKHAM, R.; BALOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge. 617p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; ELDRIDGE, M.D.B.; LACY, R.C.; RALLS, K.; DUDASH, M.R. & FENSTER, C.B. 2011. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology*, 25: 465-475.
- GAGGIOTTI, O.E.; LANGE, O.; RASSMAN, K. & GLIDDON, C. 1999. A comparison of indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular ecology*, 8: 1513-1520.
- GARZA, J.C. & WILLIAMSON, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305-318.
- GLENN, T.C. & SCHABLE, N.A. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395: 202-222.
- GOLDSTEIN, P.Z.; DESALLE, R.; AMATO, G. & VOGLER, A.P. 2000. Conservation genetics at the species boundary. *Conservation Biology*, 14: 120-131.
- GOLDSTEIN, D.B. & SCHLÖTTERER, C (eds). 2003. Microsatellites, evolution and applications. Oxford University Press. New York. 352p.
- Goddard, K. W. 2005. Veterinary Aspects of Forensic Medicine, Wild Animals. Encyclopedia of forensic and legal medicine, Elsevier, Ltd. 1: 344-349.
- GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente, Polícia Militar do Estado de São Paulo, Polícia Militar Ambiental. 2007. II Relatório do tráfico de animais da fauna silvestre, referente a 2006.
- GRANTS AU, R. 2010. Guia completo para identificação das aves do Brasil (ed. Palo Jr, H.). Vento Verde, São Carlos, SP. Vol.2, 1ªed.
- GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M.C.; ORR, K & DAWSON, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7: 1071-1075.
- HALL, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- HAMILTON, M.B.; PINCUS, E.L., DI FIORE, A. & FLEISCHER, R.C. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 27: 500-2, 504-7.

- HARTL, D.L. & CLARK, A.G. 2010. Princípios de Genética de Populações (4ª ed.). ARTMED, 660p.
- HOBSON, K.A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia*, 120: 314-326.
- HOFFMAN, J.I.; GRANT, S.M.; FORCADA, J. & PHILLIPS, C.D. 2011. Bayesian inference of a historical bottleneck in a heavily exploited marine mammal. *Molecular Ecology*, 20: 3989-4008.
- HONNEN, A.C.; HAILER, F.; KENNTNER, N.; LITERAK, I.; DUBSKA, L. & ZACHOS, F.E. 2010. Mitochondrial DNA and nuclear microsatellite loci reveal high diversity and genetic structure in an avian top predator, the white tailed sea eagle, in central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 727-737.
- HUBISZ, M.J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M. & PRITCHARD, J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology resources*, 9: 1322-1332.
- IBAMA. website, acessado em 2007. <http://www.ibama.gov.br/fauna/trafico/introducao.php>
- IBAMA. website, acessado em 2008. <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/Caatinga.htm>
- IBGE. website, acessado em 2008. <http://www.ibge.gov.br/home/>
- IDT, INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. PrimerQuest: www.idtdna.com/scitools/applications/primerquest/ acessado em 2009.
- JOMBART, T. 2008. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24: 1403-1405.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S. & BALLOUX, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11:94 doi:10.1186/1471-2156-11-94.
- JOMBART, T. 2011. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetics markers, manual do programa (disponível para download em <http://adegenet.r-forge.r-project.org/>).
- KIMURA, M. & CROW, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
- KIMURA, M. & OHTA, T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 75: 2868-2872.
- LEE, P.L.M.; BRADBURY, R.B.; WILSON, J.D.; FLANAGAN, N.S.; RICHARDSON, L.; PERKINS, A.J. & KREBS, J.R. 2001. Microsatellite variation in the yellowhammer *Emberiza citrinella*: population structure of a declining farmland bird. *Molecular Ecology*, 10: 1633-1644.
- LEE, C.; ABDOL, A. & HUANG, C-H. 2009. PCA-based population structure inference with generic clustering algorithms. *BMC Bioinformatics*, 10 (Suppl 1): S73 doi:10.1186/1471-2105-10-S1-S73.

- LINACRE, A.; GUSMAO, L.; HECHT, W.; HELMANN, A.P.; MAYR, W.R.; PARSON, W.; PRINZ, M.; SCHNEIDER, P.M. & MORLING, N. 2011. ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Science International: Genetics*, 5: 501-505.
- LIU, N. & Zhao, H, 2006. A non-parametric approach to population structure inference using multilocus genotypes. *Human Genomics*, 2: 353-364.
- LUIKART, G.; ALLENDORF, F.W., CORNUET, J.M. & SHERWIN, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89, 238-247.
- MALAUSSA, T.; GILLES, A.; MEGLECZ, E.; BLANQUART, H.; DUTHOY, S.; COSTEDOAT, C.; DUBUT, V.; PECH, N., *et al.* 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX. Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02992.x
- MANEL, S.; BERTHIER, P. & LUIKART, G. 2002. Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation biology*, 16(3):650-659.
- MATOS, D.M.S. & BOVI, M.L.A. 2002. Understanding the threats to biological diversity in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 11:1747-1758.
- MAYR, E. 2005. *Biologia, Ciência Única - Reflexões sobre a autonomia de uma disciplina científica*. São Paulo: Companhia das Letras. Prefácio de Drauzio Varella; tradução de Marcelo Leite. (Título original: *What makes biology unique?: considerations on the autonomy of a scientific discipline*, 2004).
- MEFFE, G.K. & CARROLL, R. 1994. What is Conservation Biology? In: Meffe, G.K. & Carroll, R. *Principles of Conservation Biology*. Sunderland: Sinauer Associates, p. 1-27.
- MILOT, E.; WEIMERSKIRCH, H. & BERNATCHEZ, L. 2008. The sea bird paradox: dispersal, genetic structure and population dynamics in a highly mobile, but philopatric albatross species. *Molecular Ecology*, 17: 1658-1673.
- MORAN, P. 2002. Current conservation genetics: building an ecological approach to the synthesis of molecular and quantitative genetic methods. *Ecology of Freshwater Fish*, 11: 30-55.
- MORIN, P. A., MANASTER, C., MESNICK, S. L. & HOLLAND, R. 2009. Normalization and binning of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with allelogram. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1451-1455. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02672.x
- MORITZ, C. 1994. Defining "Evolutionary Significant Units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9:373-375.
- MORITZ, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51: 238-254.

- NICHOLLS, J.A.; AUSTIN, J.J.; MORITZ, C. & GOLDIZEN, W. 2006. Genetic population structure and call variation in a Passerine bird, the satin bowerbird, *Ptilonorhynchus violaceus*. *Evolution*, 60: 1279-1290.
- NODARI, F. 2008. Filogenia do gênero *Paroaria* (Aves: Passeriforme: Oscines) e filogeografia de *Paroaria dominicana*. Dissertação de mestrado em Biologia/Genética. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, L. & STROBECK, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4:347-354.
- PALÁCIO DO PLANALTO. Website http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2007-2010/2008/Decreto/D6514.htm#art153 acessado em Junho de 2011.
- PALÁCIO DO PLANALTO. Website http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm acessado em janeiro de 2012.
- PALÁCIO DO PLANALTO. Website http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constitui%C3%A7ao.htm acessado em janeiro de 2012.
- PALUMBI, S.R. & CIPRIANO, F. 1998. Species identification using genetics tools: The value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal of Heredity*, 89: 459-464.
- PALUMBI, S.R. & CIPRIANO, F. 1999. Harpoons fly in whale wars – reply. *Nature* 398: 366.
- PARSONS, K.M.; DURBAN, J.W. & CLARIDGE, D.E. 2006. Population genetic structure of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the northern Bahamas. *Marine Mammal Science*, 22: 276-298.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- PETERS, E.L. & PIRES, P.T.L. 2002. Legislação Ambiental Federal. 2ed. Ed. Juruá. Curitiba. 476p.
- PHILLIMORE, A.B.; OWENS, I.P.F.; BLACK, R.A.; CHITTOCK, J.; BURKE, T. & CLEGG, S.M. 2008. Complex patterns of genetic and phenotypic divergence in an island bird and the consequences for delimitating conservation units. *Molecular Ecology*, 17: 2839-2853.
- PIRSIG, R.M. 1974. *Zen and the Art of Motorcycle Maintenance: An Inquiry Into Values*. Morrow, New York.
- PRIMMER, C.R.; MÖLLER, A.P. & ELLEGREN, H. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5: 365-378.
- PRITCHARD, J.K.; STEFENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, X. & FALUSH, D. 2010. Documentation for structure software, version 2.3. University of Chicago, Chicago (disponível para download em <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>)

- PURVIS, A. & HECTOR, A. 2000. Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405: 212-219.
- QUELLER, D.C.; STRASSMAN, J.E. & HUGHES, C.R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8:53-61.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2009. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- RAMBAUD, A. 1996. Sequence alignment editor (Se-Al), version 1.0 alpha 1. [Computer program] Oxford University, Oxford, UK.
- REGUEIRA, R.F.S. & BERNANRD, E. 2012. Wildlife s149: 16-22.inks: Quantifying the impact of ilegal Bird trade in street markets in Brazil. *Biological Conservation*,
- REICH, D.E. & GOLDSTEIN, D.B. 1998. Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 95: 8119-8123.
- REICH, D. E.; FELDMAN, M.W. & GOLDSTEIN, D.B. 1999. Statistical properties of two tests that use multilocus data sets to detect population expansions. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 453-466.
- RENTAS. 2002. 1º Relatório Nacional sobre o tráfico de Fauna Silvestre. 107p.
- RIBON, R. SIMON, J.E. & DE MATTOS, T. 2003. Bird extinctions in Atlantic forest fragments of the Viçosa region, southeastern Brazil. *Conservation Biology*, 17(6): 1827-1839.
- RIDGELY, R.S. & TUDOR, G. 2001. The birds of South America: the suboscine passerines. Oxford University Press.
- ROCHA, M.S.P.; CAVALCANTI, P.C.M.; SOUSA, R.L. & ALVES, R.R.N. 2006. Aspectos da comercialização ilegal de aves nas feiras livres de Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 6(002):204-221.
- ROSS, H.A.; LENTO, G.M.; DALEBOUT, M.L.; GOODE, M.; EWING, G.; McLAREN, P.; RODRIGO, A.G.; LAVERY, S. & BAKER, C.S. 2003. DNA Surveillance: Web-Based Molecular Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises. *Journal of Heredity*, 94(2): 111-114.
- SARNEY FILHO, J. (Relator). 2003. Relatório da Comissão Parlamentar de Inquérito Destinada a "Investigar o Tráfico Ilegal de Animais e Plantas Silvestres da Fauna e da Flora Brasileiras" – CPITRAFI. Disponível on line: http://www.rentas.org.br/files/rel_fin_cpitrafi_01_doc.doc
- SCHLÖTTERER, C. 1998. Microsatellites. In: Hoelzel AR (ed.) Molecular genetic analysis of populations. IRL press, Oxford University Press. 337-261.
- SICK, H. 1997. Ornitologia brasileira. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brasil.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- SUNNUCKS P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(5): 199-203.
- TAYLOR, A.C.; [HORSUP, A.](#); [JOHNSON, C.N.](#); [SUNNUCKS, P.](#) & [SHERWIN, W.](#) 1997. Unusual relatedness structure detected by microsatellite analysis, and parentage

- analysis in a endangered marsupial, the Nothern Hairy-nosed wombat, *Lasiorhinus krefftii*. *Molecular Ecology*, 6: 9-20.
- TEMPLETON, A. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. *In*: (Soulé, M.E. ed) Conservation Biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer, Sunderland, MA, p: 105-116.
- THORNTON, J.I. 1994. Courts of Law v. Courts of Science: A Forensic Scientist's Reaction to Daubert, Shepard's Expert and Scientific Evidence Quarterly, 1(3): 475-485.
- TUBARO, P.L. & LIJTMAYER, D.A. 2006. Environmental correlates of song structure in forest grosbeaks and saltators. *The Condor*, 108: 120-129.
- VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M. and SHIPLEY, P. (2004), micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- VELO-ANTÓN, G.; GODINHO, R.; AYRES, C.; FERRAND, N. & RIVERA, A.C. 2007. Assignment tests applied to relocate individuals of unknown origin in a threatened species, the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Amphibia-Reptilia*, 28: 475-484.
- WANG, X.; AULER, A.S.; EDWARDS, R.L.; CHENG, H.; CRISTALLI, P.S.; SMART, P.L.; RICHARDS, D.A. & SHEN, C.-C. 2004. Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. *Nature*, 432: 740-743.
- WAPLES, R.S. & GAGGIOTTI, O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15: 1419-1439.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*, 15: 323-354.
- WRIGHT, T.F.; RODRIGUEZ, A.M. & FLEISCHER, R.C. 2005. Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona auropalliata*. *Molecular Ecology*, 14: 1197-1205.

10.Apêndices

Apêndice 1

Tabela das amostras utilizadas

Espécie	Número de Tombo	Localidade de coleta	Latitude	Longitude	Coletores neste projeto	Banco de tecidos/museu
<i>Paroaria dominicana</i>	P2199/LGEMA2595	Beira Rio, Ba	-42.7144	-12.269	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2190/LGEMA2586	Tanquinho, Ba	-41.1762	-12.495	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2197/LGEMA2593	Beira Rio, Ba	-42.7363	-12.262	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2193/LGEMA2589	Beira Rio, Ba	-42.7685	-12.244	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2187/LGEMA2583	Tanquinho, Ba	-41.1762	-12.495	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2198/LGEMA2594	Beira Rio, Ba	-42.7178	-12.269	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2189/LGEMA2585	Tanquinho, Ba	-41.1763	-12.496	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2188/LGEMA2584	Tanquinho, Ba	-41.1762	-12.495	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2196/LGEMA2592	Beira Rio, Ba	-42.7489	-12.259	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2195/LGEMA2591	Beira Rio, Ba	-42.7178	-12.269	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2194/LGEMA2590	Beira Rio, Ba	-42.7126	-12.271	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	J186	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J187	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9427	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC

<i>Paroaria dominicana</i>	J188	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9879	-9.9427	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J189	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9880	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J190	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9882	-9.9427	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J191	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9882	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J192	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9880	-9.9427	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J193	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9880	-9.9427	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J194	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9880	-9.9427	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J515/MZ86281	Feira de Santana, Ba	-38.9016	-12.080	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J516/MZ86282	Feira de Santana, Ba	-38.9016	-12.080	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	D.A 00279	Feira de Santana, Ba	-38.9660	-12.201	-	Coleção do LORMA UEFS
<i>Paroaria dominicana</i>	J452	Feira de Santana, Ba	-39.4012	-12.152	Fábio Schunck, Juliana Ferreira, Emília, Maurício	Banco de Tecidos LABEC

<i>Paroaria dominicana</i>	J453	Feira de Santana, Ba	-39.4012	-12.152	Fábio Schunck, Juliana Ferreira, Emília, Maurício	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J454	Feira de Santana, Ba	-39.4012	-12.152	Fábio Schunck, Juliana Ferreira, Emília, Maurício	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J455	Feira de Santana, Ba	-39.4012	-12.152	Fábio Schunck, Juliana Ferreira, Emília, Maurício	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J481/MZ86303	Paraíba	-36.4208	-7.3325	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J482/MZ86304	Paraíba	-36.2705	-7.2819	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J476/MZ86305	Paraíba	-36.2480	-7.2755	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J469	Paraíba	-36.3186	-7.3905	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J474/MZ86309	Paraíba	-36.2383	-7.3036	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J477/MZ86306	Paraíba	-36.2711	-7.2755	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J480/MZ86302	Paraíba	-36.1080	-7.2702	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J479/MZ86307	Paraíba	-36.4464	-7.3389	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J483/MZ86299	Paraíba	-36.205	-7.2563	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP

<i>Paroaria dominicana</i>	J475/MZ86310	Paraíba	-36.2402	-7.3180	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J478/MZ86311	Paraíba	-36.2402	-7.3116	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J472 (COD MZUSP NF02)	Paraíba	-36.2383	-7.3036	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J485/MZ86301	Paraíba	-36.1488	-7.2688	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	P2202/LGEMA2598	Parnaguá, Pi	-44.7055	-10.315	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2200/LGEMA2596	Parnaguá, Pi	-44.7091	-10.317	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2205/LGEMA2601	Parnaguá, Pi	-44.7091	-10.317	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2204/LGEMA2600	Parnaguá, Pi	-44.69625	-10.305	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2207/LGEMA2603	Parnaguá, Pi	-44.66036	-10.302	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2201/LGEMA2597	Parnaguá, Pi	-44.70916	-10.317	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2206/LGEMA2602	Parnaguá, Pi	-44.70916	-10.317	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	J492/MZ86315	Petrolina, Pe	-40.56472	-9.0697	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J495/MZ86323	Petrolina, Pe	-40.55111	-9.035	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J487/MZ86316	Petrolina, Pe	-40.61916	-9.1575	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J496/MZ86324	Petrolina, Pe	-40.61916	-9.1575	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP

<i>Paroaria dominicana</i>	D.A. 00200	Petrolina, Pe	-40.23361	-9.3966	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Coleção do LORMA UEFS
<i>Paroaria dominicana</i>	J488/MZ86317	Petrolina, Pe	-40.61916	-9.1575	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J489/MZ86318	Petrolina, Pe	-40.60222	-9.1461	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	D.A. 00197	Petrolina, Pe	-40.23361	-9.3966	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Coleção do LORMA UEFS
<i>Paroaria dominicana</i>	J490/MZ86319	Petrolina, Pe	-40.57480	-9.1154	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J493/MZ86320	Petrolina, Pe	-40.55527	-9.0594	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J491/MZ86321	Petrolina, Pe	-40.56722	-9.0858	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J486/MZ86314	Petrolina, Pe	-40.61916	-9.1575	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J494/MZ86322	Petrolina, Pe	-40.55361	-8.9961	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	P2220/LGEMA2116	Barra de São Pedro, Pe	-40.297167	-7.799333	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2222/LGEMA2618	Barra de São Pedro, Pe	-40.29455	-7.7973	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2217/LGEMA2613	Trindade, Pe	-40.28441	-7.7905	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2218/LGEMA2614	Trindade, Pe	-40.28441	-7.7905	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2221/LGEMA2617	Trindade, Pe	-40.27588	-7.7808	-	Banco de Tecidos LGEMA
<i>Paroaria dominicana</i>	P2216/LGEMA2612	Trindade, Pe	-40.27605	-7.7809	-	Banco de Tecidos LGEMA

<i>Paroaria dominicana</i>	J456**rever gps	Vitória da Conquista, Ba	-40.9	-14.95	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	D.A. 00153	Vitória da Conquista, Ba	-43.54920	-13.593	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Coleção do LORMA UEFS
<i>Paroaria dominicana</i>	J457	Vitória da Conquista, Ba	-40.9	-14.95	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J517/MZ86283	Vitória da Conquista, Ba	-41.02388	-14.396	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J519/MZ86285	Vitória da Conquista, Ba	-41.02388	-14.396	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J518/MZ86284	Vitória da Conquista, Ba	-41.02388	-14.396	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J521/MZ86287	Vitória da Conquista, Ba	-41.02416	-14.393	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Paroaria dominicana</i>	J288	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J287	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J289	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J290	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J291	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J292	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J293	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC

<i>Paroaria dominicana</i>	J294	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J295	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J296	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J297	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J298	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J299	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J300	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J376	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J377	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J378	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J383	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J384	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J385	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J386	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J387	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC

<i>Paroaria dominicana</i>	J388	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J389	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J390	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J391	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J392	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J393	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J394	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J395	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J397	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	J398	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	DPV39620	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	DPV40127	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	DPV40610	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Paroaria dominicana</i>	DPV40691	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	B1135	Jequitinhonha, MG	-41.034444	- 16.408056	-	Banco de Tecidos LBEM

<i>Saltator similis</i>	MZ82937	Correntina, Ba	-44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	J459	Barra do Choça	-40.900278	- 15.035556	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	MZ83398	Correntina, Ba	-44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	B902	Araponga, MG	- 42.5136611	- 20.660278	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	MZ83397	Correntina, Ba	-44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	J460	Barra do Choça, Ba	-40.900278	- 15.035556	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	MZ81113	Correntina, Ba	-44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	B810	Caratinga, MG	-42.1675	- 19.775278	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	MZ83399	Correntina, Ba	-44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	J461	Barra do Choça, Ba	-40.726667	14.9225	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	MZ81727	Correntina, Ba	-44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	B1324	Felixlândia, MG	-44.8625	- 18.750556	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B769	Araponga, MG	- 42.5136611	- 20.660278	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	MZ83400	Correntina, Ba	- 44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	J463	Barra do Choça, Ba	-40.726667	-14.9225	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	MZ81748	Correntina, Ba	-44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	B1328	Bocaiúva, MG	- 43.816389	- 17.089722	-	Banco de Tecidos LBEM

<i>Saltator similis</i>	B762	Araponga, MG	- 42.5136611	- 20.660278	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	J523/MZ86289	Barra do Choça, Ba	- 40.626667	- 14.840556	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Saltator similis</i>	J464	Barra do Choça, Ba	-40.626667	- 14.840556	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	MZ82555	Correntina, Ba	- 44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	B1331	Bocaiúva, MG	-43.816389	- 17.089722	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B742	Araponga, MG	- 42.5136611	- 20.660278	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	D.A 00280	Morro do Chapéu, Ba	-40.203611	- 11.723333	-	Coleção do LORMA UEFS
<i>Saltator similis</i>	J415	Entre Juquitiba e Miracatú, SP	- 47.276944	- 24.093611	Marcos Melo, Daniel Perrela e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J465	Barra do Choça, Ba	-40.678056	- 14.901667	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	MZ82857	Correntina, Ba	- 44.650228	- 13.356442	-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Saltator similis</i>	FS01	Pqe Estadual da Serra do Mar, Curucutú (campo)	-46.732778	- 23.993611	Fabio Schunck	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	B1342	Bocaiúva, MG	-43.816389	- 17.089722	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B738	Nova Lima, MG	-43.851389	- 20.038056	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	J462	Barra do Choça, Ba	-40.726667	-14.9225	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J416	Pqe Estadual da Serra do Mar, Curucutú (parte alta)	-46.743889	- 23.990833	Marcos Melo e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC

<i>Saltator similis</i>	D.A 00283	Morro do Chapéu, Ba	-40.203611	- 11.723333	-	Coleção do LORMA UEFS
<i>Saltator similis</i>	B1757(1747?)	Simonésia, MG	-42.009444	- 20.115833	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B727	Nova Lima, MG	- 43.851389	- 20.038056	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	J522/MZ86288	Barra do Choça, Ba	-40.626667	- 14.840556	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC e MZUSP
<i>Saltator similis</i>	J442	Juquitiba, SP	-47.17861	-23.95944	Marcos Melo e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	B720	Araponga, MG	- 42.5136611	- 20.660278	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	J534	Nova Andradina. MS	-53.290667	- 21.658083	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J542	Santa Rita do Jacutinga, MG (de acordo com Zé Raimundo - gaiola no local)	- 44.094433	- 22.132242	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J550	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com Rodrigo - gaiola no local)	-44.081944	- 22.232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	CI5330	Campina Grande do Sul, Pr	- 49.034444	- 25.289444	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B0589	Araponga, MG	- 42.5136611	- 20.660278	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B2342	Felixlândia, MG	-44.8625	- 18.750556	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	MNT56	Santa Teresa, ES	-40.574722	- 19.926111	-	Museu Nacional
<i>Saltator similis</i>	B703	Nova Lima, MG	- 43.851389	- 20.038056	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B726	Caratinga, MG	-42.1675	- 19.775278	-	Banco de Tecidos LBEM

<i>Saltator similis</i>	J551	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com Rodrigo - gaiola no local)	-44,081944	- 22,232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	CI5270	Reserva do Iguaçu. Pr	-52,017664	- 25,805389	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B0620	Nova Lima, MG	-43,851389	- 20,038056	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B2252	Bocaiúva, MG	-43,838517	- 17,103033	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	MNT118	Santa Teresa, ES	-40,574722	- 19,926111	-	Museu Nacional
<i>Saltator similis</i>	J536*	Nova Andradina, MS (filhote?)	-53,281056	- 21,654694	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J544	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com Derli - gaiola no local)	-44,081944	- 22,232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J552	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com Rodrigo - gaiola no local)	-44,081944	- 22,232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	CI4959	Diamante do Norte, Pr	-52,885428	- 22,629922	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B0437	Nova Lima, MG	-43,851389	- 20,038056	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	MNT424	São Félix do Coribe, Ba	-44,182050	- 13,410222	-	Museu Nacional
<i>Saltator similis</i>	J529	Nova Andradina. MS	-53,280528	- 21,667278	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J537	Nova Andradina. MS	-53,295111	- 21,669222	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J545	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com Derli - gaiola no local)	-44,081944	- 22,232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	CI650	Araucária, Pr	-49,403700	- 25,599728	-	Capão da Imbuía

<i>Saltator similis</i>	CI5571	Reserva do Iguaçu, Pr	-52,017664	- 25,805389	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B0437	Simonésia, MG	-42,009444	- 20,115833	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B2437	Turmalina, MG	-42,752203	- 17,283658	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	MNT119	Santa Teresa, ES	-40,574722	- 19,926111	-	Museu Nacional
<i>Saltator similis</i>	J530	Nova Andradina, MS	-53,280528	- 21,667278	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J538	Nova Andradina, MS	-53,296861	- 21,673639	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J546	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com dono - gaiola no local)	-44,081944	- 22,232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	CI5742	Fênix, Pr	-51,960300	- 23,926328	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B0672	Caratinga, MG	-42,168758	- 19,775383	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B1772	Felixlândia, MG	-44,918667	- 18,741364	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	J531	Nova Andradina, MS	-53,289472	- 21,666472	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J539	Nova Andradina, MS	-53,285583	- 21,645250	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J547	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com Geraldo, gaiola no local)	-44,081944	- 22,232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	CI4240	Pinhão, Pr	-51,652708	- 25,665167	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B2187	Bocaiúva, MG	-43,838517	- 17,103033	-	Banco de Tecidos LBEM

<i>Saltator similis</i>	J532	Nova Andradina, MS	-53,289472	- 21,666472	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J540	Nova Andradina, MS	-53,285583	- 21,645250	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J548*	Santa Isabel do Rio Preto, RJ (de acordo com Rodrigo - gaiola no local)	-44,081944	- 22,232222	Paula Viana e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	CI5346	Adrianópolis, Pr	-48,951944	- 24,709444	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B2562	Virgem da Lapa, MG	-42,339167	- 16,787222		Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	FS02(G73646)	Pqe Estadual da Serra do Mar, Curucutú (campo)	-46,728531	- 23,991408	Fabio Schunck	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	B1113	Jequitinhonha, MG	-41,090069	- 16,338425	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	J533	Nova Andradina, MS	-53,281056	- 21,654694	Fabio Schunck, Waldemar e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J541	Bonito, MS	-56,460611	- 21,128722	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J549	Santa Isabel do Rio Preto, RJ	-44,081944	- 22,232222		
<i>Saltator similis</i>	CI5329	Campina Grande do Sul, Pr	-44,081944	- 22,232222	-	Capão da Imbuía
<i>Saltator similis</i>	B05329	Simonésia, MG	-42,009444	- 20,115833	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	B2268	Bocaiúva, MG	-43,838517	- 17,103033	-	Banco de Tecidos LBEM
<i>Saltator similis</i>	DPV37659	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV37666	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC

<i>Saltator similis</i>	DPV37143	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39559	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39827	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39828	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39829	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39833	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39834	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39835	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39837	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39838	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV39839	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV37660	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV38826	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40102	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40103	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40104	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40105	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC

<i>Saltator similis</i>	DPV40106	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40107	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40108	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40109	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40140	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40141	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV37661	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV37663	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV37664	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40211	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40212	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40433	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40434	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40436	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40437	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40439	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40440	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC

<i>Saltator similis</i>	DPV40607	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40646	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	DPV40694	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J317	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J318	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J319	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J320	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J321	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J322	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Saltator similis</i>	J323	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3452	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3442	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3433	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CI5974	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3453	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3435	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia

<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3444	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CI5975	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3438	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3438	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3441	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3443	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CI5003	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3445	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3432	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3439	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3436	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3447	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3434	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3449	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3440	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3450	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3448	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbúia

<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3446	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbuía
<i>Sporophila frontalis</i>	CIML3437	Paraná	-48.711667	- 25.429444	-	Museu Capão da Imbuía
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV39607	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J399	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J367	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J535	Nova Andradina. MS	-53.290667	- 21.658083	Fábio Schunck e Juliana Ferreira	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J445/DA	PARNA do Catimbau, Pernambuco	-37.215744	-8.621397	-	Coleção do LORMA UEFS
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV37638	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J182	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J302	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J310	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J364	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV39619	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J368	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	CANUDOS01	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Erika Pacífico	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J446/DA	Raso da Catarina, BA	-38.661106	-9.661197	-	Coleção do LORMA UEFS

<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV40174	Apreensão	-	-	-	
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J183	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J303	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J311	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J365	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV39542	Apreensão	-	-	-	
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J369	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	CANUDOS02	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Erika Pacífico	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV40100	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV40229	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J184	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J304	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J336	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J366	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV39543	Apreensão	-	-	-	
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J370	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC

<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J341	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	MZ78961	Natureza (localidade)			-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV40588	Apreensão	-	-	-	
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J185	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J305	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J337	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J373	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J447/não depositado na coleção do Caio pq é de apreensão	Apreensão - Santa Bárbara, Bahia (devem ser de lá)	-	-		Coleção do LORMA UEFS
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J371	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J343	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	MZ81599	Natureza (localidade)			-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV40602	Apreensão	-	-	-	
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J195	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	-
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J306	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J338	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC

<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J374	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J448/não depositado na coleção do Caio pq é de apreensão	Apreensão - Santa Bárbara, Bahia (devem ser de lá)	-	-	-	Coleção do LORMA UEFS
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J372	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J361	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	MZ82871	Natureza (localidade)			-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J196	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J307	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J339	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J400	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	DPV40101	Apreensão	-	-	-	-
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	D.A 00281	Raso da Catarina, BA	-38.661106	-9.661197		Coleção do LORMA UEFS
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J362	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	MZ86312	Natureza (localidade)			-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J180	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC

<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J197	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J308	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J342	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J401	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	MZ83396	Natureza (localidade)			-	Banco de Tecidos MZUSP
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	D.A 00282	Raso da Catarina, BA	-38.661106	-9.661197	-	Coleção do LORMA UEFS
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J363	Apreensão	-	-	-	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	CI5000	localidade	-	-	-	Capão da Imbúia
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J181	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J198	Estação Biológica de Canudos, BA	-38.9881	-9.9428	Juliana Ferreira, Juliana Russo e Flávio	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J309	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J403	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	J402	Apreensão	-	-	Juliana Ferreira e Marcelo Rocha	Banco de Tecidos LABEC