

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

SHIRLENY SANDOVAL- ARIAS

UTILIZANDO FERRAMENTAS DA GENÉTICA FORENSE PARA INVESTIGAR A  
ORIGEM DOS INDIVÍDUOS DO CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*) MANTIDOS  
EM CATIVEIRO

SÃO CARLOS-SP  
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

SHIRLENY SANDOVAL- ARIAS

UTILIZANDO FERRAMENTAS DA GENÉTICA FORENSE PARA INVESTIGAR A  
ORIGEM DOS INDIVÍDUOS DO CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*) MANTIDOS  
EM CATIVEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Genética  
Evolutiva e Biologia Molecular da  
Universidade Federal de São Carlos, como  
parte dos pré-requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências, Área de  
concentração: Genética e Evolução.  
Orientador Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

SÃO CARLOS-SP  
2020



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

### Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Shirleeny Monserrat Sandoval Arias, realizada em 31/03/2020:

---

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
UFSCar

---

Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco  
UFSCar

---

Prof. Dr. Marco Aurélio Pizo Ferreira  
UNESP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Pedro Manoel Galetti Junior Mercival Roberto Francisco, Marco Aurélio Pizo Ferreira e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

---

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Dedico este trabalho a minha família, namorado, amigos e as maravilhosas pessoas do laboratório pela inestimável aprendizagem. Sem eles este projeto não teria sido possível.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, que me apoiou incondicionalmente e não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao meu namorado Kenneth, por me sugerir aplicar a bolsa e por estar comigo desde o primeiro dia em que essa fase iniciou; pela sua paciência, apoio e suporte incondicional. Obrigada por compartilhar minhas loucuras, paixões e desejos, apesar de, às vezes, não compreendê-las. Obrigada por me ajudar a concretizar minhas metas. Agradeço também ao Luke por me acompanhar cada dia e sempre dar-me uma razão para ser feliz.

À Universidade Federal de São Carlos, através do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), pela oportunidade concedida e formação acadêmica. Ao programa de bolsas PAEC OEA-GCUB 2017, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento para o aperfeiçoamento profissional no exterior e a CAPES pelo apoio financeiro (Código de financiamento 001).

Ao professor Pedro Manoel Galetti Junior por me aceitar e, assim, dar-me a oportunidade de desenvolver um projeto na linha de pesquisa que amo. Obrigada por ter apostado em mim e saber de antemão que não terminaria minha estadia no Brasil sem concluir nossos objetivos. Agradeço muito pelas grandes ideias, pela autonomia e por me deixar ser parte desse maravilhoso laboratório. Tenha certeza que o meu crescimento pessoal e profissional nesse ambiente foi estrondoso.

Aos meus amigos de laboratório, que além de companheiros se transformaram em amigos inesquecíveis; compartilhando risadas, noites e dias de trabalho, bons e tristes momentos. Carolina, Bruno, Karen, Nayra, Carmen, Naty, Camila e Marina agradeço tudo o que aprendi da vida e da academia com vocês.

A las “Mamis” por ser siempre amigas presentes e incondicionales, a pesar de los miles de Km que nos separan. Gracias por las video fiestas, las cenas y las risas, tristezas y vivencias compartidas por el whatsapp. A Stephany Taylor, agradezco infinitamente tu presencia en mi vida, eres la hermana que la vida me entrego más allá de los vínculos sanguíneos. A Mauricio Huertas por su cariño, amistad y apoyo incondicional que sobrepasan límites y fronteras.

À Polícia Militar Ambiental (4<sup>o</sup> Batalhão), sem seu apoio esse projeto não seria possível. Obrigada por confiar em mim, o carinho e as boas lembranças que tive com vocês permanecerão sempre vivas.

Ao LabBMC, sem nomeações. Agradeço a todos vocês por me fazer crescer profissionalmente, pela ajuda na hora de pensar em como discutir esse trabalho, pelos intercâmbios culturais, pelos almoços, churrascos e confraternizações. Um agradecimento especial a Carolina Machado por compartilhar seus conhecimentos comigo no mundo fabuloso do *DNA Barcoding*. Agradeço também ao Bruno Saranholi e a Karen Rodriguez por compartilharem seus conhecimentos e por me ajudarem na construção desse trabalho e do meu pensamento crítico. Aos demais, obrigada pela presença e as discussões nesta fase da minha vida. Sou muito grata a todos!

“Because, not interferes with something wrong, that can you see, is not enough, and to do something is what matters; let me use science urgently to civilize civilization”. Unknown

“The adventure of life as explored by man is truly a mystery tale. As in any good detective story, the evidence has been present all along but not until many apparently unrelated facts were put together could logical conclusions solve the mystery” Jacques-Yves Cousteau

## RESUMO

A proteção da vida selvagem é um tema mundialmente prioritário. Tratados internacionais, leis, entidades e organizações nacionais e internacionais lutam pela conservação da biodiversidade e proteção da vida silvestre, gerando consciência ambiental e meios para coibir o comércio ilegal de animais silvestres. O comércio ilegal de animais silvestres é considerado a terceira maior atividade ilegal do mundo, perdendo apenas para o tráfico de armas e de narcóticos. O Brasil é responsável por cerca de 10 a 15% do valor mundial do tráfico de animais silvestres, entre os quais as aves são as mais atingidas, sendo os Psittaciformes e Passeriformes (como canário-da-terra, ave de interesse para o presente estudo) os grupos mais comumente apreendidos por autoridades ambientais. De acordo com o IBAMA, o canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) é uma das dez espécies de aves mais traficadas ilegalmente no país e um estudo recente demonstrou que essa também é a espécie mais caçada no estado de São Paulo, apesar de ser reproduzida em inúmeros criadouros no estado. Além disso, pelo menos quatro espécies do mesmo gênero são reconhecidas no Brasil, sendo que três estão presentes no estado de São Paulo, dessa forma, a confirmação da espécie que está no criadouro faz-se importante para permitir identificar corretamente a origem do animal. Nesse cenário, destaca-se uma questão importante: os indivíduos da espécie *Sicalis flaveola* mantidos nos criadouros são realmente resultados da reprodução em cativeiro? Para responder essa pergunta usamos ferramentas genéticas para a confirmação molecular da espécie e para análise das relações de parentesco como forma de investigar a origem dos indivíduos. Realizamos análises de delimitação de espécie, utilizando o marcador mitocondrial COI e as abordagens de distância (*DNA Barcoding*) e coalescência (bPTP e GMYC) para verificar se as amostras coletadas nos criadouros são da espécie *Sicalis flaveola* e confirmar sua validação para esse táxon. Posteriormente, testamos a transferabilidade de 26 locos de microssatélites descritos para diferentes espécies de Passeriformes e verificamos a sua utilidade na determinação de parentesco dos indivíduos de *Sicalis flaveola*, amostrados nos criadouros em ações realizadas pela Polícia Militar Ambiental. Com o uso de estimadores de parentesco que se baseiam na probabilidade de identidade por descendência foi possível confirmar o vínculo genético entre as aves amostradas.

**Palavras-chaves:** Passeriformes, tráfico de animais, criadouros, COI, microssatélites, relações parentais.



## ABSTRACT

Wildlife protection is a global priority issue. International treaties, laws, national entities and organizations fight for the conservation of biodiversity and protection of wildlife, generating environmental awareness mainly against the illegal trade of wild animals. Illegal trade is the third most common illegal activity, second only to arms and narcotics trafficking. Brazil is responsible for about 10 to 15% of the global value of wild animal trafficking of all kind of species however birds are the most affected, being the Psittaciformes and Passeriformes (saffron finch, bird of interest for the present study) the groups most commonly apprehended by environmental authorities. According to IBAMA, saffron finch (*Sicalis flaveola*) is one of the ten species of birds most illegally trafficked in the country and a recent study has shown that this is also the most hunted species in the state of São Paulo, despite of being reproduced in numerous breeding sites in the state. In addition, at least four species of the same genus are recognized in Brazil, and three are present in the state of São Paulo, therefore, confirmation of the species in the breeding site is important. In this scenario, an important question stands out: are the individuals of the species *Sicalis flaveola* kept in commercial breeding sites, really the result of reproduction in captivity? To answer this question we will use genetic tools to confirm the species and to analyze parental relationships. We will carry out species delimitation analyzes, using the mitochondrial marker COI and the distance (DNA Barcoding) and coalescence (bPTP and GMYC) approaches to verify whether the collected samples are of the species *Sicalis flaveola* and confirm their validation for this taxon. Subsequently, the transferability of 26 microsatellite locos described for different species of Passerines will be evaluated to determine their usefulness to analyze parental relations of individuals of *Sicalis flaveola* sampled at breeding sites in actions carried out by the Military Environmental Police. Using parental estimators based on the probability of identity by offspring, it is possible to confirm the genetic link between the sampled birds. In the end, the project has the aim to produce a tool to determine if the birds are actually the result of breeding in the breeding site, as possibly claimed by the breeders or would be a captured free-living bird, contributing to the detection of possible violations of current laws.

**Keywords:** Passeriformes, animal traffic, breeding sites, COI, STR, parental relations

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> a) Distribuição das espécies do gênero <i>Sicalis</i> na região Neotropical.. ....	22
<b>Figura 2:</b> Metodologia para coleta de sangue ulnar.....	28
<b>Figura 3:</b> Distribuição e localização das amostras coletadas. ....	29
<b>Figura 4:</b> Heredograma das amostras por criadouro.....	30
<b>Figura 5:</b> Gráfico do ótimo threshold calculado pelo pacote SPIDER.....	42
<b>Figura 6:</b> Gráfico dos quadrantes, distâncias mínimas interespecíficas (eixo Y) em comparação com máximas intraespecíficas (eixo X) do marcador mitocondrial COI (K2P). a) Análise considerando o threshold teórico do 2%, b) Análise considerando o ótimo threshold calculado para nosso conjunto de dados. ....	43
<b>Figura 7:</b> Topologia bayesiana estimada a partir do gene mitocondrial COI.. ....	47
<b>Figura 8:</b> Heredograma das amostras por criadouro.....	49
<b>Figura 9:</b> Distribuição da amostragem utilizado em sobreposição as áreas de ocorrência de cada espécie descritas pelo <i>Handbook of the Birds of the World</i> . ....	50
<b>Figura 10.</b> Fluxograma dos testes de transferibilidade dos 26 STRs em <i>Sicalis flaveola</i> . ....	51
<b>Figura 11.</b> Frequência de cada alelo por loco em cada grupo familiar. ....	55
<b>Figura 12.</b> Heredograma da família 1 localizada no Criadouro 3.....	60
<b>Figura 13.</b> Heredograma da família 2 localizada no Criadouro 4.....	61
<b>Figura 14.</b> Heredograma da família 3 localizada no Criadouro 4.....	62
<b>Figura 15.</b> Heredograma da família 4 localizada no Criadouro 6.....	63
<b>Figura 16.</b> Heredograma da família 5 localizada no Criadouro 7.....	64
<b>Figura 17.</b> Heredograma da família 6 localizada no Criadouro 5.....	65
<b>Figura 18.</b> Heredograma da família 7 localizada no Criadouro 5.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos <i>primers</i> candidatos para a transferabilidade. ....	34
Tabela 2: Médias das distâncias intraespecíficas (preto) e valores de S.E (azul).* ..	41
Tabela 3: Médias das distância interespecíficas (preto) e valores de S.E (azul).....	41
Tabela 4 Comparação entre as condições teóricas e as otimizadas para a amplificação de cada loco heterólogo transferido para a espécie <i>S. flaveola</i> , confirmação do motif e range dos alelos obtidos. ....	52
Tabela 5. Estimativas de diversidade genética dos indivíduos cativos de <i>S. flaveola</i> baseada em sete locos de microssatélites. ....	54
Tabela 6. Probabilidades máximas de exclusão e probabilidade de não-exclusão por loco para o painel de microssatélites utilizado .....	56
Tabela 7. Probabilidade máxima de exclusão estimada no GenAlex 6.5, para cada criadouro com cada loco quando os genótipos de ambos os pais são conhecidos (P1) e na ausência do genótipo de um dos pais (P2).....	57
Tabela 8. Valor de IR. . ....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABC</b>	Computação bayesiana aproximada ( <i>Approximate Bayesian Computation</i> )
<b>BOLD</b>	<i>Barcode of Life Database</i>
<b>CBOL</b>	<i>Consortium for the Barcode of Life</i>
<b>COI</b>	Citocromo C Oxidase I
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNAmit</b>	DNA mitocondrial
<b>ESS</b>	<i>Effective sample size</i>
<b>GMYC</b>	<i>Generalized mixed Yule-coalescent</i>
<b>He</b>	Heterozigosidade esperada
<b>Ho</b>	Heterozigosidade observada
<b>IB</b>	Inferência Bayesiana
<b>IP</b>	Índice de paternidade
<b>K2P</b>	Kimura 2-parâmetros
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MOTU</b>	Unidades taxonômicas operacionais moleculares ( <i>Molecular Operational Taxonomic Units</i> )
<b>MZUSP</b>	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
<b>NGS</b>	<i>Next-Generation Sequencing</i>
<b>NJ</b>	<i>Neighbor-Joining</i>
<b>OT</b>	<i>Ótimo Threshold</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PE</b>	Probabilidade de exclusão
<b>PIC</b>	<i>Polymorphic information content</i>
<b>SISBIO</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>SISPASS</b>	Sistema Gestão de criadores de Passeriformes Silvestres
<b>STR</b>	<i>Short Tandem Repeats</i>
<b>UES</b>	Unidades Evolutivas Significativas

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>12</b>
<b>1.APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>17</b>
2.1 A GENÉTICA FORENSE.....	17
2.2 TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES NO BRASIL: ENFOQUE PARA A AVIFAUNA.....	18
2.3 O CANÁRIO-DA-TERRA ( <i>SICALIS FLAVEOLA</i> , LINNAEUS 1766).....	20
2.4 O COMÉRCIO DO CANÁRIO-DA-TERRA ( <i>SICALIS FLAVEOLA</i> , LINNAEUS 1766) E SUA LEGISLAÇÃO.....	24
<b>3.PERGUNTA E HIPÓTESES</b> .....	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4.3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	26
<b>5.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
5.1 COLETAS DE AMOSTRAS.....	27
5.2. EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO DE COI, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO.....	31
5.3 ANÁLISE MOLECULAR DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	32
5.4 TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS MICROSSATÉLITES HETERÓLOGOS E ANÁLISE DE PARENTESCO: AMPLIFICAÇÃO DE DNA NUCLEAR E GENOTIPAGEM.....	34
TESTES DE TRANSFERIBILIDADE.....	34
CONFIRMAÇÃO DO MOTIF:.....	36
ANÁLISES DE PARENTESCO.....	36
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
6.1 COLETAS DE AMOSTRAS.....	40
6.2 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	40
6.3 TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS MICROSSATÉLITES HETERÓLOGOS E ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA E PARENTESCO.....	51
TESTES DE TRANSFERIBILIDADE.....	51
ANÁLISE DESCRITIVA DA DIVERSIDADE NOS CRIADOUROS.....	54
ANÁLISE DE PARENTESCO POR FAMÍLIA:.....	59
7.1 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	67
7.2 TRANSFERIBILIDADE DE LOCOS MICROSSATÉLITES HETERÓLOGOS E ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA E PARENTESCO.....	69
TESTES DE TRANSFERIBILIDADE.....	69

ANÁLISE DESCRITIVA DA DIVERSIDADE NOS CRIADOUROS .....	72
ANÁLISE DE PARENTESCO POR FAMÍLIA: .....	75
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
<b>10. APÊNDICE .....</b>	<b>97</b>

## 1. APRESENTAÇÃO

O canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) é uma das dez espécies de aves mais traficadas ilegalmente no país e também é a espécie mais caçada no estado de São Paulo, apesar de ser reproduzida em inúmeros criadouros dessa região. A beleza de seu harmonioso canto, suas cores, sua alta taxa de reprodução, o baixo custo de manejo e suas poucas exigências quanto ao espaço de criação fazem dele o animal perfeito para reprodução e companhia com e sem fins comerciais.

Em São Paulo, há inúmeros criadouros amadores de Passeriformes nativos, pessoas físicas que mantêm e reproduzem as aves em cativeiro, sem finalidade comercial e em escala limitada de espécimes. Estes muitas vezes são adquiridos mediante compra ou troca. Embora existam leis e instituições, como o IBAMA, que controlam esta aquisição, o processo infelizmente nem sempre é seguido como se deve.

O comércio ilegal materializa-se no ciclo de oferta e demanda. Começa com os indivíduos de canários-da-terra pegos da natureza e cadastrados nos sistemas com dados falsos, seguido da demanda de *petshops* e competições de canto e conclui com a venda do indivíduo para competição com o objetivo de acumular grandes quantias de dinheiro.

Diante desses fatos, destaca-se uma questão importante: Seriam os indivíduos da espécie *Sicalis flaveola* mantidos nos criadouros realmente resultado da reprodução em cativeiro? Para responder essa pergunta verificamos a identidade da espécie utilizando análises de identificação de espécie com o marcador mitocondrial COI e comparamos os resultados com a espécie cadastrada no Sistema Gestão de criadores de Passeriformes Silvestres (SISPASS). A identificação da espécie é fundamental porque em vida livre existem outras três espécies do mesmo gênero ocorrendo em simpatria na região do estado de São Paulo e cujos caracteres morfológicos em idades jovens não permitem a diferenciação da espécie.

Posteriormente, avaliamos a transferabilidade 26 locos de microssatélites heterólogos descritos para espécies do mesmo gênero ou de gêneros filogeneticamente próximos, e verificamos seu sucesso e utilidade na determinação de parentesco dos indivíduos de *Sicalis flaveola* amostrados nos criadouros em ações realizadas pela Polícia Militar Ambiental.

Note-se que para conhecer melhor o estado da arte e estabelecer os protocolos para o desenvolvimento das atividades de laboratório, foi desenvolvida uma Meta-análise que se refere ao uso de técnicas estatísticas em uma revisão sistemática para identificar, selecionar e avaliar criticamente pesquisas relevantes relacionadas a uma pergunta específica, coletar e analisar mediante métodos e desses estudos integrando os múltiplos resultados (MOHER et al., 2016). A análise realizada está anexada em formato de artigo (Apêndice 1) o qual será submetido na revista *Forensic Science International: Genetics* com fator de impacto 4.884 e com Qualis A1 na categoria da CAPES.



## 2. INTRODUÇÃO GERAL

### 2.1 A Genética Forense

As ciências forenses são definidas como a aplicação de princípios e técnicas das ciências exatas e naturais na busca da verdade em questões cíveis, criminais e de comportamento social, especialmente no que se refere à coleta, exame e análise de evidências físicas. A sua finalidade é para que não se cometam injustiças, elucidando o porquê e como foi realizado um possível ato criminoso (JOYCE; STOVER, 2019). Assim, as ciências forenses buscam provas materiais para a resolução de um possível ato criminoso e, utilizando o método científico preservam e analisam as evidências nas diferentes disciplinas que a compõem (Física, Química, Biologia, Balística, Engenharia, entre outras) (LINACRE et al., 2011). Cada uma delas usa diferentes subáreas, ferramentas e técnicas para analisar os vestígios da cena de um crime, chegar ao entendimento do ocorrido e a identificação da vítima com apoio nas análises de provas materiais, as quais favorecem a formação e consolidação de um sistema judiciário equânime e democrático.

Dentro das ciências forenses, a Biologia Forense é uma ciência multidisciplinar que se vale das ferramentas dos diferentes campos da biologia como recursos para a investigação criminal e análises de Perícia Ambiental. A Biologia Forense também tem como apoio outras áreas da biologia, como a biologia da conservação, genética, ecologia, taxonômia, dentre outros (RODRIGUES, 2002). Entre essas, a biologia da conservação busca a preservação da biodiversidade a longo prazo, buscando a viabilidade das populações em cenários de ameaças resultantes das atividades humanas, desenvolvendo medidas e ações para prevenir a extinção das espécies (FERREIRA, 2012; GONÇALVES, 2018). Nessa subárea, também se encontra a genética da conservação e a genética forense animal que fazem uso das ferramentas moleculares para auxiliar em estudos de conservação ou casos forenses (GONÇALVES; WASKO, 2013)

Dessa forma, a genética forense analisa as provas biológicas utilizando os marcadores moleculares para responder questões que auxiliam nas resoluções de casos forenses. Ela tem como objetivos principais a identificação das espécies em

amostras complexas de reconhecer com características morfológicas, a identificação de parentais, a individualização, a identificação da origem geográfica e a conservação (BORATTO; GIBBS, 2019; COOPER; COOPER; BUDGEN, 2009). Para atingir cada objetivo, a genética forense animal utiliza diferentes técnicas moleculares como sequenciamento, marcadores microssatélites, sequenciamento de nova geração (NGS), enzimas de restrição ou uma combinação delas.

O sequenciamento de regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido amplamente empregado para a identificação das espécie e em estudos filogenéticos de animais. Isso porque, esse marcador possui taxas de mutações maiores que o DNA nuclear, resultando no acúmulo de diferenças entre espécies, mesmo entre aquelas mais relacionadas (HEBERT et al., 2004). Já entre os marcadores nucleares que têm sido utilizados na genética forense, os STRs (*Short Tandem Repeats*) ou microssatélites têm sido amplamente utilizados.

Os STRs são frequentemente usados como marcadores para análise de parentesco, devido à alta variabilidade que apresenta por causa da variação no seu número de repetições (FRANTZ et al., 2006). Sua eficácia não depende apenas do número de marcadores genéticos utilizados, mas também do poder informativo de cada marcador. Desse modo, quanto mais informativos forem os microssatélites, melhor a eficiência na exclusão de falso parentesco no conjunto de amostras analisadas (DEASSIS et al., 2009). Eles são utilizados nas investigações relacionadas à caça furtiva, comércio ilegal, identificação de origem geográfica, identificação individual em casos de animais roubados ou comércio ilegal (FRANTZ et al., 2006; LORENZINI, 2005a; THITARAM et al., 2015)

## **2.2 Tráfico de Animais Silvestres no Brasil: Enfoque para a avifauna**

Todos os grupos taxonômicos são afetados por diversos tipos de crimes, dentro dos quais incluem-se captura ilegal do animal da natureza para fins lucrativos ou pessoais, comércio ilegal (nacional e/ou internacional), caça furtiva com fins lucrativos, esportivos ou de consumo, e destruição da vida selvagem. Esses crimes afetam espécies categorizadas dentro de todas as categorias da Lista Vermelha da IUCN e conseqüentemente trazem riscos à biodiversidade e ameaças à saúde silvestre e humana (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2014).

No Brasil, as aves compreendem o segundo grupo mais atingido (depois de mamíferos) nos crimes de captura ilegal da natureza, especialmente devido ao seu alto valor de mercado associado ao canto e ao colorido exuberante das penas. O Brasil apresenta a segunda maior riqueza de aves do mundo (aproximadamente 1919 espécies, sendo 351 endêmicas) (PIACENTINI et al., 2015) e toda essa diversidade é altamente ameaçada de acordo com os dados das apreensões dos órgãos de fiscalização.

Estima-se que o comércio ilegal de animais silvestres movimenta anualmente de 10 a 20 bilhões de dólares no mundo, sendo considerado a terceira maior atividade ilegal, perdendo apenas para o tráfico de armas e de narcóticos (WEBB, 2001). Aproximadamente de 12 a 38 milhões de animais silvestres são retirados das matas brasileiras por ano para suprir o comércio ilegal (RIBEIRO; SILVA, 2007). Neste crime as aves são o alvo principal, sendo – aproximadamente 80% das espécies contrabandeadas. Dentre essas, as autoridades ambientais (IBAMA) apontam que os Psitaciformes (como periquitos, papagaios e maritacas) e Passeriformes (como canário-da-terra, trinca ferro e cardeal da Amazônia) são os táxon mais comumente apreendidos (ARAUJO et al., 2010; PEREIRA BRITO, 2005; RENCTAS, 2001). Recentemente, um estudo realizado no estado de São Paulo demonstrou que o canário-da-terra é a espécie animal mais caçada no estado (AZEVEDO, 2018).

O valor de comércio de cada indivíduo pode variar, dependendo da espécie, de U\$ 10,00 – pago aos caçadores – a U\$ 30 mil – valor pago na revenda ao proprietário final, muitas vezes no exterior. Entre as aves de grande destaque associadas ao comércio clandestino de animais silvestres no país, estão os canários-da-terra (*Sicalis flaveola*), muito desejados por seu canto, e a arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*), espécie típica do Nordeste, ameaçada de extinção, que chegou a valer US\$ 150 mil no mercado internacional (GONÇALVES, 2018).

De acordo com a Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (RENCTAS, 2007), o tráfico de animais no Brasil, de uma forma geral, é estruturado sobre uma rede formada por um emaranhado de rotas para o escoamento de animais no interior do país e para o exterior. As rotas nacionais utilizadas por traficantes de animais indicam que esses são originários principalmente das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país e são encaminhados, particularmente, para

os estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Já para o exterior, é possível destacar como principais destinos desse comércio ilegal, países europeus, como Alemanha, Holanda, Bélgica, França, Inglaterra, Suíça, Bulgária, e os países asiáticos, como Japão e China (GONÇALVES; WASKO, 2013).

Além de outras ameaças, a caça e o comércio ilegal impulsionam o Brasil a apresentar o maior número de espécies categorizadas como "criticamente em perigo" (CR), "em perigo" (EN) ou "vulnerável" (VU), totalizando 234 espécies distribuídas entre essas categorias, havendo espécies de aves dentro das três classificações citadas (OLIVEIRA et al., 2002). Além disso, O Brasil possui quatro espécies de aves atualmente consideradas como extintas, sendo que duas destas foram extintas na natureza e duas outras sobrevivem apenas em cativeiro –como a arara-azul-pequena (*Anodorhynchus glaucus*) e o maçarico-esquimó (*Numenius borealis*) (Silveira; Costa-Straube, 2018). Além dessas, há outra espécie endêmica do Nordeste do Brasil, que atualmente sobrevive apenas em cativeiro - a ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), as causas de extinção das araras-azul-pequenas, que não tem sido vistas na natureza há 20 anos, foram, em primeiro lugar, a caça direcionada para o seu comércio ilegal e, em seguida, a degradação de seu habitat (IUCN, 2014, 2019).

Assim, as espécies alvo do comércio ilegal apresentam declínio em suas populações e, futuramente, poderão ser incluídas em algum grau de ameaça, caso estratégias conservacionistas e de combate a crimes contra a fauna não sejam implementadas no país. Entre essas espécies, encontra-se o canário-da-terra, uma das aves mais criadas em criadouros e provavelmente uma das mais coletadas e traficadas ilegalmente no país – de acordo com os dados proporcionados pela Polícia Militar Ambiental– razão pela qual será utilizada como modelo biológico de estudo.

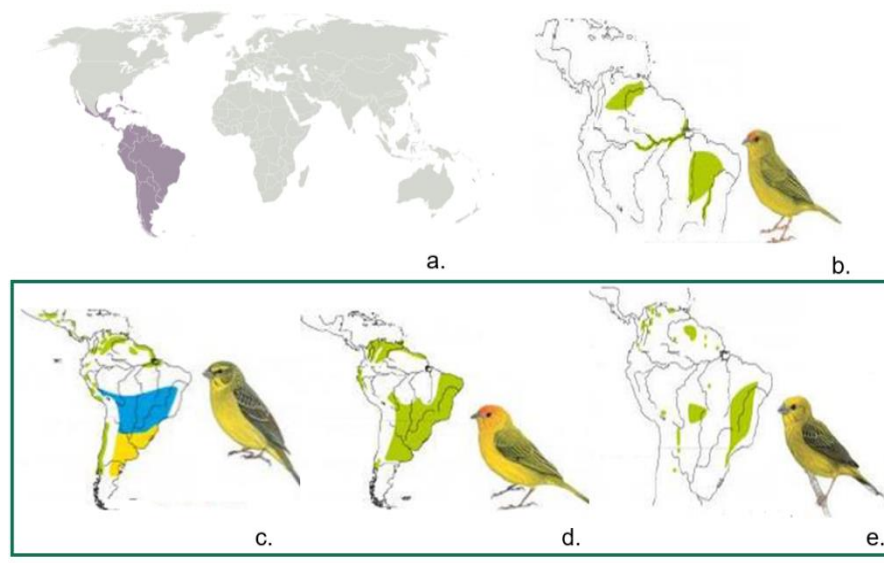
### **2.3 O canário-da-terra (*Sicalis flaveola*, Linnaeus 1766)**

As relações evolutivas e mesmo a identificação e delimitação de alguns grupos taxonômicos de aves mediante características morfológicas são incertas e difíceis. Diversos autores propõem classificações diferentes e muitas vezes excludentes (INGUI; SILVEIRA, 2007; REZENDE, 2015; SILVEIRA; MÉNDEZ, 1999). No entanto, é consenso entre os ornitólogos o fato dos Passeriformes (passarinhos) constituírem

um grupo monofilético, corroborado, entre outros caracteres, pelas descrições da siringe — órgão responsável pela vocalização das aves. Elas são divididas em duas subordens: Suboscines e Oscinenna, neste último inclui-se o gênero *Sicalis* (SILVEIRA; MÉNDEZ, 1999). A subordem Oscinenna também é denominada pássaros canoros, que apresentam uma siringe mais complexa em relação aos outros Passeriformes, o que lhes confere uma maior capacidade e habilidade na vocalização, constituindo o grupo preferido pelos criadores. Em relação à família, ainda é controverso especificar a posição taxonômica do gênero *Sicalis*, pois atualmente é incluído na família Thraupidae (CLARK, 1986; IUCN, 2019), mas já foi considerado da família Fringillidae (SHARPE; BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY), 1874), da subfamília Carduelinae (HELLMAYR, 1938) e da família Emberizidae (DICKINSON; REMSEN, 2013).

As espécies que pertencem ao gênero *Sicalis* variam de onze (MEYER DE SCHAUENSEE, 1971) a treze espécies (CLEMENTS et al., 2018; DICKINSON; REMSEN, 2013), dependendo dos caracteres utilizados para identificação. Essa falta de consenso quanto à posição taxonômica e classificação das espécies dentro do gênero é devido à grande variação morfológica e ecológica existente dentro do grupo; além do problema persistente na sistemática das aves, a classificação de populações alopátricas como subespécies, sem estudos mais precisos que avaliem as variações intra e interespecífica, assim como a distribuição geográfica de cada táxon (INGUI; SILVEIRA, 2007).

De acordo com a lista vermelha (IUCN, 2019), as espécies pertencentes ao gênero são 13: *S. flaveola*, *S. luteola*, *S. citrina*, *S. columbiana*, *S. luteocephala*, *S. taczanowskii*, *S. lutea*, *S. auriventris*, *S. olivascens*, *S. raimondii*, *S. uropigyalis*, *S. lebruni* e *S. mendozae*. Todas estão distribuídas na região Neotropical e, no Brasil, são encontradas as quatro primeiras vivendo em simpatria, sendo três delas (*S. flaveola*, *S. luteola* e *S. citrina*) com ocorrência na região do estado São Paulo (Figura 1).



**Figura 1.** a) Distribuição das espécies do gênero *Sicalis* na região Neotropical. b) *Sicalis colombiana*, c) *Sicalis luteola*, d) *Sicalis flaveola*, e) *Sicalis citrina* (REMSSEN et al., 2019; REZENDE, 2015). Essas quatro espécies do gênero *Sicalis* possuem distribuição no Brasil e o retângulo destaca as três espécies encontradas no estado de São Paulo. Figura modificada de REZENDE (2015). As cores no mapa representam as áreas de distribuição das espécies.

Dentro das quatro espécies do Brasil, existem onze subespécies de canário-da-terra (com pouca caracterização morfológica e molecular) que se apresentam em populações dispersas e em abrangente distribuição: *Sicalis citrina citrina*, *S. citrina browni*, *S. columbiana goeldii*, *S. columbiana leopoldinae*, *S. flaveola valida*, *S. flaveola brasiliensis*, *S. flaveola pelzeni*, *S. luteola luteola*, *S. luteola flavíssima*, *S. luteola chapmani* e *S. luteola luteiventris* (RIDGELY; TUDOR, 1989). A presença de *Sicalis flaveola valida* também foi relatada nos registros do MZUSP.

De forma geral, as espécies do gênero apresentam dimorfismo sexual e, em geral, os machos adultos possuem o ventre amarelo e a asa, cauda e dorso amarelo esverdeado, enquanto as fêmeas adultas são semelhantes aos machos, mas apresentam o dorso mais escuro e estriado. Em *S. flaveola* destaca-se nos machos a fronte alaranjada que pode ser restrita ao limite frontal (*S. f. pelzeni*) ou ultrapassando a região da órbita (*S. f. brasiliensis*). Os animais jovens, em geral, apresentam a plumagem semelhante à das fêmeas adultas, adquirindo somente a plumagem típica, no caso dos machos, após a muda (DEL HOYO; ELLIOTT; CHRITIE, 2019; REZENDE, 2015).

Mais especificamente, as subespécies possuem as seguintes características: *S. citrina citrina* ou canário-da-horta, os machos possuem coloração amarelo-limão no alto da cabeça, asas marrom-escuro, dorso oliva com estrias e cauda marrom-escuro e a fêmea similar ao macho, pouco mais escura; *S. citrina browni* se assemelha a *S. citrina citrina*, porém menor; *S. columbiana goeldii* ou canário-do-amazonas que se assemelha a *S. flaveola*, contudo com dimensões reduzidas e ventre esbranquiçado, sem estrias; *S. columbiana leopoldinae* semelhante a *S. columbiana goeldii*, porém com tonalidades mais escuras e ventre acinzentado e estrias proeminentes na região peitoral; *S. flaveola pelzeni* ou canário-do-sul que apresenta plumagem similar ao de *S. f. brasiliensis*, contudo apresenta maior densidade de listras; *S. luteola luteola* na qual os machos possuem na região uropigiana uma coloração amarelo citrino e as fêmeas uma tonalidade amarelada nesta região, as bordas de suas penas dorsais são levemente amareladas e as fêmeas apresentam ainda o dorso bastante estriado chegando a formar um colar; *S. luteola flavissima* apresenta os lados da cabeça em machos amarelo oliva, ventre amarelado com peito amarelo oliva; *S. luteola chapmani* os machos possuem dorso amarelo esverdeado, ventre amarelo citrino brilhante sem tons de oliva na região peitoral; e *S. luteola luteiventris* ou canário-típico que tem cabeça de cor amarelada com tonalidades menos marcadas e estria de cor cinza na região malar, peitoral acinzentada e ventre amarelo pálido (MONROE; SIBLEY, 1990; PEREIRA; BRITO, 2005; SILVEIRA; MÉNDEZ, 1999).

De acordo com as diretrizes da IUCN (União Internacional para a Conservação da natureza e dos Recursos Naturais) (IUCN, 2019), *Sicalis flaveola* tem o status de pouco preocupante (*Least Concern*), apesar de ser uma das espécies mais traficadas no Brasil (BRAZIL GOV., 1967; MMA, 2014) e a mais caçada no estado de São Paulo (AZEVEDO, 2018), o que representa uma ameaça à persistência da espécie a longo prazo.

Com o crescente interesse dos criadores amadores e comerciais em reproduzir as espécies brasileiras nos cativeiros, a caça ilegal (de centenas a milhares de canários-da-terra que foram tirados da natureza) e o comércio ilegal (para tornar essas aves silvestres em aves domésticas) tiveram expansão.

Nesse sentido, este estudo utilizou marcadores moleculares mitocondriais e nucleares como ferramentas que possibilitem averiguar a identidade da espécie em

cativeiro e a procedência de indivíduos de canário-da-terra, visando contribuir com os agentes fiscalizadores e conservação das populações de vida livre da espécie.

#### **2.4 O comércio do canário-da-terra (*Sicalis flaveola*, Linnaeus 1766) e sua legislação**

A Instrução Normativa Nº 169, de 20 de Fevereiro de 2008, atribui ao Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos recursos naturais renováveis, IBAMA, o poder de instituir e normatizar as categorias de uso e manejo da fauna silvestre no território brasileiro e dentro dessas categorias estão incluídas os criadouros comerciais de fauna silvestre (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2008). Posteriormente, no ano de 2011, a Instrução Normativa nº 3 do IBAMA, veio a regular e estabelecer o cadastramento de criadores de aves que exerçam atividade de criação comercial ou amadorista (objeto desta pesquisa) com fins associativistas, ornitofílicos e de estimação.

Esta separação é fundamental para a aplicação e regularização normativa, que explica que o criadouro comercial de aves é todo empreendimento autorizado pelo IBAMA, de pessoa física ou jurídica, com finalidade de criar, recriar, reproduzir e manter espécimes da fauna silvestre em cativeiro para fins de alienação de espécimes, partes, produtos e subprodutos (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2008). Por outra parte, o criador amador de aves, é a pessoa física que mantém sem finalidade comercial, indivíduos das espécies de aves para manejo e reprodução comprovada em sistemas controlados e com controle contra fugas e invasão a ambientes naturais (IBAMA, 2011). Complementando a legislação anterior, a Instrução Normativa Nº 10 /2011, de 20 de Setembro de 2011, indica que o criadouro amador deve possuir no máximo cem indivíduos e conforme previsto na Resolução Conama nº 394 de 06 de novembro de 2007, todas as informações devem estar adequadas ao Sistema Informatizado de Gestão da Criação de Passeriformes nominado Sistema de Controle e Monitoramento da Atividade de Criação Amadora de Pássaros (SISPASS).

O SISPASS além de incluir os dados pessoais do dono do criadouro como Nome do Criador, CPF, endereço, e-mail, estado civil, número de telefone, também inclui os dados de cada indivíduo presente no criadouro os quais devem ser



cadastrados posterior aos 30 dias de nascimento. Esses dados são: espécie (onde se inclui subespécie), nome popular, sexo, data de nascimento, óbito, fuga, código de anilha, tamanho da anilha, transferência a outros criadouros, data de transferência, identificação dos parentais e os locais onde podem ser localizados os pais. Todas essas informações em conjunto são de vital importância para analisar a incongruências entre os resultados moleculares e os cadastrados no SISPASS, permitindo detectar possíveis indivíduos provenientes da natureza e mantidos em cativeiro como pets vítimas do tráfico e comércio ilegal.

### **3.PERGUNTA E HIPÓTESES**

Com base nas informações apresentadas na fundamentação teórica, nossa pergunta é: Os indivíduos da espécie *Sicalis flaveola* mantidos nos criadouros amadores são realmente resultados da reprodução em cativeiro?

Como a hipótese se baseia que existe comércio ilegal do canário-da-terra em criadouros consideramos que existem indivíduos nos criadouros que não formam parte do painel cadastrado no Sistema Gestão de criadores de Passeriformes Silvestres (SISPASS).

## **4. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**

### **4.1 Objetivo geral**

Investigar se os indivíduos da espécie *Sicalis flaveola* mantidos em criadouros (do estado de São Paulo) realmente são resultado de reprodução em cativeiro, por meio do contraste dos resultados da análise genética da paternidade com os registros do SISPASS.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Confirmar a identidade da espécie *Sicalis flaveola* nas amostras coletadas nos criadouros, com o uso da técnica do DNA *barcoding* e do marcador mitocondrial Citocromo C Oxidase I.
2. Estimar a relação de parentesco entre os indivíduos amostrados com o uso de microssatélites (locos nucleares) descritos para outras espécies de Passeriformes.
3. Contrastar os resultados da análise genética da paternidade com os registros do SISPASS.

### **4.3 Justificativa do estudo**

*Sicalis flaveola* é uma das 10 espécies de aves mais apreendidas no Brasil, mas ainda não há nenhuma ferramenta que nos permita identificar a origem dos indivíduos e, dessa forma, reduzir o tráfico ilegal dessa espécie. Considerando que a delimitação de espécies (através de um marcador mitocondrial) e as análises de paternidade (utilizando microssatélites) que são amplamente empregadas na genética forense animal, o presente projeto objetiva avaliar a possibilidade de utilização dessas ferramentas genéticas, a fim de contribuir para o entendimento sobre o tráfico de avifauna no Brasil, especialmente para *S. flaveola*.

## 5.MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Coletas de amostras

O estudo foi realizado no estado de São Paulo, durante os anos 2018 e 2019. As coletas das amostras de *Sicalis flaveola* foram realizadas com as licenças ambientais IBAMA/SISBIO #64866, SIGEN #A898D1C e com autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) 8391261118 – UFSCar sobre a coleta e manipulação de amostras.

A coleta do material foi feita com a colaboração da Polícia Militar Ambiental do estado de São Paulo mantendo sempre a cadeia de custódia que é a documentação cronológica que registra a sequência de aquisição da prova, controle, transferência, análise e disposição de evidências físicas ou eletrônicas para garantir a imparcialidade.

Durante as abordagens de fiscalização e coleta do material biológico, as anilhas dos pássaros foram conferidas de acordo as características dos modelos IBAMA e SISPASS. A coleta das amostras de sangue ulnar (Figura 2) foi feita de acordo com as metodologias internacionais (HOYSAK; WEATHERHEAD, 1991; TROUWBORST et al., 2017; WHITE; DUSEK, 2015), mantendo todas as aves vivas e com o mínimo de dano possível, sendo o sangue coletado e conservado em papel FTA (Flinders Technology Associates - Whatman).

Considerando que *Sicalis citrina* e *Sicalis columbiana* ocorrem em simpatria com *S. flaveola* na região do estado de São Paulo e que os caracteres morfológicos em idades jovens não permitem a diferenciação da espécie pelo fenótipo, utilizamos amostras de tecido dessas espécies para análises de identificação molecular da espécie. No total, 12 amostras foram doadas pelo criadouro comercial Bocaina e 33 pelo MZUSP (Museu de Zoologia da USP), respectivamente.

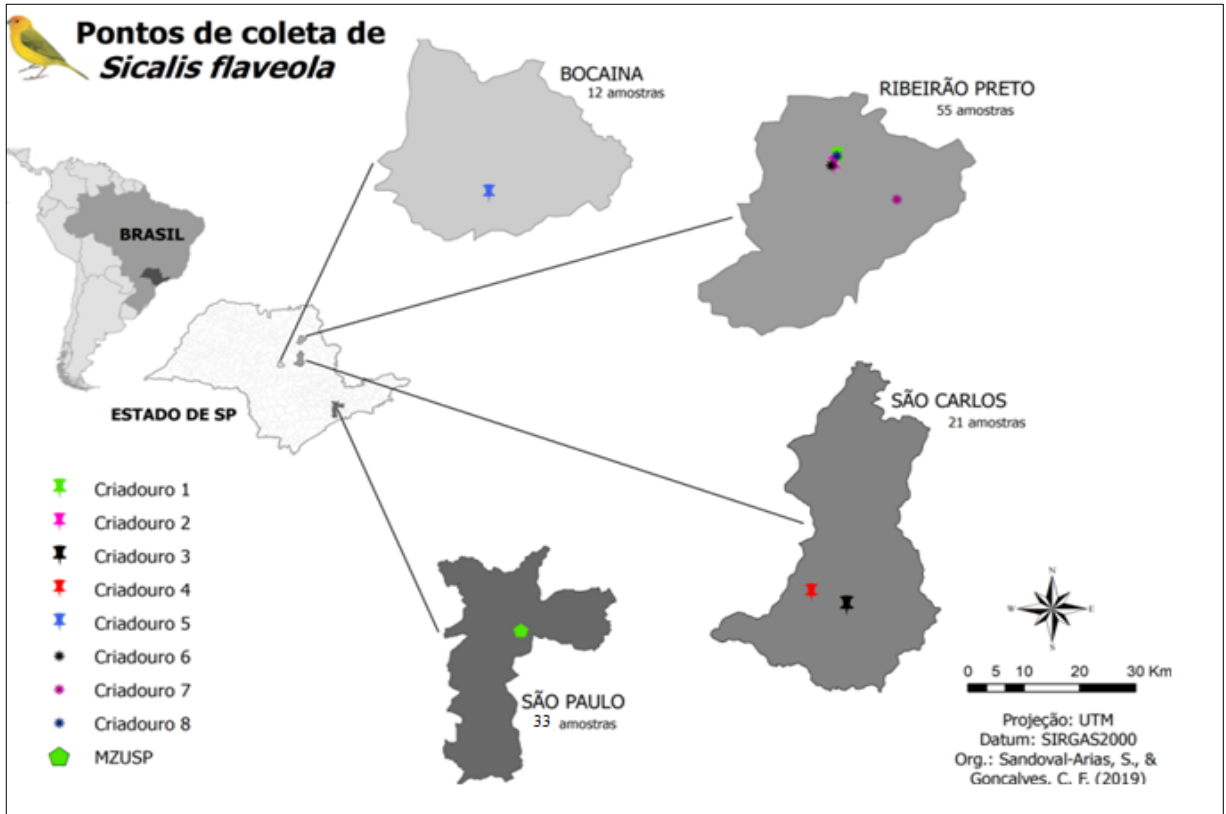
Todas as amostras foram utilizadas para a padronização dos protocolos; as amostras de tecido do criadouro comercial Bocaina foram utilizadas para a padronização dos testes de parentesco e as amostras doadas pelo MZUSP, foram utilizadas para a análise molecular de identificação de espécies, elas não estão inclusas na análise de parentesco pois o parentesco é desconhecido. De acordo com as informações fornecidas pelos pesquisadores do MZUSP, algumas dessas

amostras foram adquiridas de apreensões, razão pela qual consideramos cuidadosamente possíveis inconsistências entre a literatura e nossos resultados.

A coleta das amostras dos criadouros foi distribuída em quatro municípios e as amostras doadas pelo Museu são representadas em uma única locação no mapa da Figura 3. Todas as coordenadas geográficas estão descritas em detalhe no Apêndice 3.

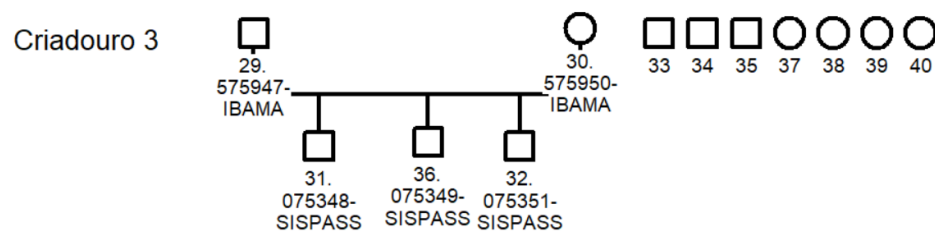
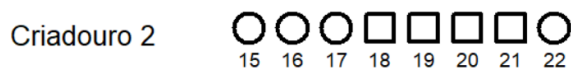
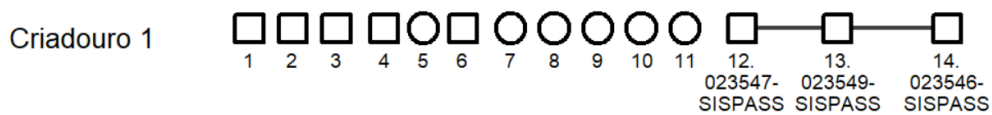


**Figura 2:** Metodologia para coleta de sangue ulnar. Fotografias do acervo pessoal. a) Materiais utilizados na coleta (luvas, máscaras, touca de cabelo, ficha de coleta de informação, papel FTA, cortador de unhas, sacolas ziplock, álcool 70%, DNA Away, b) Captura dos canários por parte da Polícia Militar Ambiental, c) Revisão do estado das anilhas e comparação do número IBAMA com o cadastro SISPASS, d) Esterilização com algodão e álcool 70% da pata da ave, e) Corte da unha na região da veia ulnar, f) Coleta de sangue sobre o papel FTA.

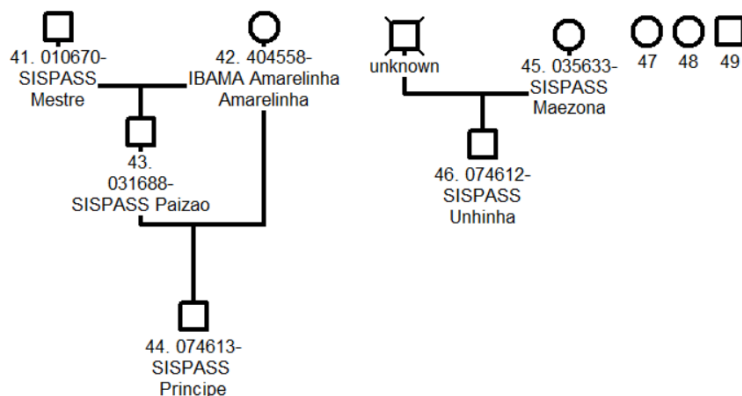


**Figura 3:** Distribuição e localização das amostras coletadas.

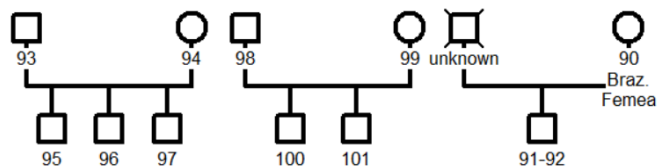
Os heredogramas da figura 4, desenvolvidos com o *software* GenoPro2018, mostram os vínculos de parentesco dos passeriformes de acordo com os registros do dono do criadouro e do SISPASS.



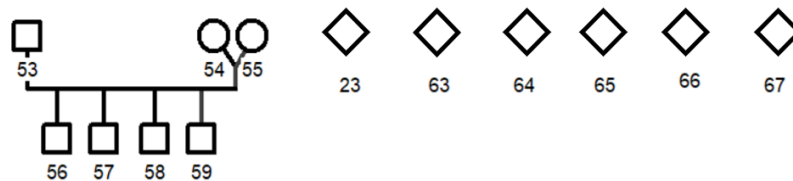
Criadouro 4



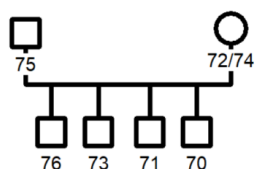
Criadouro 5



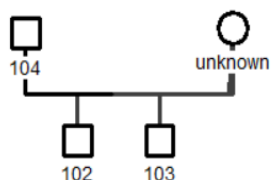
Criadouro 6



Criadouro 7



Criadouro 8



**Figura 4:** Heredograma das amostras por criadouro. Cada criadouro está representado com a numeração. Cada sexo está mostrado com o símbolo, o círculo representa fêmea e o quadrado macho. As amostras com X no meio não estavam disponíveis para coleta e os losangos representam sexos desconhecidos.

Após a coleta das amostras, os equipamentos (tesouras, bisturi e placa de petri) utilizados foram limpos com Thermo Scientific™ DNA AWAY™ Surface Descontaminant e etanol 70%. Posteriormente, autoclavados para evitar contaminação cruzada. Uma vez preenchido o formulário de cadeia de custódia, as análises foram realizadas.

As amostras coletadas foram analisadas para a identificação molecular das espécies e análises de parentesco de acordo com o Apêndice 2.

## **5.2. Extração de DNA, amplificação do gene COI, purificação e sequenciamento**

As extrações de DNA genômico das amostras coletadas (122 amostras: 34 de tecido e 88 de sangue preservado em papel FTA) foram realizadas conforme o protocolo de Fenol-clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Posteriormente, um fragmento de aproximadamente 500 pb (pares de base) do gene Citocromo C Oxidase I (COI) foi amplificado em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* desenhados por Folmer e colaboradores (1994). As reações de PCR ocorreram em um volume final de 10 µL contendo 1X de tampão de PCR (5X) (Promega), 6,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,8 µM de cada *primer*, 2U Platinum® Taq polimerase (Promega), 20 ng/µL de DNA e água mili-Q autoclavada para completar o volume final. As condições para amplificação do gene foi uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min; finalizando a temperatura de extensão de 72°C por 10 min.

Após verificar a amplificação em gel de agarose a 2%, o produto de PCR foi purificado utilizando o protocolo de polietilenoglicol 20% (KUSUKAWA et al., 1990). Posteriormente, os fragmentos foram sequenciados em sequenciador automático ABI3730XL, Applied Biosystems.

### 5.3 Análise molecular de identificação de espécies

As sequências COI obtidas no presente estudo foram alinhadas e editadas juntas com sequências COI de referência das espécies do gênero *Sicalis*, *S. luteola*, *S. olivascens* e *S. luteocephala*, obtidas no Barcode of Life Data System (BOLDSYSTEMS v. 4), utilizando o software Geneious Prime® 2020.0.5 (BIOMATTERS LTD, 2020; KEARSE et al., 2012) (Apêndice 3). As sequências de referências encontradas nesse banco de dados recebem a identificação dos projetos aos quais fazem parte e são consideradas “perfis barcode”, ou seja, seu status taxonômico já foi previamente confirmado através de análises morfológicas e ecológicas.

Os resultados foram analisados mediante duas abordagens: distância (DNA *barcoding*) e filogenia e coalescência. A delimitação molecular de espécies a partir da abordagem de distância utiliza como critério a divergência genética. Geralmente táxons definidos por DNA *barcoding* apresentam baixa divergência dentro dos grupos (espécies/MOTUs) e alta divergência entre grupos, dado um *threshold*. Para o presente trabalho, foram utilizados dois valores de *threshold*: um descrito previamente na literatura 2% (HEBERT et al., 2004) e outro estimado para nosso conjunto de dados (ótimo *threshold* - OT) com um método experimental implementado no pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R* (BROWN et al., 2012) para a plataforma R (<http://www.R-project.org>). Ambos valores foram utilizados para obter as unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs) no software jMOTU (JONES; GHOORAH; BLAXTER, 2011).

O software Mega X (TAMURA et al., 2011) foi usado para calcular as médias das distâncias genéticas intra e interespecíficas, baseado no modelo de evolução Kimura 2-paramêtros (K2P) (KIMURA, 1980). Uma topologia de *Neighbour-Joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) também foi construída com modelo de substituição. O objetivo foi representar graficamente as divergências entre as espécies. O suporte dos clados foi avaliado por Bootstrap (1000 pseudo-réplicas) (FELSENTEIN, 1985). Todas as análises descritas acima são padrões nos estudos empregando DNA *barcoding*.

Além da abordagem baseada em distância para delimitar os grupos, também foi utilizado uma abordagem filogenética e coalescente, considerada estatisticamente



mais robusta que a anterior, usando GMYC (*General mixed Yule Coalescent*) e bPTP (*Bayesian implementation of the Poison Tree Process model*).

O GMYC (PONS et al., 2006) explora, a partir de uma árvore ultramétrica, a diferença prevista nas taxas de ramificação entre os eventos de especiação e extinção (relações interespecíficas), e os eventos de coalescência (relações intraespecíficas), com base no comprimento dos ramos. Assim, o método detecta mudanças nos comprimentos dos ramos que estariam associados à transição entre especiação/extinção e coalescência, e conseqüentemente, aos limites específicos (MACHADO, 2016; PONS et al., 2006). A análise de GMYC necessita de uma árvore ultramétrica, construída no software BEAST v.2.2.1. A árvore foi estimada a partir do modelo do relógio relaxado com distribuição *log-normal* e com o prior da árvore baseado no *birth-death*.

A árvore do BEAST v.2.2.1 foi construída a partir de quatro cadeias independentes de Markov iniciadas a partir de árvores aleatórias e corridas com 10 milhões de gerações, com parâmetros e árvores sendo salvas a cada 1000 gerações. Para o *burn-in* foram descartadas 25% das topologias, e os arquivos de log e tree foram combinados utilizando LogCombiner v.1.8.0 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2012). A mixagem apropriada dos dados foi verificada com o Tracer v1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2007), e o tamanho efetivo da amostragem (ESS, em inglês, *effective sample size*) de 200 ou mais foi necessário para todos os parâmetros. A análise GMYC foi estimada no pacote SPLITs (*SPecies Limits by Threshold Statistics*) do R utilizando o *threshold* único sob os parâmetros padrões (intervalo = c (1,10)).

O outro método utilizado foi o bPTP (Zhang et al., 2013) que, assim como GMYC, também procura pontos de transição onde o padrão de ramificação muda dentro espécies e entre as espécies. A diferença é que bPTP usa número de substituições, enquanto GMYC identifica taxas de ramificações. A análise de bPTP foi conduzida em um servidor online (<http://species.h-its.org/>) utilizando uma árvore de bayesiana gerada a partir do programa MrBayes.

## 5.4 Transferabilidade dos locos de microssatélites heterólogos e análise de parentesco: Amplificação de DNA nuclear e genotipagem

### *Testes de transferabilidade*

Considerando a proximidade filogenética das espécies com informação disponível (BURNS et al., 2014), 24 locos de microssatélites heterólogos foram eleitos, além de dois locos sugeridos por pesquisadores especialistas. Todos eles foram amplificados com as condições descritas na Tabela 1 (CORRÊA, 2009; FERREIRA, 2012; MEDOLAGO et al., 2018). As reações de PCR foram otimizadas para cada um dos locos e realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

As PCRs ocorreram em um volume final de 10 µL contendo 1X de tampão de PCR (10X) (Sem MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen), 5,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,64 mM do *primer reverse* com cauda M13 e 0,16 mM do *primer forward*, 0,64 pMol de fluoróforo, 10 a 20 ng/µl de DNA, 2U de Platinum® Taq polimerase (Invitrogen), e o restante de H<sub>2</sub>O MiliQ.

As condições de amplificação foram otimizadas: desnaturalização inicial a 95°C (5 min.), seguida de 35 ciclos a 95°C (60 seg.), temperatura específica de anelamento para cada *primer* (Tabela 1) a 40 seg. e extensão a 72°C (40 seg.). Para aumentar a eficácia e especificidade do anelamento do primer marcado com fluoróforo aos fragmentos, a PCR foi pausada e o M13 foi adicionado (DE ARRUDA et al., 2010; NEILAN; WILTON; JACOBS, 1997; SCHUELKE, 2000), reiniciando mais 10 ciclos de desnaturação a 95°C (45 seg.), anelamento a 52°C (45 seg.), extensão a 72°C (45 seg.) e a extensão final a 72°C (20 min.), mantida a 4°C até armazenamento em freezer -20°C.

Tabela 1: Lista dos *primers* candidatos para a transferabilidade.

	Loco	Ta (°C)	Artigo de referência	Espécie(s) em que foram inicialmente testados
1	NF102	60	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
2	NF0910	60	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
3	NF1920	52	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
4	NF3132	52	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
5	NF1112	54	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)

				Passeriforme)
6	NF0304	56	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
7	NF2324	52	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
8	NF0506	60	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
9	NF1314	54	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
10	NF2728	52	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
11	SF01N	52	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
12	CB07	60	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
13	CB03	52	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
14	CB08	50	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
15	CB06	52 a 63	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
16	NF1516	52	CORRÊA, 2009	<i>Neothraupis fasciata</i> (Emberizidae, Passeriforme)
17	SAM8	52	MEDOLAGO et al., 2018	<i>Sporophila maximiliani</i> (Thraupidae, Passeriforme)
18	SAM11	58	MEDOLAGO et al., 2018	<i>Sporophila maximiliani</i> (Thraupidae, Passeriforme)
19	SAM18	60	MEDOLAGO et al., 2018	<i>Sporophila maximiliani</i> (Thraupidae, Passeriforme)
20	SAM25	58	MEDOLAGO et al., 2018	<i>Sporophila maximiliani</i> (Thraupidae, Passeriforme)
21	SAM29	60	MEDOLAGO et al., 2018	<i>Sporophila maximiliani</i> (Thraupidae, Passeriforme)
22	PD02	62	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
23	PD03	60	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
24	SF03	60	FERREIRA, 2012	<i>Paroaria dominicana</i> e <i>Saltator similis</i> (Thraupidae, Passeriforme)
25	Zole_H2	52	POESEL et al., 2008	<i>Zonotrichia leucophrys pugetensis</i> (Passerellidae, Passeriforme)
26	Zole_F11	52	POESEL et al., 2008	<i>Zonotrichia leucophrys pugetensis</i> (Passerellidae, Passeriforme)

Após a verificação da amplificação em gel de agarose a 2%, os produtos de PCR foram genotipados em um sequenciador automático ABI3730XL Applied Biosystems. Os eletroferogramas foram visualizados no software Geneious Prime® 2020.0.5 (BIOMATTERS LTD, 2020) para a definição dos genótipos. Eletroferogramas com pico abaixo de 100 foram re-genotipados ou não considerados nas análises e o tamanho e forma dos picos por alelo foram

padronizados. Apenas locos com 70% do total dos genótipos ou mais foram considerados nas análises.

*Confirmação do motif:* pelo menos uma amostra homocigota por microssatélite foi amplificada em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) mediante PCR utilizando o mesmo protocolo de amplificação otimizado mas sem o primer M13. Após verificar a amplificação em gel de agarose a 2%, o produto de PCR foi purificado utilizando o protocolo de polietilenoglicol 20% (KUSUKAWA et al., 1990). Os fragmentos foram sequenciados em sequenciador automático 57ABI3730XL Applied Biosystems.

*Análises de Diversidade Genética e Parentesco:* Com o intuito de descrever qualitativamente a diversidade presente nos criadouros coletados foram feitas as caracterizações dos locos de microssatélite e considerada a avaliação dos erros de genotipagem, a verificação de alelos nulos, erros de pontuação (*scoring errors*) e possíveis erros de leitura utilizando o *software* Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Por não se tratar de populações ideais (grande, panmítica, com cruzamento aleatório), optamos por não realizar os testes de Equilíbrio Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação.

Calculamos o número de alelos ( $N_a$ ) pelo programa GenAlex 6. 5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) assim como a estimativa de frequência de cada alelo por loco. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi calculado no programa Cervus v.3.0.7, classificando seus valores de PIC em muito informativos ( $PIC > 0,5$ ), razoavelmente informativos ( $0,5 > PIC > 0,25$ ) e pouco informativos ( $PIC < 0,25$ ) (BOTSTEIN et al., 1980).

Tendo o conhecimento prévio de que existiam cruzamentos consanguíneos entre os indivíduos dos criadouros amostrados, conhecendo que a diversidade genética diminui com a endogamia e que esta pode gerar uma maior quantidade de homocigotos nas análises, utilizamos a função GENHET versão 3.1 do R (COULON, 2009, 2010), que emprega a fórmula  $IR = \frac{(2H - \sum f_i)}{(2N - \sum f_i)}$  para calcular o parentesco interno de cada indivíduo (*internal relatedness* (IR))

Essa estimativa permite o compartilhamento de alelos raros para conte mais do que o compartilhamento de alelos mais comuns. No entanto, sua distribuição é assimétrica: a máxima (1) é obtido quando todos os loci são homocigóticos,

independentemente das frequências alélicas; e o valor mínimo (-1) pode ser obtido apenas quando em todos os locos com dois alelos são heterozigóticos no indivíduo.(APARICIO; ORTEGO; CORDERO, 2006; COULON, 2009).

Posteriormente, foram feitas as análises de parentesco por família, utilizando a abordagem de probabilidade de exclusão (P) (JONES et al., 2010). Assim, utilizando o programa GenAlex 6. 5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012), foi calculada a probabilidade de exclusão para cada loco por criadouro. Foram estimadas as probabilidades de exclusão (P) para as duas situações de nosso conjunto amostral: (i) P1 é a probabilidade de exclusão quando ambos os pais são conhecidos e (ii) P2 é probabilidade de exclusão conhecendo um dos pais (PAETKAU et al., 1995).

No programa Cervus v.3.0.7 (MARSHALL et al., 1998) foram calculadas as probabilidades de cada indivíduo pertencer a seu grupo familiar (NE-P1, NE-P2 e NE-PP). Este software usa o método de *likelihood* para estimar as relações com máxima probabilidade entre os pais candidatos e o grupo de descendentes (WANG, 2012). O método é baseado no cálculo de uma pontuação LOD (LOD Score), que informa da probabilidade de um indivíduo (ou dois indivíduos) ser o pai (ou os pais) de um determinado descendente, dividido pela probabilidade de que os indivíduos não estejam relacionados. A prole é atribuída aos pais que possuem a maior pontuação .

Para determinar a confiança das atribuições e conhecer o candidato parental mais provável, o programa Cervus v.3.0.7 utiliza o cálculo de dois valores estatísticos: a pontuação LOD e a pontuação Delta. Marshall e colaboradores (1998) explicam que a pontuação LOD é obtida aplicando o logaritmo da proporção de verossimilhança; resultados negativos significam que é muito pouco provável que o parental candidato seja o verdadeiro pai; por outra parte, a pontuação Delta é definida como a diferença entre a pontuação LOD do candidato mais provável e o segundo mais provável. Este cálculo é muito útil para evitar atribuições incorretas quando dois ou mais candidatos têm uma pontuação LOD positiva porque somente valores de LOD maiores que zero são considerados quando a pontuação Delta é calculada. Para complementar os cálculos anteriores, o nível de confiança é outro parâmetro utilizado. Marshall e colaboradores (1998) explicam que pode ser definido como a tolerância de atribuir um falso positivo entre os níveis de confiança que o programa permite, esses são relaxados + (com 80% de confiança) e estrito \* (com

95% de confiança), valores menores ao 80% de confiança são assinalados com o símbolo de hífen pelo programa. Valores com símbolo negativo indicam graus de confiança menores que 80%. Metodologicamente, a análise consiste em três etapas: primeiro são calculadas as frequências alélicas, em seguida é realizada uma simulação de parentesco para o conjunto de possíveis pais de cada sexo e, finalmente, é realizada a análise de parentesco.

Em nosso estudo, as famílias com cadastros únicos de pais candidatos foram analisadas considerando o *LOD Score* e cadastros com mais de um pai ou mãe candidatos, previamente cadastrados, foram analisados utilizando *LOD Score* e *Delta Score* com ambos níveis de confiança (estrito (95%) e relaxado (80%).

O teste de maternidade e paternidade foi realizado individualmente para cada família nos criadouros que incluíam pelo menos uma família completa e pelo menos mais duas amostras de sexo conhecido (uma fêmea e um macho) do mesmo criadouro com indivíduos em idade reprodutiva apta para serem possíveis pais candidatos. Famílias com características diferentes (Família 4 e 5) foram unicamente analisadas com o teste de maternidade, com o intuito de eleger e confirmar a mãe mais provável.

Na análise de frequência alélica por família foram incluídos sete locos, utilizando a correção de Yates quando  $df=1$  e a estimativa da frequência do alelo nulo. Calculamos as probabilidades de não-exclusão (NE) combinada NE1, NE2 e NEPP.

Na análise de parentesco utilizando o *software* CERVUS 3.0 foi utilizada a não-exclusão, definida como “a probabilidade média de não excluir um único parental candidato ou um par parental candidato não relacionado de uma prole utilizando um determinado conjunto de locos” (MARSHALL, 2014). A análise de exclusão não foi considerada porque pressupõe poucos pais candidatos, locos altamente polimórficos e um painel amplo de STR, características essenciais, uma vez que em circunstâncias menos favoráveis a probabilidade de falsas exclusões aumenta (MARSHALL, 2014). As probabilidades médias de não-exclusão para três categorias de análises de parentesco foram calculadas, como segue: identificar um progenitor quando o outro é conhecido (NE-1P), identificar um progenitor quando o outro é desconhecido (NE-2P) e identificação do pai e mãe em conjunto quando nenhum é conhecido (NE-PP) (Kalinowski et al., 2007).

Para a simulação da análises de parentesco foram considerados sete locos com as seguintes restrições: 80% da proporção amostrada em relação a quantidade de amostras totais no criadouro (*prop sampled*), 80% de probabilidade de todos os locos ser amostrados (*prop locy typed*) e 200.000 mil replicas (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

Foram realizadas as análises de maternidade e paternidade com o intuito de identificar os parentais mais prováveis e contrastar esses resultados com os cadastros do SISPASS.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Coletas de amostras

Um total de 122 amostras foram coletadas e tiveram o seu DNA extraído. A quantificação da extração indicou entre 4-20 ng/μl para amostras de sangue. No entanto, as amostras de tecido propiciaram maior quantidade de DNA por microlitro. Sendo que essa razão esteve entre 70-500 ng/μl. Das 33 amostras de tecido doadas pelo Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), conservadas em álcool 100% a -80 C°, provenientes de apreensões da polícia, nove estavam degradadas, provavelmente devido a manipulação do tecido antes de ser armazenado, impossibilitando sua amplificação e utilização nas análises.

### 6.2 Análise de identificação da espécie

De 36 sequências do banco de dados da BOLD Systems foram analisadas 33, sendo retiradas as amostras duplicadas e de menor comprimento. Portanto, o *dataset* final foi composto por 48 sequências obtidas no presente estudo e 33 do banco de dados, totalizando 81 amostras, uma amostra das espécies *S. luteocephala* e *S. citrina*, 8 amostras de *S. columbiana* (3 amostras da subespécie *S. c. goeldii* e 5 amostras da subespécie *S. c. leopoldinae*), 50 amostras de *S. flaveola* (incluindo uma amostra da subespécie *S. f. pelzelni*, uma amostra de *S. f. brasiliensis*, três amostras de *S. f. valida* e 44 amostras de *S. flaveola* sem subespécie identificada), dez amostras de *S. luteola* e onze amostras de *S. olivascens* (Apêndice 3).

Depois do alinhamento e da edição das sequências, a média do comprimento dos 81 fragmentos do gene COI foi 578 pb. Do total de pares de bases analisados, 152 sítios foram polimórficos, 127 foram parcimoniosamente informativos e 30 foram *singletons*. Nenhuma deleção, inserção ou *stop* códon foi observada, suportando a hipótese de que os fragmentos das sequências não são NUMTs (pseudogenes mitocondriais nucleares) e sim sequências funcionais do gene COI.

A Tabela 2 mostra as médias de distância genética intraespecíficas. Esses valores, conforme o esperado, foram menores do que as médias interespecíficas (Tabela 3). A média obtida da distância genética entre todos os grupos foi de 0,1231 e para a distância intraespecífica foi 0,005.



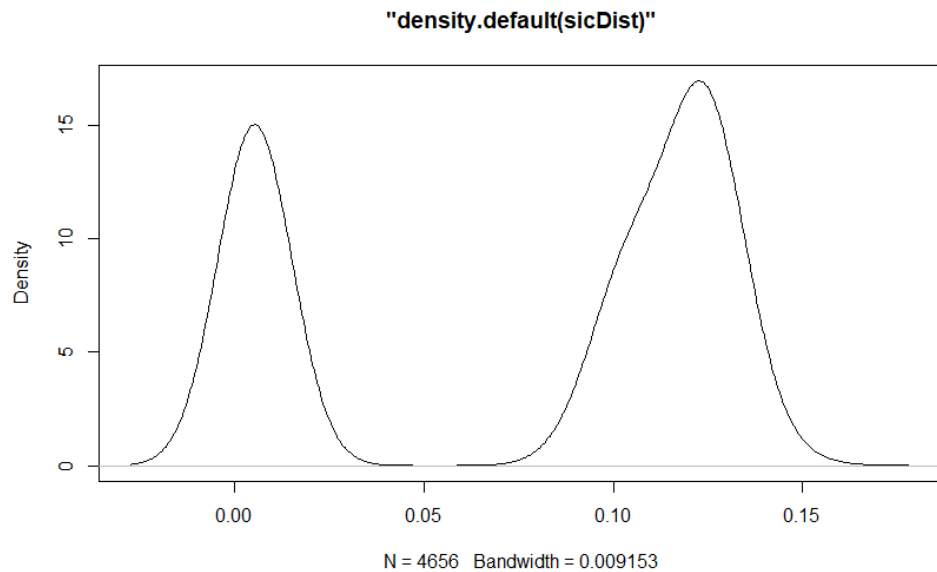
Tabela 2: Médias das distâncias genéticas intraespecíficas (d) (preto) e valores de *standart error* (S.E) (azul). *S. citrina* e *S. luteocephala* não foram incluídas pois apresentavam apenas um único espécime e a média não pode ser calculada.

<b>Espécie</b>	<b>d</b>	<b>S.E.</b>
<b><i>S. columbiana</i></b>	0,006	0,0021
<b><i>S. flaveola</i></b>	0,0053	0,0016
<b><i>S. luteola</i></b>	0,0042	0,0013
<b><i>S. olivascens</i></b>	0,0045	0,0017

Tabela 3: Médias das distância genética interespecíficas (preto) e valores de *standart error* (azul).

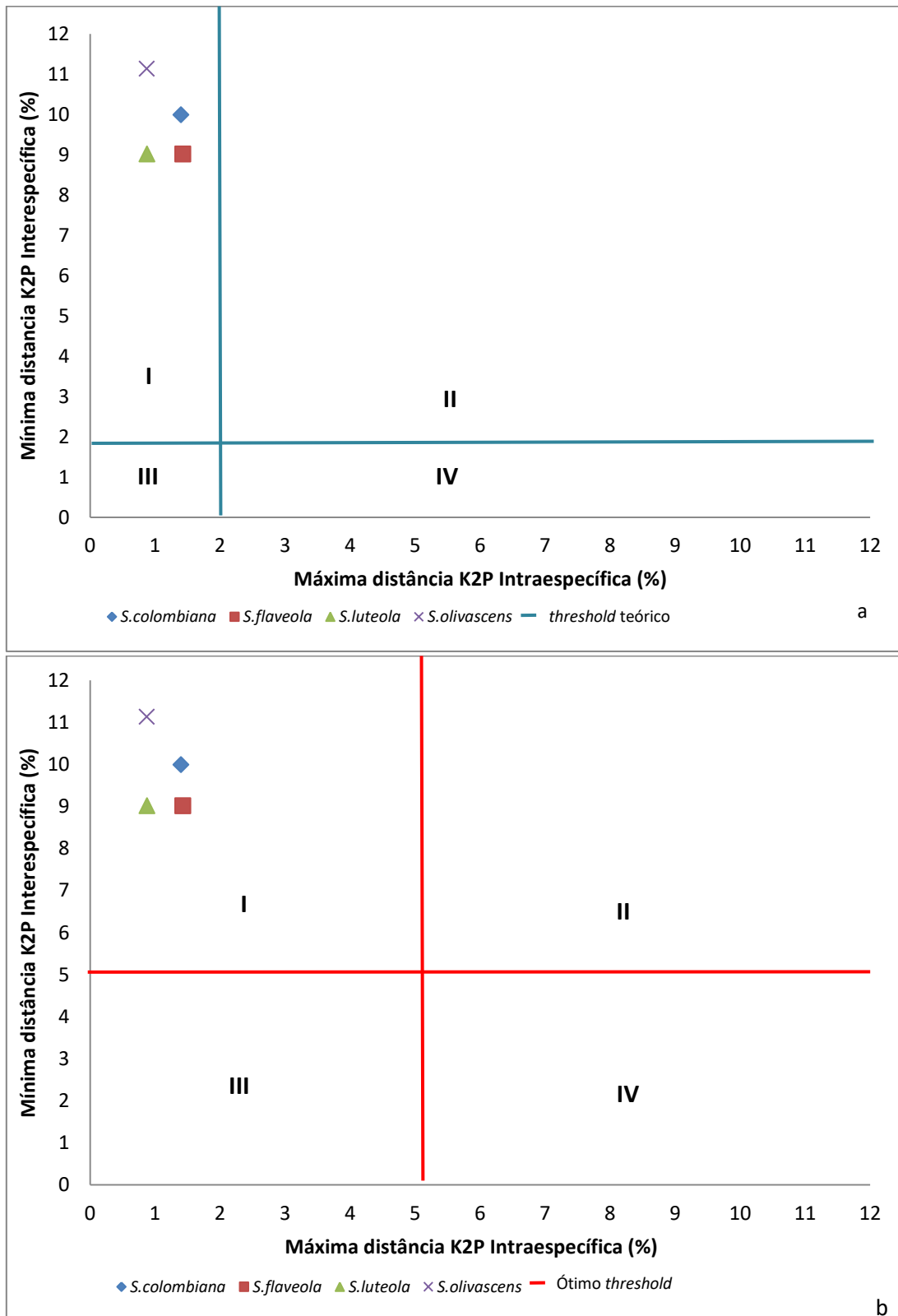
<b>Espécie</b>					
<b><i>S. citrina</i></b>					
<b><i>S. columbiana</i></b>	0,1382				
<b><i>S. flaveola</i></b>	0,1330	0,1211			
<b><i>S. luteola</i></b>	0,1457	0,1069	0,1029		
<b><i>S. luteocephala</i></b>	0,1126	0,1207	0,1358	0,1176	
<b><i>S. olivascens</i></b>	0,1475	0,1268	0,1258	0,1202	0,0915

A função “LocalMinima” no SPIDER propôs um OT de 0.052 (5.2%) (Figura 5) como o valor que representa a possível transição entre as distâncias intra e interespecíficas. Independente do *threshold* adotado (2% ou 5,2%), seis MOTUs foram identificadas usando o *software* jMOTU: *S. flaveola*, *S. luteola*, *S. olivascens*, *S. luteocephala*, *S. citrina* e *S. columbiana*. As sequências de todos os indivíduos dos criadouros foram agrupadas com as sequências de referência da espécie nominal *S. flaveola*, indicando que a espécie de canário-da-terra utilizada nos criadouros analisados é mesmo *S. flaveola*.



**Figura 5:** Gráfico do ótimo threshold (OT) calculado pelo pacote SPIDER.

Para evitar sub ou superestimação das distâncias genéticas, uma vez que utilizamos valores médios, utilizamos também uma análise que compara as máximas distâncias intra e mínimas distâncias interespecíficas para cada espécie, exceto *S. citrina* e *S. luteocephala*. No gráfico dos quadrantes, para ambos os valores de *threshold* empregados (2% e 5,2%) foi possível identificar que todas as espécies analisadas estão localizadas no primeiro quadrante, indicando que a separação molecular dos táxons é concordante com a corrente taxonômica (Figura 6a e 6b). Essa conclusão é feita uma vez que de acordo com o método de DNA *Barcoding* as distâncias de indivíduos de uma mesma espécie são menores do que indivíduos de espécies distintas. Portanto, esperamos baixos valores intraespecíficos e altos valores interespecíficos.



**Figura 6:** Gráfico dos quadrantes, distâncias mínimas interespecíficas em comparação com máximas intraespecíficas do marcador mitocondrial COI (K2P). a) Análise considerando o threshold teórico de 2%, b) Análise considerando o ótimo *threshold* (OT) de 5,2% calculado para nosso conjunto de dados.

Apesar de existir uma incerteza taxonômica nas espécies do gênero, a identificação fenotípica descrita concordou com a separação molecular na abordagem de distância.

As análises de GMYC também sugerem a presença de seis entidades moleculares (consideradas “espécies” para a análise) com um intervalo de confiança de 4-4. A probabilidade do modelo GMYC foi significativamente maior que a probabilidade do modelo nulo, o que refuta a hipótese nula de que há apenas uma unidade molecular no conjunto de dados. O GMYC recuperou os mesmos seis *clusters* identificados pela análise de distância. Os resultados do bPTP evidenciaram com suporte bayesiano máximo (1) as mesmas unidades moleculares.

A topologia ultramétrica bayesiana recuperou seis clados com probabilidades posteriores maiores que 90%. Cada clado corresponde às MOTUs identificadas: *S. flaveola* (clado 1), *S. luteola* (clado 2), *S. olivascens* (clado 3), *S. luteocephala* (clado 4), *S. citrina* (clado 5) e *S. columbiana* (clado 6). Em suma, todos os métodos empregados foram congruentes quantos as unidades moleculares estimadas (Fig. 7). Portanto, todos os métodos utilizados confirmam que todas as amostras analisadas dos criadouros de canário-da-terra pertencem a espécie *S. flaveola*.

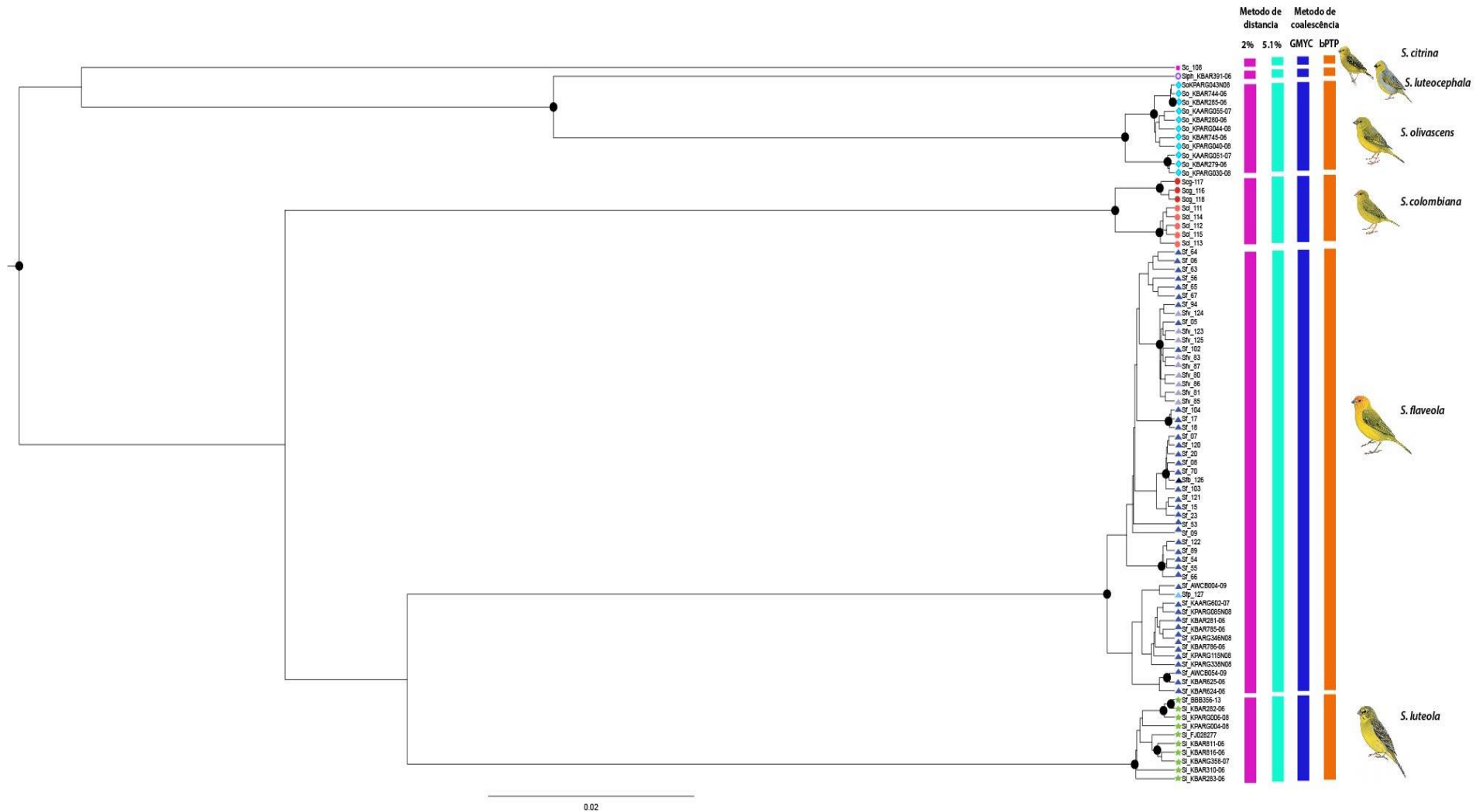
Em adição, além da identificação das espécies, foi possível observar uma subestruturação dentro dos clados de *S. columbiana* e *S. flaveola*, que podem estar associados as subespécies, já que incluem as amostras que representam os *vouchers* obtidos no MZUSP, as quais foram identificadas por ornitólogos especialistas. Os subclados da espécie *S. columbiana* parecem corresponder a *S. columbiana leopoldinae* e *S. columbiana goeldii*, e os clados da espécie *S. flaveola* parecem corresponder a *S. f. valida*, *S. f. brasiliensis* e *S. f. pelzeni*.

Apesar de todas as amostras coletadas nos criadouros pertencerem a espécie *S. flaveola*, se considerarmos a subestruturação das subespécies, nossas amostras correspondem a pelo menos duas subespécies identificadas *S. f. valida* e *S. f. brasiliensis*, suportadas com probabilidade posterior maior que 90%. Quando correlacionamos a amostragem utilizada para a delimitação das espécies com criadouros analisados, observamos a presença de mais de uma subespécie nos criadouros 1, 6 e 8 (Fig. 8).

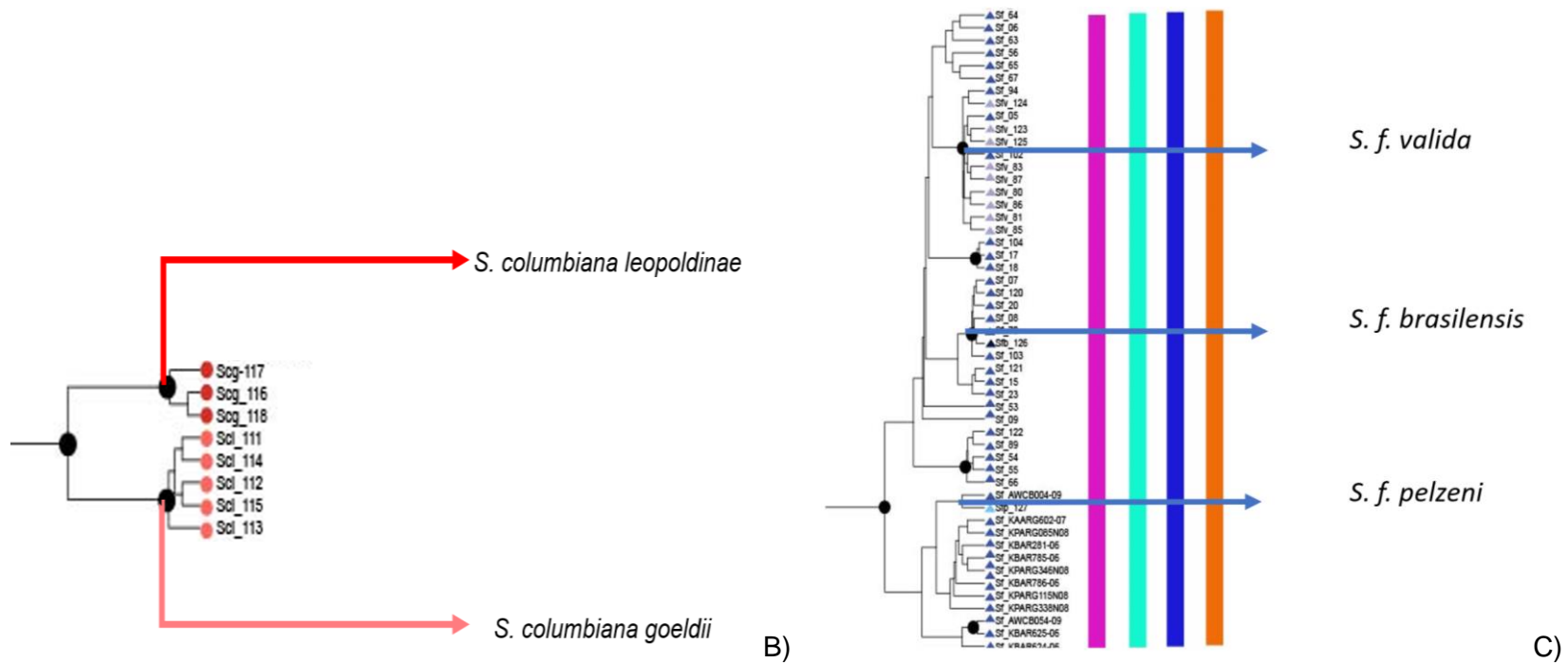
Além da possível mistura de subespécies nos criadouros, também haveria incongruência com os cadastros da subespécie do SISPASS e as amostras

analisadas considerando que todas as amostras coletadas estão cadastradas como *S. f. brasiliensis* e nossas análises revelam pelo menos duas subespécies na amostragem (Fig. 8).

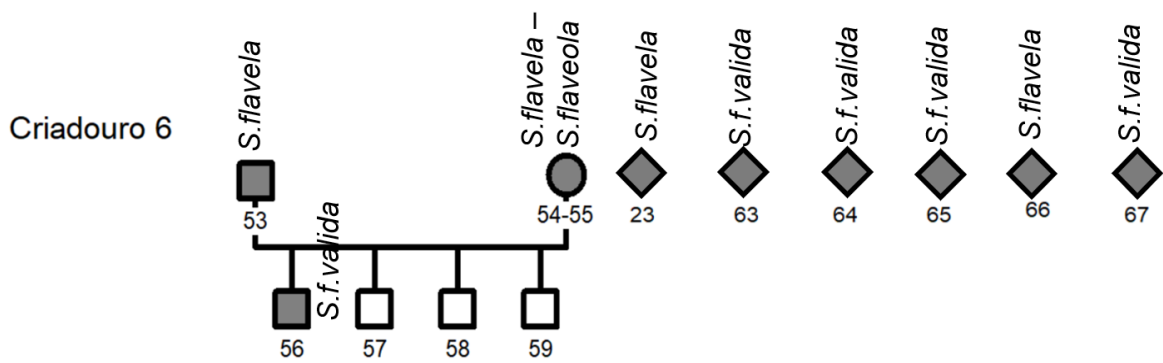
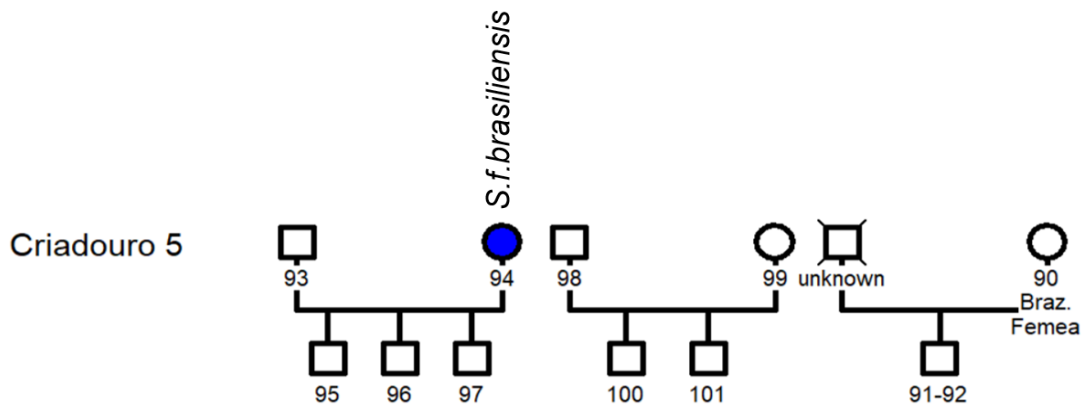
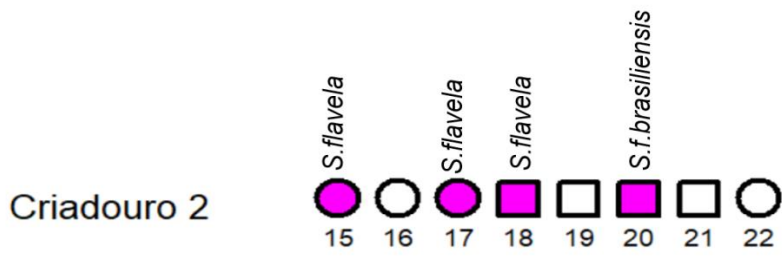
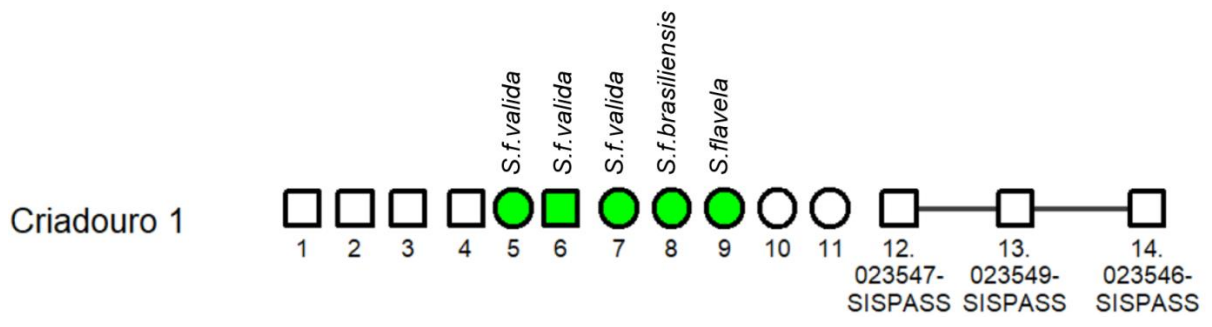
Na espécie *S. flaveola*, nós hipotetizamos que a subestruturação represente as subespécies, mas não é possível descartar que também represente uma estruturação espacial devido a que se mostram dos clados entre as amostras de coletadas no Brasil e as amostras de das bases de dados majoritariamente provenientes da Argentina.



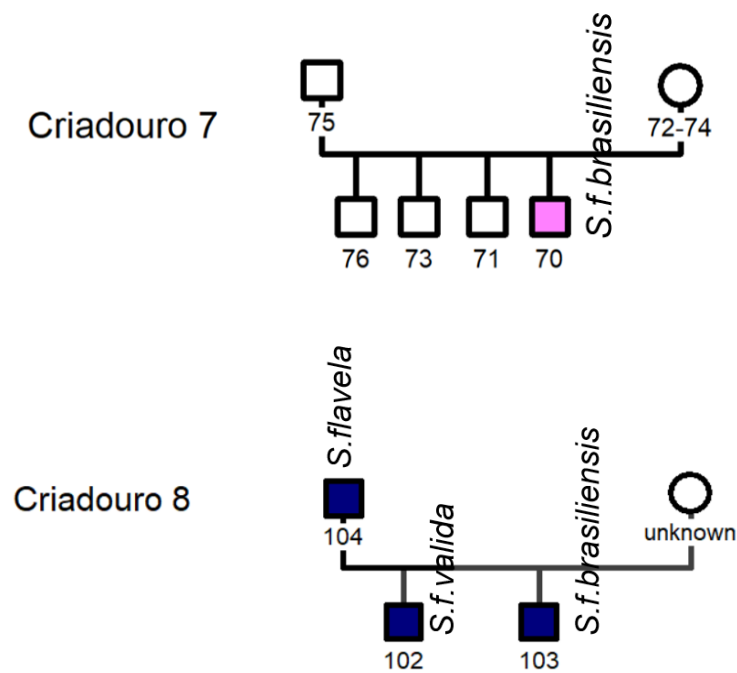
A)



**Figura 7:** Topologia bayesiana estimada a partir do gene mitocondrial COI. Em (A) as barras verticais indicam cada metodologia utilizada a delimitação molecular de espécies. Apenas probabilidades maiores que 90% foram representadas com um círculo preto nos nós. Topologia construída com sequências dos bancos de dados e as sequências produzidas neste trabalho. Em (B) destacamos somente o clado de *S. colombiana*, mostrando dois suclados que podem representar as subespécies *S. colombiana leopoldinae* e *S. colombiana goeldii*. Em (C), destacamos o clado de *S. flaveola* e seus subclados *S. f. valida*, *S. f. brasiliensis* e *S. f. pelzeni*

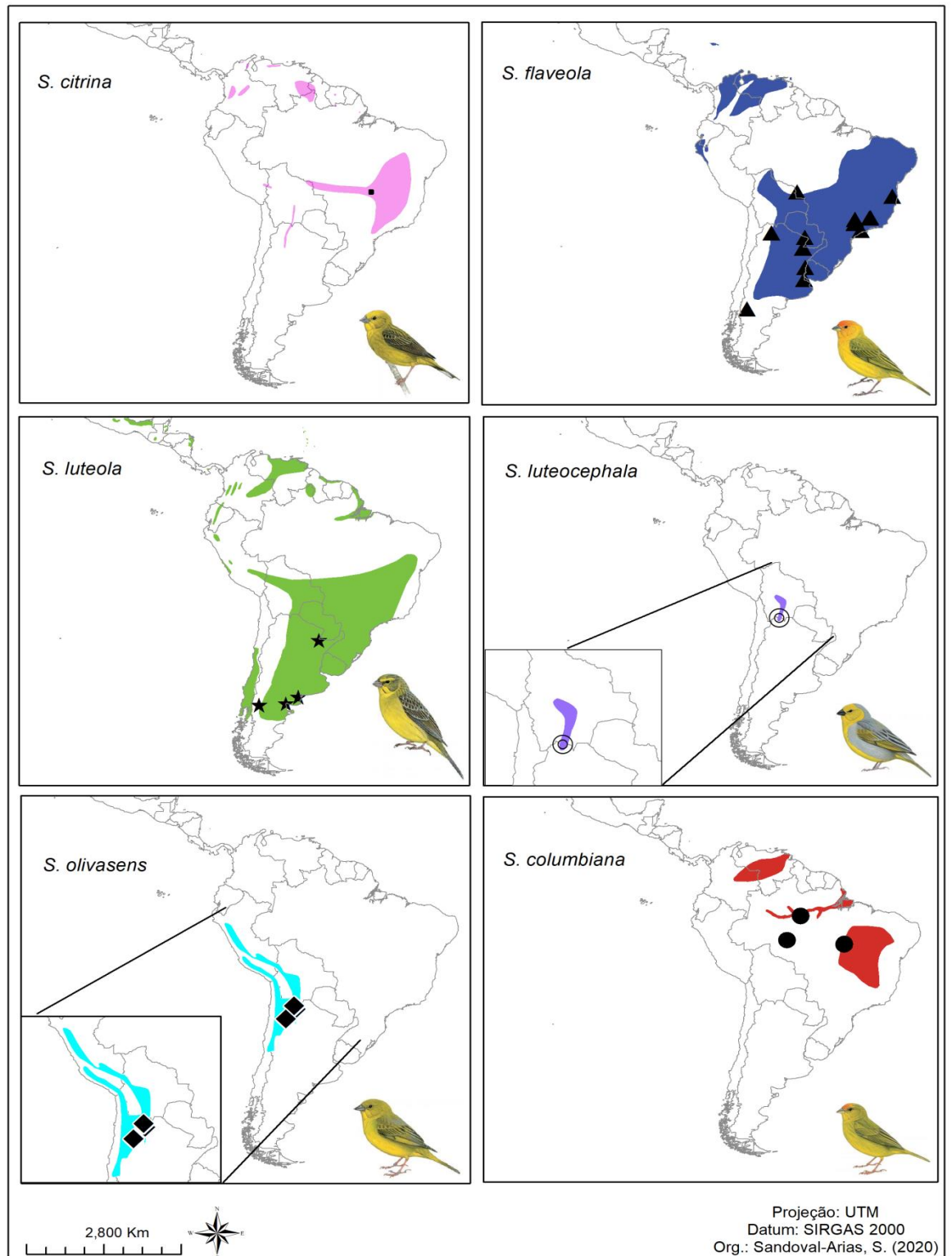






**Figura 8:** Heredograma das amostras por criadouro. Cada criadouro está representado com uma numeração. As amostras com cor representam as amostras dos criadouros utilizadas na delimitação de espécies. Cada sexo está mostrado com o símbolo, o círculo representa fêmea e o quadrado macho. As amostras com X no meio não estavam disponíveis para coleta e os triângulos representam sexos desconhecidos.

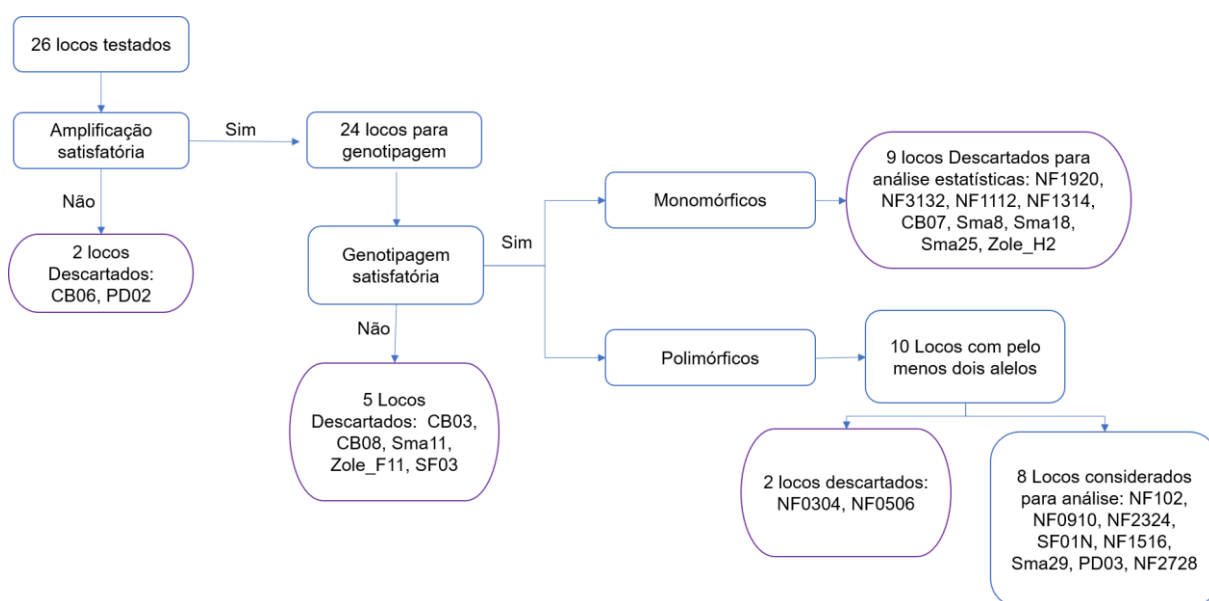
A maioria das sequências analisadas (incluindo as de referência e as coletadas no Brasil) estão distribuídas dentro da área de ocorrência descrita no *Handbook of the Birds of the World (2020)*, porém duas amostras (uma de *S. columbiana* e uma de *S. flaveola*) estão fora desta área (Fig. 9). Amostras da base de dados e do MZUSP que não possuíam coordenadas geográficas não foram incluídas na figura 9, exceto a única amostra de *S. citrina* que foi colocada simbolicamente por ser um único espécime. Não é possível observar os 81 espécimes pois há sobreposição de amostragem.



**Figura 9:** Distribuição da amostragem utilizado em sobreposição as áreas de ocorrência de cada espécie descritas pelo *Handbook of the Birds of the World*. As cores representam as zonas de ocorrência e cada símbolos representa uma espécie indicada com a mesma simbologia utilizada na topologia bayesiana.

### 6.3 Transferabilidade de locos microssatélites heterólogos e Análise de diversidade genética e parentesco

*Testes de transferabilidade:* Após realizar múltiplos testes avaliando diferentes condições de temperatura (incluindo o *touchdown*), concentração de  $MgCl_2$ , concentração de DNA, tempos de anelamento e/ou extensão e diferentes fluorescências foi possível a amplificação e a genotipagem de dez locos polimórficos de microssatélites na maioria das amostras de *Sicalis flaveola*. Dos dez locos obtidos, dois foram descartados para as análises pois apresentaram os mesmos dois alelos para todas as amostras (NF0304, NF0506), um loco apresentou alelos nulos (NF2324) e sete foram utilizadas nas demais análises. A figura 10 mostra os resultados dos testes de transferabilidade para os 26 microssatélites heterólogos.



**Figura 10.** Fluxograma dos testes de transferabilidade dos 26 STRs em *Sicalis flaveola*.

Os parâmetros para a padronização da amplificação para cada loco amplificado com sucesso e a confirmação do *motif* estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre as condições descritas no artigo (valores teóricos) e as otimizadas para a amplificação de cada loco heterólogo transferido para a espécie *S. flaveola*, confirmação do motif e range dos alelos obtidos.

	Loco	Sequência do <i>primer</i> (5'→ 3')	Ta (°C) Teórico	Ta (°C) em <i>S. flaveola</i>	Fluoróforo	<i>Motif</i> Teórico	<i>Motif</i> confirmado	<i>Range</i> Teórico	<i>Range</i> em <i>S. flaveola</i>
1	NF102	F:TACCCTGCTTTGCTGTGCTA R:TCCAGTCTCCCTTTAAGCCC	54	60	Ned	(CT)8	(CT)9	213-221	104-242
2	NF0910	F:CAGTCTGCACTTCCTCCACA R:GGGTGTAGCTGGACACACATT	54	60	Pet	(CAA)6	(CAA)5	139-142	150-156
3	NF1920	F:TTCAGTGCCAGGCTTAATGA R:TGCTTAAACAGCCTCTCCGT	52	52	Fam	(TATT)4	-	358-406	250*
4	NF3132	F:TCCTCATTCAGCATTACCTC R:CGGGTACAAAGGGGATACAA	54	52	Ned	(CA)6	(CA)6	248	264-266
5	NF1112	F:ATGTTTCTGGCACTGAACGG R:GGGGATTACGATGGTGTTA	54	54	Pet	(AT)12	-	302-358	160*
6	NF0304	F:TACCCTGCTTTGCTGTGCTA R:TCCAGTCTCCCTTTAAGCCC	58 → 52	56	Pet	(CCT)5	(CCT)5	208-220	223-250
7	NF2324	F:TGAAAAGCCCAATTAACCAA R:CTGTGGAGGGAAGCTGAAAC	54	52	Fam	(CA)6	(CA)5	358	368-376
8	NF0506	F:CATACCCATGAGTGCCTGAC R:GAGCAGAGCAGAGCTTGGAT	52	60	Vic	(GGTTT)9	(GGTTT)7	257-287	287-296
9	NF1314	F:TGGGAGAGAAAGTTGGTTAAT R:CTGATCTGGCCAAAGGACTA	54	54	Vic	(AAT)5	-	250-256	262-264
10	NF2728	F:CAGGTGTCTCCACCACACAG R:AAGGAAATGGGAATGAAGATCA	52	52	Vic	(GT)6	(GT)5	228-230	266-268
11	SF01N	F:TGACTCTGTCAGGTCTGTCT R:ATGCAGCAAAGTCCATACCC	61	52	Fam	Dinucleotídeo	-	285-287	307-309
12	CB07	F:CGCTTCATCCATCCAT R:GACATGAGAGGACACAATGC	61	60	Vic	Tetranucleotídeo	-	191-291	96*
13	CB03	F:AAGAAGGACATGAGCGCACAGA R:TGGTTCCTGTTGGCAATCCTGA	67	52	Fam	Tetranucleotídeo	-	305-389	182-202
14	CB08	F:TCAGCAACAGTATGAGGGCAGT R:AGGCTTGTGCAGGTGTCATT	66	50	Pet	Tetranucleotídeo	(CCA)5	146-170	146-150
15	CB06	F:AGTCCTGTTCTCCACAGAT R:TCGCACAGATTGAGGGACAGAT	63	Não Amplifica	-	Dinucleotídeo	-	163-165	-
16	NF1516	F:GTGGCTGTGGATGCTCCT R:GGATGAGAGCACATTTGGGT	54	52	Vic	(TCC)7	-	100-106	96-109
17	SAM8	F:TGGAAATTTGCTCTCTGTGGC R:GTCTACTGCCGCTCTCATTG	63.1	52	Pet	(AT)21	(AT)9	296-316	151*
18	SAM11	F:TGAAATTGAACCATCCAGTGCC R:ACCATAGTTCATTGCTTCCAG	63.1	58	Pet	(AC)15	-	232-244	104*

19	SAM18	F: GTGGCTTAGAGAGGTATGTCAG R: TTCCTCTCTGATGGCACTGG	65	60	Vic	(AAT)15	-	315-336	94*
20	SAM25	F: CTGTAGAAGAAGCTGCCAG R: ACACTCTCACACAGCTTTGC	63.3	58	Vic	(AC)14	(CT)10	220-258	151*
21	SAM29	F: CAAACAGGGCAAAGGGTGAC R: TCAGCCTCGAGTTAACAC	63.3	60	Vic	(AC)14	(GT)9	164-202	201-213
22	PD02	F: ATGAAGTCCACCTGTCAATGCAGC R: TGTGCTCTCAGACCCATATTACA	66	62	Fam	Tetranucleotídeo	(TATC)8	220-264 226-270	151*
23	PD03	F: AGCTGTAATCCTCCTCCCACAACA R: CAACAGCTCTTGCACTTGGA	64	60	Fam	Tetranucleotídeo	(GATA)4	321-405	323-347
24	SF03	F: CGCTTCATCCATCCAT R: GACATGAGAGGACACAATGC	63	60	Fam	Dinucleotídeo	-	136-208	174-186
25	Zole_H2	F: ACTGTTCTTTTCTCCACCCAC R: GGTTGAATCCCAGGTGGAAAC	59	52	Pet	(GAGT)14, (GACT)7	-	254-266	174*
26	Zole_F11	F: ACTGTAGCCATCTCATTAGCC R: GAGAGAAAGCAAGAAAGCAAGC	59	52	Fam	(CT)11	-	230-270	324-332

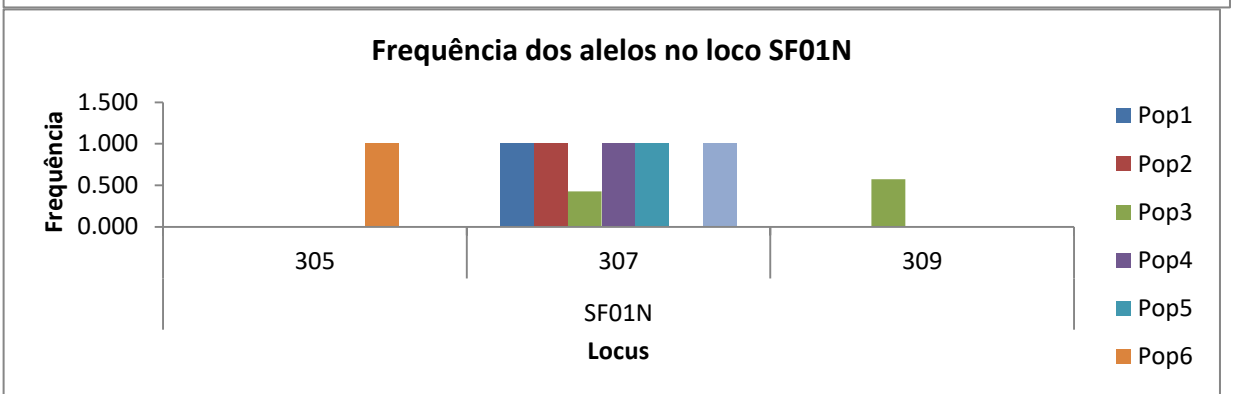
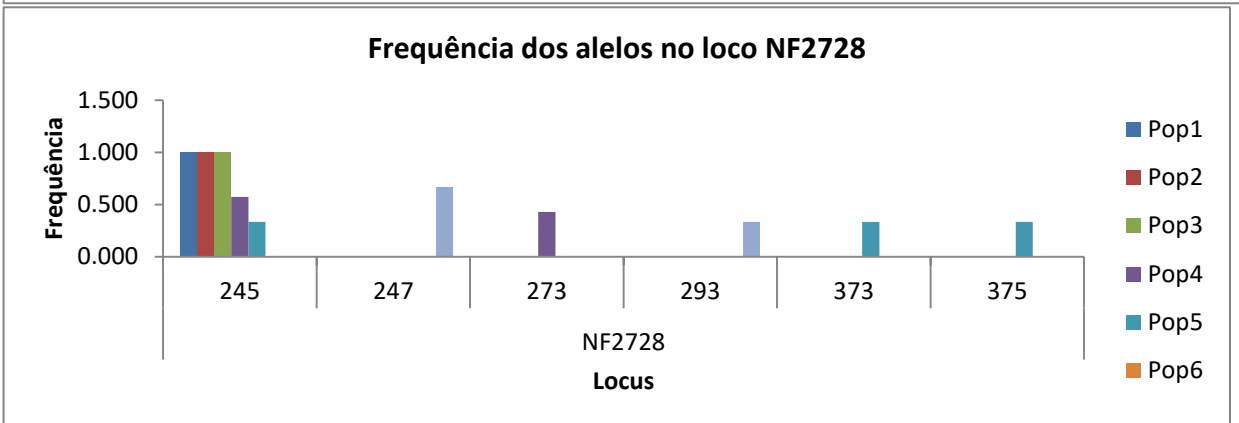
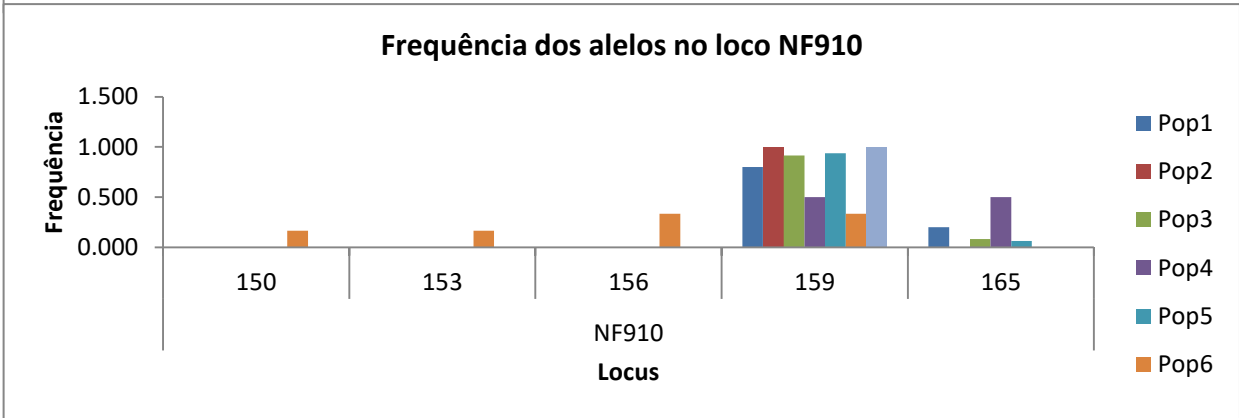
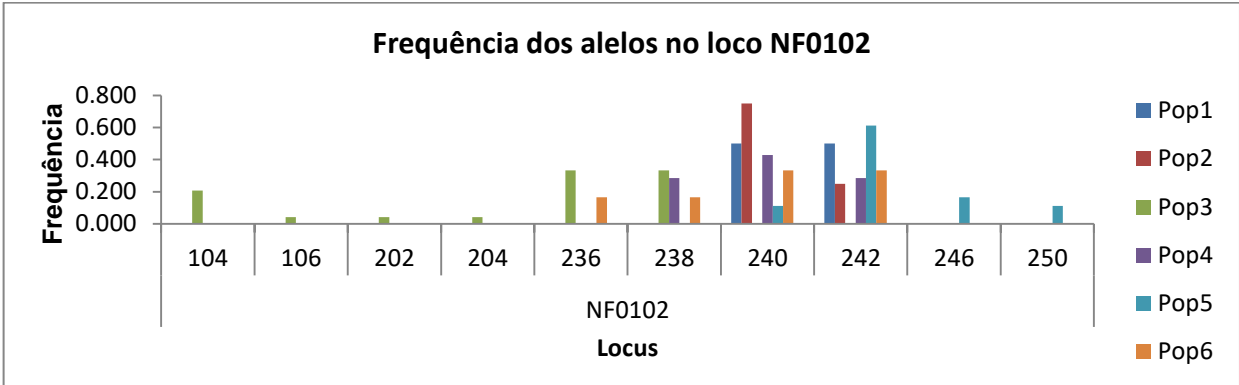
Nota: As siglas correspondem a: Melhores temperaturas de annealing na PCR em graus centígrados ( $T_a$  °C), padrão de repetições das sequências (motif), o hífen corresponde aos dados não presentes no artigo ou não obtidos em nossa análise e tamanho dos alelos em pares de bases (Range) com os locos monomórficos sinalizados com asterisco (\*).

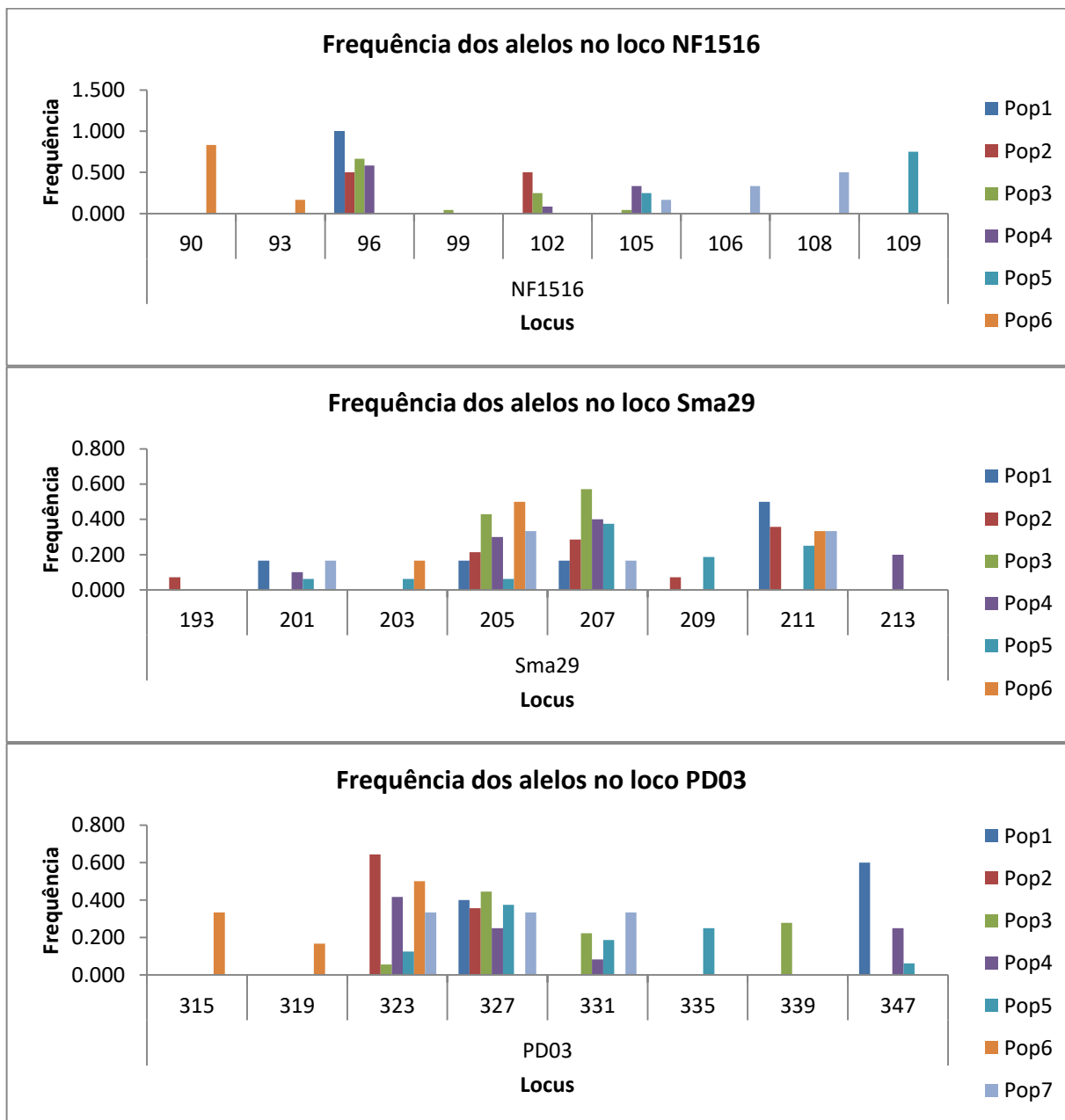
*Análise descritiva da diversidade genética nos criadouros:* As análises de diversidade considerando 45 indivíduos distribuídos nos oito criadouros amostrados, mostraram que os sete locos de microssatélites (NF102, NF0910, NF2728, SF01N, NF1516, Sma29, PD03) apresentaram de três a dez alelos (Tabela 5) com uma média de 7,286 alelos. A heterozigosidade observada em cada loco variou de 0,002 (SF01N) a 0,750 (PD03), com média entre todos os locos de 0,417. A heterozigosidade esperada em cada loco variou de 0,307 (NF910) a 0,811 (NF0102), com média entre todos os locos de 0,087 (Tabela 5). Três locos (NF0102, NF0910, NF2728, SF01N) foram considerados razoavelmente informativos ( $0,25 < PIC < 0,5$ ) e quatro muito informativos ( $PIC > 0,5$ ) (Tabela 5). As frequências dos alelos em cada criadouro estão descritas na figura 11.

Tabela 5. Estimativas de diversidade genética dos indivíduos cativos de *S. flaveola* baseada em sete locos de microssatélites.

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	PIC
NF0102	37	10	5,286	0,649	0,811	0,785
NF0910	42	5	1,444	0,310	0,307	0,283
NF2728	33	6	1,699	0,182	0,411	0,394
SF01N	37	3	1,480	0,002	0,324	0,300
NF1516	38	9	3,442	0,289	0,709	0,682
Sma29	35	10	4,487	0,743	0,777	0,745
PD03	40	8	4,585	0,750	0,782	0,752
MÉDIA	37,429	7,286	3,203	0,417	0,589	0,5631
SE	1,131	1,017	0,623	0,112	0,087	

Nota: As siglas correspondem a: Número de indivíduos (N), número de alelos (Na), número de alelos efetivo (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC).





**Figura 11.** Frequência de cada alelo por loco em cada grupo familiar. Cada família está representada como pop e por uma cor .

As análises de parentesco considerando os 45 indivíduos distribuídos nos oito criadouros amostrados, mostraram que a probabilidade de exclusão é maior que a probabilidade de não exclusão ou identificação. A média entre todos os locos para a exclusão P1 foi de 68% e para P2 foi de 53%, por outra parte a probabilidade de não exclusão em NE-P1 foi de 10%, para NE-P2 foi de 1,68% e para NE-PP não é possível a identificação de ambos pais em conjunto com nosso painel de microssatélites



Tabela 6. Probabilidades máximas de exclusão e probabilidade de não-exclusão por loco para o painel de microssatélites utilizado considerando todas as amostras analisadas dos criadouros.

Locos	Probabilidade de exclusão (GenAlex)			Probabilidade de não exclusão (Cervus)		
	N	P1	P2	NE-1P	NE-2P	NE-PP
NF0102	45	0,795	0,657	0,546	0,371	0,19
NF910	45	0,595	0,416	0,952	0,843	0,731
NF2728	45	0,660	0,486	0,907	0,754	0,587
SF01N	45	0,370	0,222	0,947	0,832	0,714
NF1516	45	0,772	0,626	0,675	0,489	0,282
Sma29	45	0,795	0,657	0,601	0,424	0,237
PD03	45	0,743	0,588	0,594	0,415	0,228
MEDIA	45	0,680	0,520	0,1075	0,0168	0,0008

Número de indivíduos (N), probabilidade de exclusão quando ambos parentais são conhecidos, (P1) e probabilidade de exclusão quando um dos pais é desconhecido (P2) calculadas no software GenAlex,. Probabilidade de identificar um progenitor quando um deles é conhecido (NE-1P), probabilidade de identificar um progenitor quando o outro é desconhecido (NE-2P) e identificação do pai e mãe em conjunto quando nenhum é conhecido (NE-PP) calculadas no software Cervus (em cor azul).

A probabilidade de exclusão quando pelo menos um dos pais é conhecido é maior com o aumento da quantidade de locos utilizados, obtendo um valor máximo de 3,7E-01 nas famílias dos criadouros cinco e sete e um mínimo de 1,9E-01 nas famílias do criadouro três, quatro e seis. O valor da probabilidade máxima de exclusão também aumenta quando os genótipos de ambos pais são conhecidos em relação a quando falta o genótipo de um dos pais (Tabela 7).

Tabela 7. Probabilidade máxima de exclusão estimada no GenAlex 6.5, para cada criadouro com cada loco quando os genótipos de ambos os pais são conhecidos (P1) e na ausência do genótipo de um dos pais (P2).

C	N	NF102		NF0910		NF2728	
		P1	P2	P1	P2	P1	P2
3	5	1,9E-01	1,3E-01	1,9E-01	1,3E-01	0,0E+00	0,0E+00
4	4	1,9E-01	1,3E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
6	7	1,9E-01	1,3E-01	1,9E-01	1,3E-01	0,0E+00	0,0E+00
7	7	3,7E-01	2,2E-01	1,9E-01	1,3E-01	1,9E-01	1,3E-01
5	9	3,7E-01	2,2E-01	1,9E-01	1,3E-01	0,0E+00	0,0E+00

		SF01N		NF1516		Sma29		PD03	
C	N	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
3	5	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	5,0E-01	3,3E-01	1,9E-01	1,3E-01
4	4	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-01	1,3E-01	5,0E-01	3,3E-01	1,9E-01	1,3E-01
6	7	1,9E-01	1,3E-01	5,0E-01	3,3E-01	1,9E-01	1,3E-01	3,7E-01	2,2E-01
7	7	0,0E+00	0,0E+00	3,7E-01	2,2E-01	5,0E-01	3,3E-01	6,0E-01	4,2E-01
5	9	0,0E+00	0,0E+00	1,9E-01	1,3E-01	6,6E-01	4,9E-01	6,0E-01	4,2E-01

Nota: As siglas correspondem a criadouro (C), número de amostras analisadas (N). Os locos estão localizados na parte superior da tabela, probabilidade máxima de exclusão quando os genótipos de ambos pais são conhecidos (P1), probabilidade máxima de exclusão quando um dos pais (P2) (Tabela 7).

As análises de IR (Tabela 8) confirmam que os locos são altamente homozigotos, com valores próximos a um ou incluso um. Indivíduos provenientes de endocruzamento confirmado (Indivíduo 44 do Criadouro 4) apresentam valores perto do valor máximo (valor obtido=0,77, valor máximo=1) obtendo quando todos os locos são homozigotos independentemente da frequência alélica. Dos 45 indivíduos avaliados só 5 (42, 53, 71, 74 e 75) apresentam valores negativos mostrando maior heterozigosidade para os locos analisados em relação as outras amostras.

Tabela 8. Valor de IR.

ID	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL
5	0,429	1,228	0,647	0,510	0,571
6	0,286	0,819	0,432	0,664	0,755
7	0,143	0,409	0,216	0,818	0,820
23	0,286	0,819	0,432	0,552	0,645
29	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000
30	0,429	1,228	0,647	0,300	0,571
31	0,143	0,409	0,216	0,750	0,825
32	0,286	0,819	0,432	0,537	0,747
36	0,429	1,228	0,647	0,248	0,469
41	0,286	0,819	0,432	0,481	0,644
43	0,286	0,819	0,432	0,496	0,657
42	0,571	1,638	0,863	-0,008	0,302
45	0,286	0,819	0,432	0,525	0,649
44	0,143	0,409	0,216	0,772	0,824
53	0,714	2,047	1,079	-0,111	0,224
54	0,429	1,228	0,647	0,313	0,478
55	0,143	0,409	0,216	0,798	0,820
56	0,286	0,819	0,432	0,564	0,644
57	0,286	0,819	0,432	0,572	0,645
58	0,286	0,819	0,432	0,595	0,644

59	0,571	1,638	0,863	0,194	0,391
70	0,429	1,228	0,647	0,308	0,566
71	0,714	2,047	1,079	-0,072	0,271
72	0,571	1,638	0,863	0,129	0,447
73	0,571	1,638	0,863	0,166	0,447
74	0,857	2,457	1,295	-0,210	0,104
75	0,714	2,047	1,079	-0,096	0,271
76	0,429	1,228	0,647	0,408	0,532
93	0,429	1,228	0,647	0,435	0,571
94	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000
95	0,286	0,819	0,432	0,576	0,649
96	0,143	0,409	0,216	0,799	0,825
97	0,286	0,819	0,432	0,593	0,649
98	0,571	1,638	0,863	0,112	0,302
99	0,429	1,228	0,647	0,379	0,469
99	0,429	1,228	0,647	0,379	0,469
100	0,143	0,409	0,216	0,762	0,833
101	0,429	1,228	0,647	0,329	0,469
66	0,286	0,819	0,432	0,564	0,644
63	0,286	0,819	0,432	0,556	0,649
64	0,143	0,409	0,216	0,782	0,825
65	0,286	0,819	0,432	0,570	0,652
104	0,286	0,819	0,432	0,640	0,657
102	0,143	0,409	0,216	0,798	0,825
103	0,143	0,409	0,216	0,798	0,825

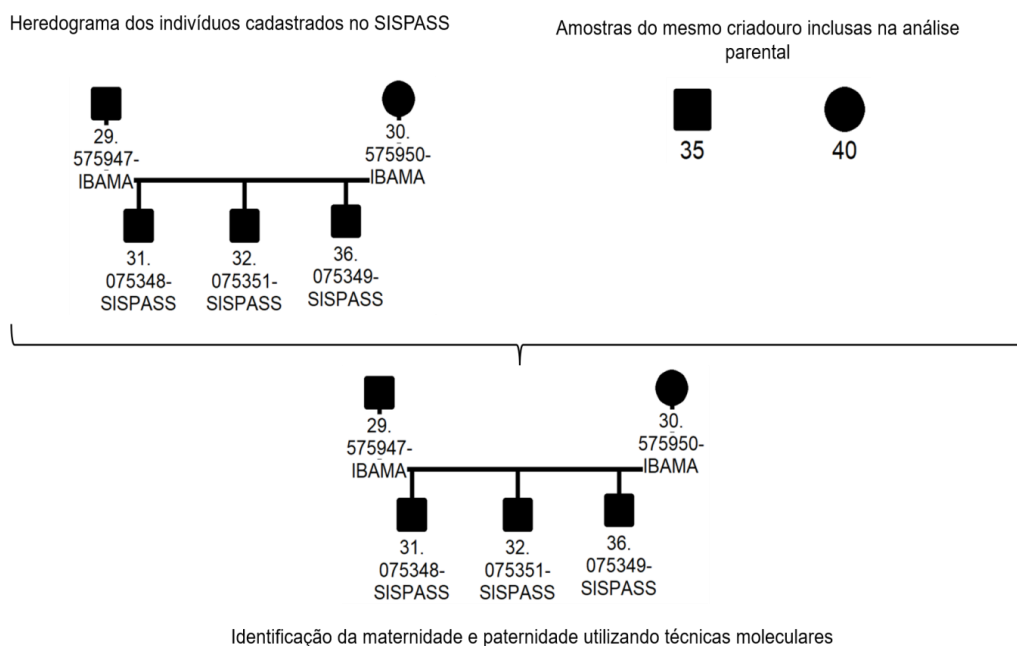
Nota: As siglas correspondem a proporção de loci heterozigotos em um indivíduo (PHt), heterozigosidade padronizada com base na heterozigosidade média observada (Hs\_obs), heterozigosidade padronizada com base na heterozigosidade média esperada (Hs\_exp), relação interna (IR) e homozigosidade por locus (HL).

#### *Análise de parentesco por família:*

*Família 1:* Foram consideradas sete amostras do criadouro 3 (29, 30, 31, 32, 36, 35 e 40 (Fig. 12) para as análises de parentesco, ambas análises com sete locos. A média para NE-1P foi de 0,345, para NE-2P foi de 0,117 e para NE-PP foi de 0,0275.

As análises de maternidade e paternidade identificaram, respectivamente, as amostras 30 e 29 como melhores candidatos (Figura 12). Para o filho 32 as identificações foram obtidas com o nível de confiança relaxado considerando as comparações pareadas e triadas. Os mesmos pais foram identificados para os filhos

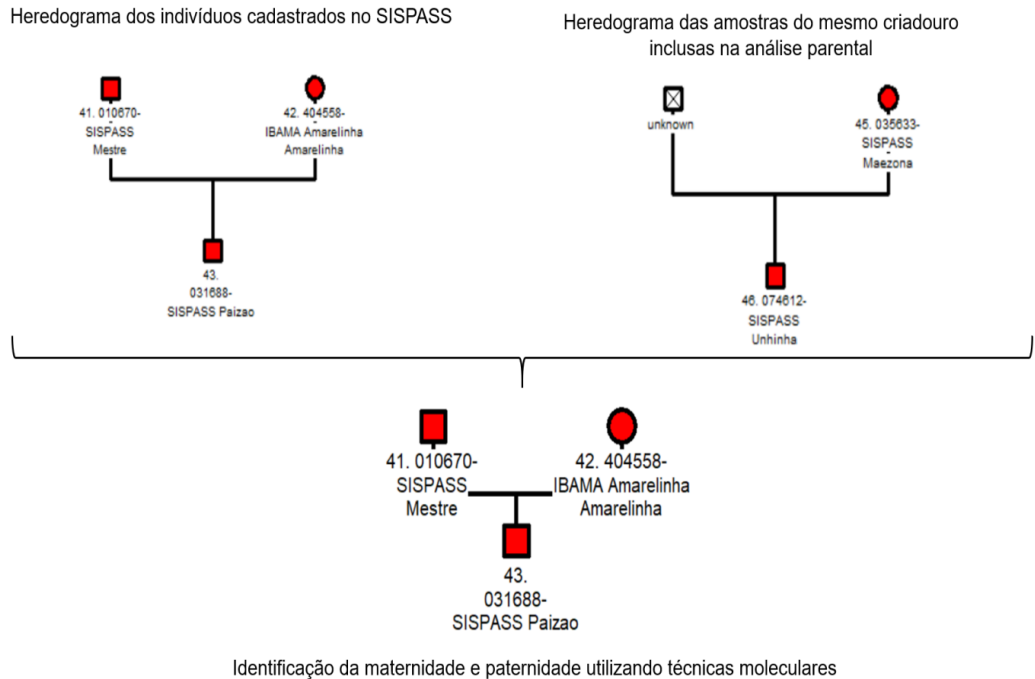
31 e 36 com um nível de confiança menor ou igual a 80% (Apêndice 4). Os resultados são concordantes com a informação cadastrada no SISPASS



**Figura 12.** Heredograma da família 1 localizada no Criadouro 3. Os machos estão representados por quadrados e as fêmeas representadas por círculos. As amostras com cor preto foram utilizadas para a análise.

*Família 2:* Foram consideradas cinco amostras para as análises de parentesco (41, 42, 43, 45 e 46), ambas com sete locos. A média para NE-1P foi de 0,309; para NE-2P foi de 0,116 e para NE-PP foi de 0,028.

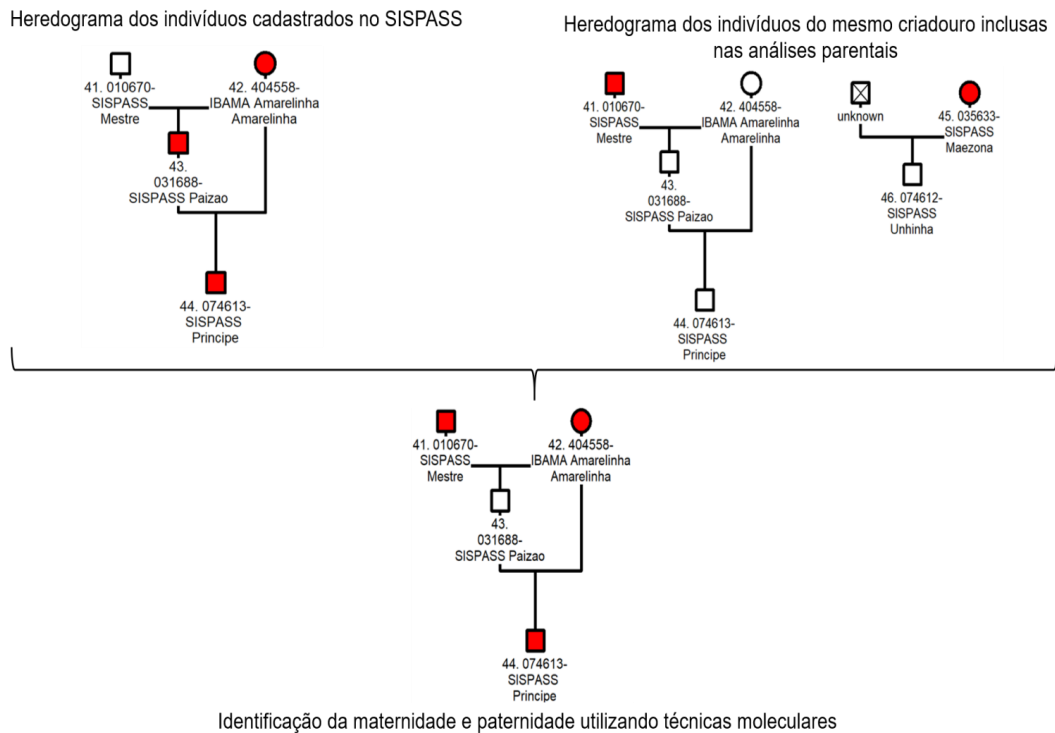
As análises de maternidade e paternidade identificaram respectivamente as amostras 42 e 41 como melhores candidatos (Fig 13), o resultado é concordante com a informação cadastrada no SISPASS. As identificações foram obtidas com o nível de confiança relaxado considerando as comparações pareadas e triadas na maternidade e nas comparações em trio para a paternidade (Apêndice 4).



**Figura 13.** Heredograma da família 2 localizada no Criadouro 4. Os machos estão representados por quadrados, as fêmeas representadas por círculos e as amostras com X no meio não estavam disponíveis para coleta. As amostras com cor vermelha foram utilizadas para a análise.

*Família 3:* Foram consideradas 5 amostras (41, 42, 43, 44 e 45) com sete locos, das quais tem cruzamentos consanguíneos entre as amostras 42 e 43. A média para NE-1P foi de 0,462; para NE-2P foi de 0,261 e para NE-PP foi de 0,112.

As análises de maternidade sugerem a amostra 42 como possível mãe concordante com o nível de confiança relaxado, este dado é concordante com o cadastro do SISPASS (Apêndice 4). O teste de paternidade não concordou com o cadastro SISPASS, pois a amostra cadastrada como pai é a 43 e a indicada pela análise é a 41 com um nível de confiança relaxado (Apêndice 4).

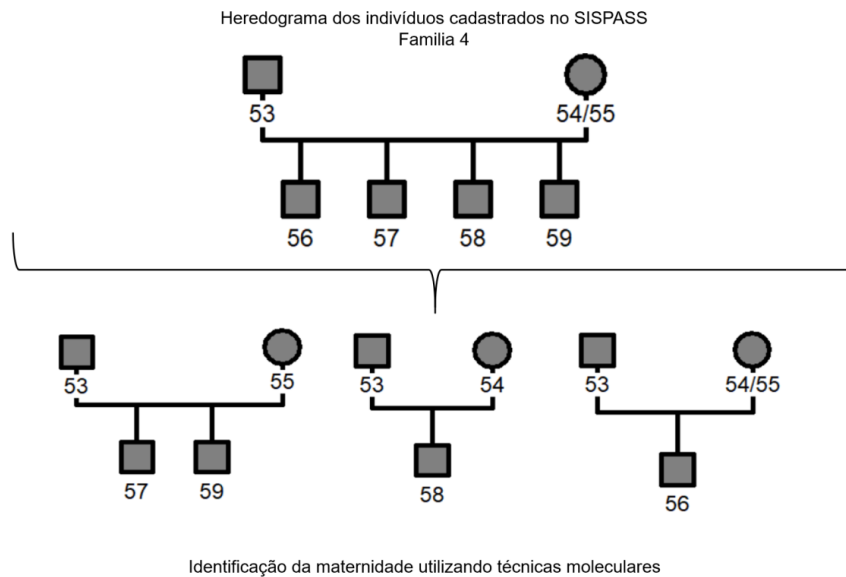


**Figura 14.** Heredograma da família 3 localizada no Criadouro 4. Os machos estão representados por quadrados, as fêmeas representadas por círculos e as amostras com X no meio não estavam disponíveis para coleta. As amostras com cor vermelha foram utilizadas para a análise.

*Família 4:* Foram consideradas 7 amostras do criadouro 6 (53, 54, 55, 56, 57, 58 e 59) com sete locos. A média para NE-1P foi de 0,424, para NE-2P foi de 0,205 e para NE-PP foi de 0,0762.

As análises de maternidade sugerem a amostra 55 como possível mãe das amostras 57 e 59, por outra parte a amostra 58 é uma possível mãe da amostra 54. A análise com o filho 56 não discrimina entre as duas possíveis mães (54 e 55). Os resultados não diferem dos cadastros do SISPASS, mas discriminam de forma mais assertiva qual mãe é a mais provável para as amostras 57, 58 e 59 (Fig.15)

Os valores de confiança mostrados (Apêndice 4 e 5), são calculados exclusivamente quando utilizamos o cálculo do valor estatístico *LOD Score*, mostrando um grau de confiança menor ao 80%. Os valores do confiança para o *Delta Score* (Apêndice 6) não são calculados porque somente com *LOD Scores* positivos e com valores maiores que zero é possível o cálculo.

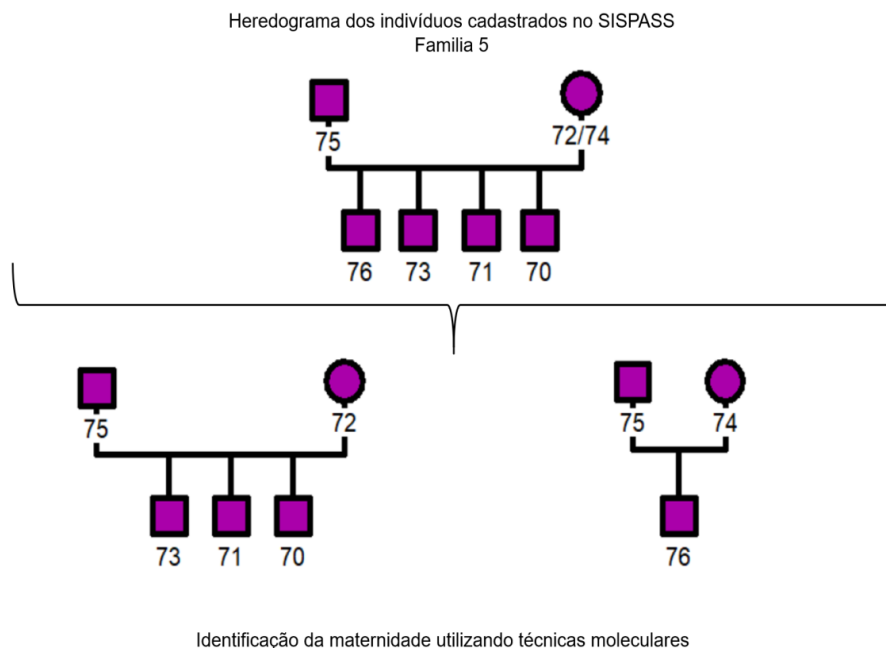


**Figura 15.** Heredograma da família 4 localizada no Criadouro 6. Cada sexo está mostrado com o símbolo, o círculo representa fêmea e o quadrado macho. As amostras com cor cinza foram utilizadas para a análise.

*Família 5:* Foram consideradas 7 amostras do criadouro 7 (70, 71, 72, 73, 74, 75, 76) com sete locos. A média para NE-1P foi de 0,275, para NE-2P foi de 0,0982 e para NE-PP foi de 0,0231.

As análises de maternidade sugerem a amostra 72 como possível mãe das amostras 70, 71 e 73, por outra parte a amostra 76 tem como possível mãe a amostra 74 (Fig.16). Os resultados não diferem dos cadastros do SISPASS, mas discriminam de forma mais assertiva qual mãe e a mais provável para cada filhote.

Todos as identificações foram obtidas com um grau de confiança menor ao 80% utilizando, o cálculo pareado e triado exceto a maternidade identificada da amostra 72 com a amostra 70 com o grau de confiança maior ao 80% porém menor que o 95% (Apêndice 4 e 5). Quando calculamos o grau de confiança utilizando o Delta score (Apêndice 6) a maternidade da amostra 72 identificada para os filhos 70 e 71 apresenta graus de confiança menor ao 80% para os valores pareados e em trio, mostrando uma probabilidade ainda maior que a calculado no LOD Score da mãe identificada ser a mãe verdadeira nessas amostras.



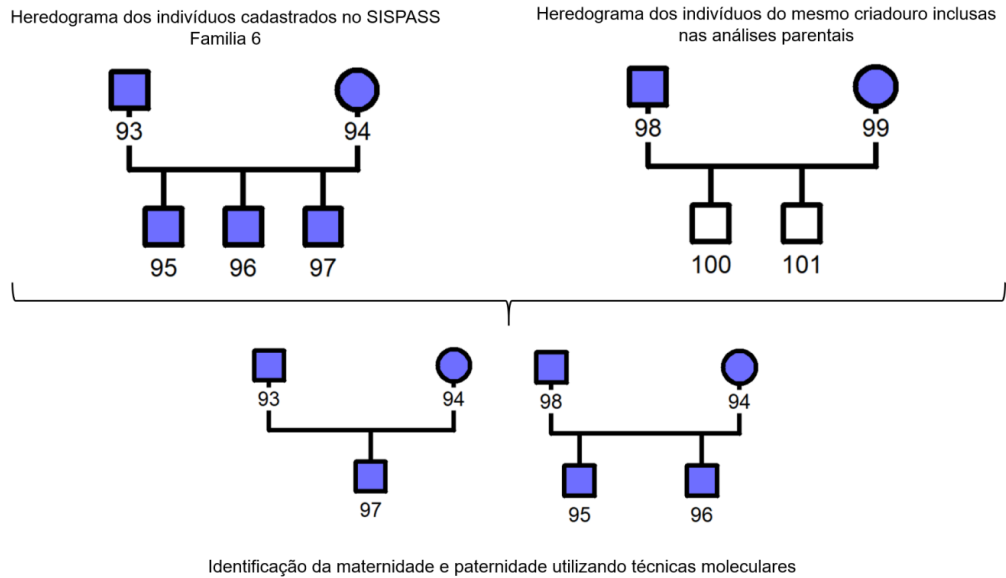
**Figura 16.** Heredograma da família 5 localizada no Criadouro 7. Os machos estão representados por quadrados e as fêmeas representadas por círculos. As amostras com cor roxa foram utilizadas para a análise.

*Família 6:* Foram consideradas 7 amostras do criadouro 5 (93, 94, 95, 96 e 97) com seis locos porque o loco NF2728 apresentava dificuldade de genotipagem nos pais.

As análises de maternidade sugerem a amostra 94 como possível mãe das amostras 95, 96 e 97, resultado concordante com os cadastros do SISPASS. Por outra parte a paternidade para o indivíduo 97 foi assignada no indivíduo 93 e nos indivíduos 95 e 96 foi assignada no macho 98; o primeiro resultado de paternidade concorda com o cadastro e os últimos diferem do SISPASS.

Todos as identificações foram obtidas com um grau de confiança menor que 80%, exceto a maternidade do indivíduo 97 que teve um grau de confiança de 80% (Apêndice 4 e 5).



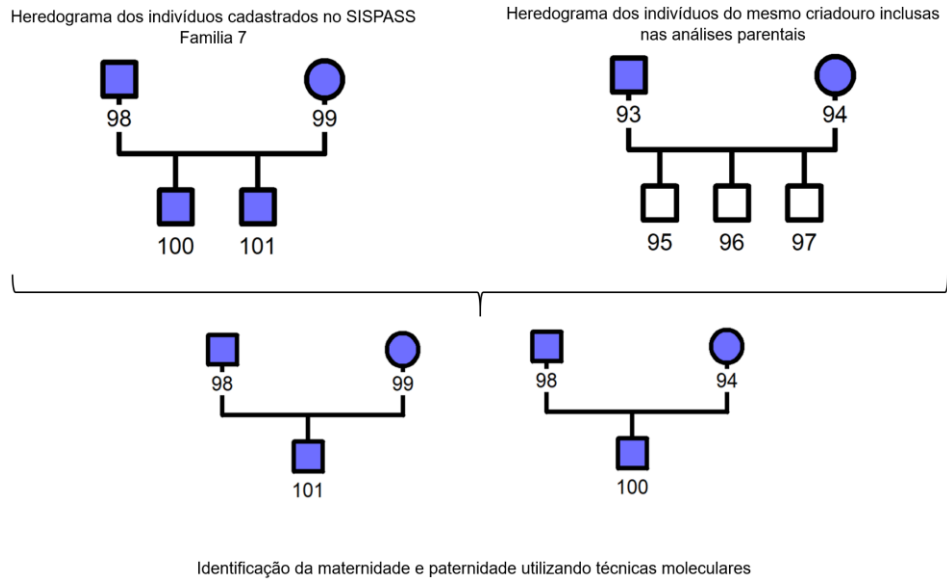


**Figura 17.** Heredograma da família 6 localizada no Criadouro 5. Os machos estão representados por quadrados e as fêmeas representadas por círculos. As amostras com cor azul foram utilizadas para a análise.

*Família 7:* Foram consideradas 6 amostras do criadouro 5 (98, 99, 100, 101, 94 e 93).

As análises de maternidade sugerem o indivíduo 94 como possível mãe da amostra 100, resultado discordante com os cadastros do SISPASS. Por outra parte, a maternidade para o indivíduo 101 foi assignada para a mãe 99, dado concordante com o cadastro SISPASS. A paternidade para ambos filhotes (100 e 101) foi assignada no indivíduo 99, dado que é concordante com os cadastros.

As identificações de maternidade nas comparações pareadas e triadas foram obtidas com um grau de confiança de 80%, e as identificações de paternidade foram obtidas com uma probabilidade de confiança menor ao 80% (Apêndice 4 e 5)..



**Figura 18.** Heredograma da família 7 localizada no Criadouro 5. Os machos estão representados por quadrados e as fêmeas representadas por círculos. As amostras com cor foram utilizadas para a análise.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Análise de identificação da espécie

A identidade das amostras coletadas e identificadas no SISPASS efetivamente corresponde a *S. flaveola*, tarefa analítica central de nosso estudo, uma vez que precisávamos avaliar a presença de espécies crípticas e identificar molecularmente as espécies do gênero *Sicalis*. Só assim poderíamos conduzir a análise de parentesco, pois saberíamos que estávamos tratando da espécie *Sicalis flaveola*.

Os estudos de DNA *Barcoding* são amplamente empregados como uma ferramenta complementar a taxonomia para esclarecer incertezas em casos de plasticidade fenotípica, diferentes estágios de vida, dimorfismo sexual e espécies crípticas (GOLDSTEIN; DESALLE, 2010; HEBERT et al., 2003). Essa abordagem tem como ideia central o fato de que apenas uma pequena porção de um único gene, compreendendo um fragmento de 650 a 700 pb da primeira metade do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI), é capaz de mostrar um valor de variação intraespecífico inferior ao interespecífico (HEBERT; RATNASINGHAM; DEWAARD, 2003) permitindo a diferenciação e identificação das espécies. Esta abordagem vem sendo utilizada com sucesso na conservação das espécies, uma vez que a identificação da biodiversidade representa o ponto de partida para os estudos relacionados à sua avaliação e gestão (ONYIA et al., 2019; REIS et al., 2016).

Na taxonomia aplicada ao grupo das aves, já foram utilizados com muito êxito desde *minibarcodes* da região mitocondrial do gene COI (aproximadamente 134 pb), utilizados para estudos cujo material biológico são amostras degradadas como fezes (JOO; PARK, 2012) ou muito antigas como as amostras de museu (HAJIBABAEI et al., 2006), até *barcodes* maiores de aproximadamente 648 bp (HEBERT et al., 2004). Os *minibarcodes* possuem adequado sucesso de amplificação e o mesmo poder de identificação que o fragmento padronizado para o DNA *barcoding* em aves (DEAGLE et al., 2005; JOO; PARK, 2012; MEUSNIER et al., 2008). Na literatura, é comum a utilização de fragmentos de maior tamanho (GOLDSTEIN; DESALLE, 2010; HEBERT et al., 2003; LIJTMÄER et al., 2012; TIZARD et al., 2019).

O sucesso do DNA *Barcode* na identificação vai além da separação por espécie em algumas pesquisas; embora a técnica não tenha sido projetada para identificar

subespécies, alguns estudos conseguem a separação das subespécies de aves dentro das espécies do mesmo gênero . A diferenciação pode descrever um grupo filogeográfico dentro de uma espécie ou uma subespécie de fato, as quais são frequentemente definidas com base na coerência regional e morfológica. Entretanto, não necessariamente representam unidades genéticas hierárquicas ou evolutivamente distintas, razão pela qual, a combinação de informações taxonômicas, geográficas e migratórias são importantes para complementar as análises moleculares (BAKER; TAVARES; ELBOURNE, 2009)

Nosso trabalho, utilizando 578 pb, identificou seis unidades taxonômicas moleculares, independente da abordagem empregada, congruentes com as seis espécies do gênero *Sicalis* utilizadas, confirmando o poder resolutivo do DNA *barcoding*. O resultado concordante com a identificação morfológica indica que apesar das incertezas taxonômicas descritas para a espécie (INGUI; SILVEIRA, 2007; REZENDE, 2015; SILVEIRA; MÉNDEZ, 1999) o DNA *barcoding* não detectou incongruências na taxonomia.

Se olharmos além da identificação das espécies, em fina escala é possível observar a presença de dois clados bem suportados (>90%) (Figura 7) que correspondem as subespécies *S. columbiana goeldii* e *S. columbiana leopoldinae*. Por outro lado, para a espécie *S. flaveola* há um subclado bem suportado constituído apenas por espécimes da subespécie *S. flaveola valida* (Figura 7). A espécie *S. flaveola* também mostra subclados que parecem representar as subespécies *S. flaveola valida*, *S. flaveola brasiliensis* e *S. flaveola pelzelni*, as quais incluem amostras de nosso estudo. A presença de subespecies discorda com os cadastros SISPASS onde todos os indivíduos estão cadastrados como *S.f. brasiliensis*.

A formação de subclados suportados na árvore filogenética poderiam indicar uma detecção de subespécies como já foi sugerido por os estudos de Tizard et al. (2019) e Gaber et al. (2019). No primeiro, os autores utilizam o gene COI com 180 espécies em Nova Zelândia e além da identificação de as espécies mostram que 16 espécies tem evidências de linhagens intraespecíficas distintas, com algumas delas correspondendo a subespécies reconhecidas (TIZARD et al., 2019). No segundo artigo os pesquisadores conseguem identificar subespécies utilizando três diferentes genes mitocondriais (COI, 12S rRNA e NADH desidrogenase-1 (ND1)) em

*Todiramphus chloris*, uma ave com 50 subespécies descritas e amplamente distribuída na Índia e no leste do oceano Pacífico.

Esta possível delimitação de subespécies reforça a importância de uma análise detalhada dos espécimes encontrados em cativeiro. A potencial reprodução de indivíduos de diferentes subespécies poderá gerar progênie híbrida. Esses híbridos, em caso de fuga do criadouro ou se liberados na natureza voluntariamente, poderão representar um risco para a manutenção da integridade genética de ambas subespécies (OTTENBURGHS, 2019).

Dois subclados na espécie *S. flaveola* parecem representar uma estruturação geográfica. De um lado, as amostras coletadas no Brasil (majoritariamente no estado de São Paulo) e, de outro, as amostras da base de dados provenientes em sua totalidade da Argentina - exceto a amostra de *S. flaveola* (ID: 127) proveniente de Mato Grosso e doada pelo MZUSP. Nossos resultados concordam com o estudo de Cai et al. (2010) que obtiveram *clusters* geograficamente distintos, ou seja, agrupamentos intraespecíficos associados a descontinuidades geográficas utilizando unicamente COI. As diferenças geográficas já tinham sido abordadas por John Avise, o primeiro a reconhecer que as divergências nas sequências do mtDNA fornecem um registro de evolução histórico dentro das espécies e estabelecendo o campo da filogeografia (AVISE, 1987).

Além do aporte taxonômico, é importante lembrar que os marcadores mtDNA são passados de geração a geração por herança materna e, portanto, esses haplótipos podem ser utilizados na exclusão de maternidade. Apenas nos casos em que nenhum outro membro da família da linhagem mtDNA é relevante para hipóteses alternativas, a evidência genética dos marcadores de mtDNA pode adicionar substancialmente aos resultados gerais dos marcadores genéticos autossômico excluindo possíveis mães que não compartilhem o haplótipos mitocondrial.

## **7.2 Transferabilidade de locos microssatélites heterólogos e Análise de diversidade genética e parentesco**

*Testes de transferabilidade:* A transferabilidade, amplificação de *primers* heterólogos ou *cross-species amplification* é uma técnica que consiste no teste de amplificação de microssatélites isolados de uma espécie focal em espécies

intimamente relacionadas (REID; HOAREAU; BLOOMER, 2012). Isso é possível devido à conservação potencial das regiões franqueadoras (FITZSIMMONS; MORITZ; MOOR, 1995).

Apesar da técnica ter sucesso em muitas espécies, incluindo mamíferos, fungos e plantas, múltiplos estudos identificaram correlações negativas claras entre distância genética e a transferabilidade dos locos (sucesso de amplificação e polimorfismo) em outros táxons de vertebrados, incluindo pássaros, anfíbios e peixes (BARBARÁ et al., 2007; MOURA; DAWSON; NOGUEIRA, 2017). Outros autores também reportam uma diminuição mais acentuada no sucesso da transferência para aves e invertebrados em comparação com répteis e mamíferos quando a transferência é entre gêneros ou famílias diferentes (MOURA; DAWSON; NOGUEIRA, 2017).

Os STR são marcadores localizados em regiões não codificantes, onde as mutações dentro das sequências repetidas possivelmente não interferem na aptidão do indivíduo. Esta característica permite a utilização de primers em diferentes genomas, de diferentes espécies, com uma amplificação exitosa na maioria dos casos (ELLEGREN, 2004). Nosso estudo teve uma taxa de sucesso de amplificação das amostras de 92,307%, valor alto concordante com a revisão de outros autores que indicaram uma alta taxa de êxito no porcentagem de STR heterólogos amplificados (BARBARÁ et al., 2007).

Em relação a variação encontrada nos microssatélites, uma redução da diversidade alélica é esperada quando são utilizados *primers* heterólogos (FITZSIMMONS; MORITZ; MOOR, 1995). Essa observação é, em parte, devido à ocorrência de variação nas sequências franqueadoras dos locos de microssatélites entre as espécies, levando a diferenças de base entre os *primers* e espécies-alvo e, portanto, falha de alguns alelos para amplificar. Essas incompatibilidades de *primer*-alvo aumentam à medida que a distância filogenética entre o alvo e as espécies de origem a partir das quais os *primers* foram projetados aumentam (ELLEGREN; PRIMMER; SHELDON, 1995; PRIMMER; MQLLER; ELLEGREN, 1996; SCHLOTTERÖER; AMOS; TAUTZ, 1991). Embora a distância genética é um fator crítico no êxito da transferabilidade, não existe acordo no valor da distância filogenética interespecífica DNA-DNA necessária ( $\Delta T_{50H}$ ) (PRIMMER et al., 2005), a qual varia de 3,9 (o que indicaria que a amplificação deveria ser limitada

principalmente a espécies cogenéricas (SIBLEY; AHLQUIST, 1990)) até 9,6 (sugerindo uma aplicação muito mais ampla da amplificação entre espécies (DALLIMER, 1999).

A variação com relação ao *range*, na transferabilidade dentro do mesmo género, também é esperada pelas mesmas razões mencionadas anteriormente; no entanto, em aves, répteis e invertebrados as diferenças são maiores em comparação com os outros grupos taxonômicos (PRIMMER; MQLLER; ELLEGREN, 1996; STEINKELLNER et al., 1997). Em nosso estudo esse resultado é visualizado nos locos CB03, Sma08, Sma18 e Sma25 onde o *range* teórico é maior em relação ao obtido nas amostras genotipados.

A quantidade de locos monomórficos obtidos (9/26) (NF1920, NF3132, NF1112, NF1314, CB07, Sma8, Sma18, Sma25 e Zole\_H2) é similar a média obtida por Khimoun e colaboradores (2016) na amplificação cruzada de 25 locos espécie-específicos em sete espécies de Passeriformes das Pequenas Antilhas (KHIMOUN et al., 2016) o que mostra que nosso projeto tem um sucesso similar ao previamente registrado na literatura (animais dentro e entre gêneros e mesmo através de diferentes famílias em alguns casos tem sucesso >40% em mamíferos, > 25% em peixes e > 10% em aves nesse nível (ELLEGREN, 2004))

Barbara e colaboradores (2007), também explicam um significativo efeito do sistema de acasalamento e o tempo de geração no sucesso da transferabilidade dos marcadores amplificados, mostrando menor sucesso em espécies de criadouros e com ciclo de reprodução de curta duração (BARBARÁ et al., 2007), ambas características presentes em nosso estudo. O aumento na probabilidade de acumular mutações por causa do menor tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) e dos cruzamentos consanguíneos, pode envolver transposição, rearranjos cromossômicos, inserção local/deleções ou mutações pontuais, as quais poderiam afetar a conservação dos marcadores (HIGGINS; LYNCH, 2001; LYNCH; CONERY, 2003). Ambos fatos ajudam a justificar a obtenção de 9 locos monomórficos para *Sicalis flaveola* descritos como polimórficos na espécie original e a presença de alelos nulos em o loco NF2324.

A diminuição da diversidade obtida, considerando unicamente as famílias em relação a heterozigosidade de todas as amostras, é explicada pelo fato de que poucos fundadores e pequenas populações resultantes podem derivar em gargalos

populacionais, associados ao aumento das taxas de endogamia e a perda de diversidade genética; situações que podem afetar a viabilidade a longo prazo como já foi descrito para *Petroica australis rakiura*, *Petroica longipes*, *Philesturnus carunculatus* e *Porphyrio hochstetteri* em Nueva Zelanda (JAMIESON, 2011).

A diminuição de repetições do *Motif* mostrada na tabela 2 pode ser explicada com o conceito de “Viés de verificação”, pelo qual um microssatélite escolhido para ser maximamente longo na espécie fonte provavelmente será mais curto em uma nova espécie-alvo (ELLEGREN; PRIMMER; SHELDON, 1995). Ellegren e colaboradores (1995) explicam que a verificação opera em parte por meio de uma restrição no comprimento dos microssatélites, de modo que deleções ocasionais ou mutações pontuais internas levam a locais mais curtos e menos polimórficos na transferência entre espécies (ELLEGREN, 2004).

Por último, em relação a diversidade dos locos de microssatélites, Barbara e colaboradores (2007) mostram que o sucesso da amplificação de *primers* heterólogos diminui com o aumento do tamanho do genoma nas espécies-alvo. Entretanto, não existem ainda informações sobre o genoma de *Sicalis flaveola* e das demais espécies nas quais os microssatélites foram descritos.

*Análise descritiva da diversidade nos criadouros:* Os resultados mostraram que os locos analisados apresentam uma baixa diversidade e alta presença de homozigotos (Tabela 7), fato esperado pelo entrecruzamento dentro dos mesmos grupos familiares como é observado no criadouro quatro onde o filho e chocado com a mãe com o objetivo de obter uma progênie com características fenotípicas diferentes (olhos vermelhos e penas brancas) de maior preço no mercado.

O painel de microssatélites utilizados possui poder suficiente para realizar as análises de parentesco com as abordagens de exclusão e alocação categórica considerando a totalidade do conjunto de dados estudados.

Embora descartamos o loco NF2324, por ser a recomendação sugerida para as análises quando tem detecção de alelos nulos, Jones e colaboradores (2010) também explicam que a maneira mais conservadora, mas não a melhor, de lidar com locos com alelos nulos na análise de parentesco é recodificar todos os genótipos homozigotos como heterozigotos possuindo o alelo detectado e o alelo nulo, impedindo assim exclusão com base em genótipos homozigotos (JONES et al., 2010).



Em relação aos métodos de análise parental elegidos, estudos realizados explicam que embora a análise de DNA com vários locos é relativamente simples metodologicamente (por ser locos que seguem as regras da segregação mendeliana e ser hipervariáveis), os padrões de picos apresentam para o usuário uma dificuldade inicial de padronização e conseqüentemente de manipulação do ponto de vista estatístico, portanto sugerem a avaliação dos dados para a seleção do melhor método estatístico e a calibração da análise dos parentais com informação a priori e pelo número esperado de picos compartilhadas entre diferentes classes de parentes para qualquer população em particular ou espécie (BIEDERMANN; VUILLE; TARONI, 2014; BUCKLETON et al., 2016; JONES et al., 2010; LINACRE et al., 2011). Ambos fundamentos foram considerados para a padronização de nossas análises.

Primeiramente, das seis abordagens descritos por Jones e colaboradores (2010) (exclusão, alocação categórica, alocação fraccionada, análises de parentesco de probabilidade completa, reconstrução parental e reconstrução de irmãos) nós incluímos exclusão e alocação categórica como melhores abordagens de para nosso amostragem e no segundo consideramos a informação a priori do cadastro SISPASS e dos donos dos criadouros como fonte de contraste e calibração de nossos testes moleculares.

Avaliando as características de nosso estudo, famílias pequenas, endocruzamento, probabilidade de possuir os progenitores em nosso conjunto amostral e presença de pelo menos um dos pais, e considerando as recomendações de Jones e colaboradores (2010) para as análises de parentesco, utilizamos duas abordagens. Tanto exclusão como alocação categórica são sugeridas quando a média do tamanho da progênie da família é menor ou igual a oito filhotes e há possibilidade de obter pelo menos uma amostra de um conjunto de pais candidatos.

A probabilidade de exclusão foi calculada é baseada na lógica das regras da herança mendeliana para organismos diploides, pais e filhos compartilharão em pelo menos um alelo por locos para um marcador codominante, se um pai suposto deixar de compartilhar um alelo com os filhos de interesse, esse pai poderá ser eliminado da consideração como um pai verdadeiro (CHAKRABORTY; SHAW; SCHULL, 1974). No entanto, essa característica estrita pode resultar em falsas exclusões de pais verdadeiros, por exemplo, uma mutação na linha germinativa resultará em uma

prole com um alelo que não está presente no pai, e alelos nulos (ou seja, alelos não amplificados) podem resultar em um pai verdadeiro e descendentes que parecem homozigotos para diferentes alelos (ELLEGRÉN, H 2004). Segundo, a exclusão completa pode ser difícil se a população em consideração consistir em um grande número de filhos e supostos pais, situação que poderia acontecer ao aplicar nossa metodologia no criadouro comercial. Mesmo com marcadores altamente polimórficos, pode ser proibitivamente caro genotipar locos suficientes para conseguir a exclusão de todos, exceto o verdadeiro parente, para todos os descendentes da população, aumentando a dificuldade a endogamia presente nos criadouros.

A alocação categórica foi desenvolvida como resposta a situações nas quais a exclusão completa pode não ser viável é desde então esta abordagem ha sido refinada, resultando em uma técnica mais comumente usada para análise de parentesco (GERBER et al., 2000; MARSHALL et al., 1998b; MEAGHER, 1986). Como no caso da exclusão, essa abordagem requer pelo menos uma descendência e um conjunto de pais candidatos. O benefício dessa abordagem é que fornece um método para escolher o único pai mais provável dentro um grupo de pais putativos não excluídos. A lógica deriva da observação de que diferentes genótipos parentais podem diferir em sua probabilidade de produzir o genótipo da prole (Meagher & Thompson 1986). Apesar de que a abordagem bayesiana pode ser usada, as abordagens de alocação categórica mais atuais usam uma abordagem de probabilidade (GERBER et al., 2000; MARSHALL et al., 1998b; MEAGHER, 1986). razão pela qual foi a abordagem empregada em nosso estudo. Ambas resumem às probabilidades de transição Mendeliana, que descreve a probabilidade de obter um certo genótipo de descendência, dados os genótipos parentais propostos.

Além do método, a calibração da análise dos parentais com informação a priori também foi realizada utilizando as informações cadastradas no SISPASS. Essas informações foram consideradas a priori porque desde o ponto de vista jurídico, os testes genéticos corroboram ou negam uma acusação de paternidade ou outro relacionamento genético que se origine de evidências externas (GJERTSON et al., 2007), as quais em nosso estudo podem ser denúncias, suspeitas por prévias pesquisas da polícia, adulteração de anilhas, cadastros incongruentes etc.

As probabilidades calculadas mediante o método de exclusão são menores que as probabilidades de não exclusão, o qual é esperado pelo pouco polimorfismo do painel de microssatélites. Como a exclusão fornece maior peso as diferenças de alelos, a ausência das mesmas dificulta uma assertiva exclusão. Considerando que o maior valor obtido para exclusão foi menor ao 80% e que esse pouco poder resolutivo pode gerar falsos negativos, os análises de parentesco por família foram avaliados com o método de alocação categórica.

*Análise de parentesco por família:* A análise de parentesco desempenham um papel central no estudo de diversos tópicos forenses, ecológicos e evolutivos, como seleção sexual), padrões de dispersão e recrutamento, estimativa de parâmetros genéticos quantitativos e biologia da conservação (DAWNAY, N, 2009). Como já mencionamos anteriormente, esses estudos consideram as características dos locos, o método ou abordagem utilizado (ambos detalhados anteriormente nas secciones de testes de transferabilidade e análise descritiva da diversidade nos criadouros), as características do grupo da amostragem, e o software utilizado, todas elas levadas em consideração em nosso estudo.

Em relação as características do grupo da amostragem, o melhor cenário para as famílias amostradas é aquele onde grandes grupos de filhos poderiam ser coletados de pares acasalados conhecidos de adultos. Em tal situação, as técnicas moleculares precisam ser empregadas apenas para verificar se as relações suspeitas são verdadeiras (GOWATY; KARLIN, 1984), situação aplicada nas análises das famílias 1, 6 e 7. A análise se torna mais complexa conforme a ausência ou incerteza dos progenitores aparece, por exemplo, quando os filhotes podem ser coletados em grupos familiares pequenos com várias possíveis mães e uma amostra incompleta pode ser obtida de um grupo de machos adultos dentro do criadouro, caso similar as famílias 4 e 5. Com nosso conjunto de STR, nos casos onde todos os pais candidatos não podem ser amostrados, a atribuição de pais será impossível para alguns dos descendentes e algumas descendentes podem ser atribuídas incorretamente. Além disso, se os filhotes não puderem ser coletados em grupos familiares, uma abordagem analítica completa se torna essencial, pois a amostra se desviará da análise estatística ideal de parentesco (JONES et al., 2010).

Sob tais circunstâncias, os dados obtidos em situações não ideais ainda podem ser úteis para a estimativa de alguns parâmetros do sistema de acasalamento, como

a prevalência de paternidade (JONES et al., 2010), ou em aplicação de outros métodos de parentesco como as análises de exclusão ou alocação categórica que implicam amostragem parciais e abordagens estatísticas distintas. Essas análises tornam-se mais favoráveis quanto maior o poder de resolução do marcador molecular (JONES et al., 2010).

Nas técnicas de atribuição deve-se considerar uma restrição que merece atenção especial, elas requerem conhecimento do número total (ou uma aproximação) de pais candidatos para a atribuição do grau de confiança nos valores estipulados (MARSHALL et al., 1998; NIELSEN et al., 2001). Esta situação poderia justificar ausência na atribuição do grau de confiança em alguns de nossos resultados nas análises com o software Cervus. Este software é extremamente sensível à estimativa da proporção de adultos candidatos incluídos na amostra (que é fornecido como parâmetro pelo usuário) (MARSHALL et al., 1998).

Embora o número total de adultos reprodutores nos criadouros selecionados raramente é conhecida pelos membros da polícia que coletam as amostras, uma amostragem maior é sugerida para futuros estudos considerando que a quantidade máxima de filhotes por ano são 35 e o número máximo de indivíduos por criadouro são 100 de acordo com a Instrução Normativa IBAMA Nº 10/2011 (IBAMA, 2011). Além da amostragem, também é sugerido o uso de aplicações bioinformáticas como PaTernity Inference (PATRI), a qual permite estimar a probabilidade posterior de um macho ter gerado uma prole em particular, assumindo um prior uniforme entre todos os machos da população (SIGNOROVITCH; NIELSEN, 2002). O tamanho da população masculina pode ser especificada como um valor fixo ou como uma incerteza relativa modelada utilizando prior uniforme (assume se nenhuma informação prévia sobre o tamanho da população masculina, exceto o limite superior que pode ser especificado) ou Gaussiano (SIGNOROVITCH; NIELSEN, 2002).

As análises com STR são amplamente empregadas na área humana e animal para identificação, parentesco, estudos populacionais, de conservação e incluso são uma ferramenta valiosa para fornecer evidências em casos forense como em nosso estudo (HADAS; HERMON; BAR-GAL, 2016; JOBIN; PATTERSON; ZHANG, 2008; LEE; HSIEH; TSAI, 2013; MITRA; ROY; HAQUE, 2018; MOURA; DAWSON; NOGUEIRA, 2017; MUCCI et al., 2018; SONG et al., 2011; ZUCOLOTO, 2003).

Considerando que nosso painel de marcadores moleculares microssatélites tem capacidade para identificar o melhor pai candidato, permite a exclusão com probabilidade menor a 80%, e considerando que a confiança obtida em análises de maternidade e paternidade foi do 80% o menor, nós sugerimos uma abordagem integral da genética forense para determinar se os indivíduos da espécie *Sicalis flaveola*, mantidos nos criadouros realmente são resultado de reprodução em cativeiro (pergunta planteada no início de nosso projeto).

O conjunto de evidências ou provas não descritas em detalhe no presente documento mas avaliadas na coleta da evidência - como a presença de adulteração nas anilhas, o cadastro errado dos sexos, a ausência de cadastro de amostras no registro SISPASS, a incongruência entre os dados cadastrados e os verbalizados pelo dono do criadouro em algumas famílias - em somatória com as análises moleculares de identificação da espécie e parentesco podem revelar se os indivíduos mantidos nos criadouros realmente são resultado de reprodução em cativeiro.

Além disso, para conseguir uma resolução maior nas análises moleculares, um painel maior de microssatélites, incluindo STR espécie-específicos é sugerido, razão pela qual sequenciamos o genoma de um espécime de *Sicalis flaveola* e *primers* espécie- específicos estão sendo desenvolvidos para futuras pesquisas.

## 8. CONCLUSÃO

A identidade da espécie *Sicalis flaveola* nas amostras coletadas nos criadouros foi confirmada utilizando os métodos de delimitação de espécies, comprovando a eficácia da técnica e a ausência de irregularidades entre a identificação molecular e as informações dos cadastros SISPASS no item que identifica a espécie.

Das treze espécies que compõem o gênero *Sicalis*, seis espécies estudadas formam unidades moleculares distintas: *S. flaveola*, *S. luteola*, *S. olivascens*, *S. luteocephala*, *S. citrina* e *S. columbiana*.

Além da taxonomia, nosso resultado impacta na legislação. A confirmação da identidade da espécie nas amostras cadastradas como *Sicalis flaveola* nos registros do SISPASS, permite a identificação de irregularidades e conseqüentemente a identificação de possíveis animais provenientes do tráfico e comércio ilegal, facilitando a aplicação da Lei Federal n 9.605, o Decreto n 6.514 (MMA, 2014) e Instrução Normativa nº 10 /2011 (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2011). Além, a correta identificação da espécie facilita a reintrodução dos espécimes no seus habitats, sendo uma importante ferramenta no manejo da vida selvagem (CAVALCANTI, 2011).

Foi desenvolvido um painel de STR informativo, utilizando *primers* heterólogos, para estimar a relação de parentesco entre os indivíduos amostrados, os quais permitem a comparação cruzada dos resultados moleculares, com os registros do SISPASS e a informação proporcionada por os donos dos criadouros.

O conjunto integral de evidências permitirá identificar quais indivíduos mantidos nos criadouros realmente são resultado de reprodução dentro do cativeiro.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALACS, E. A. et al. DNA detective: A review of molecular approaches to wildlife forensics. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 6, n. 3, p. 180–194, 2010.
- ALIABADIAN, M. et al. DNA barcoding of Dutch birds. **ZooKeys**, v. 365, n. SPEC.ISSUE, p. 25–48, 2013.
- ALMERÓN-SOUZA, F. et al. Molecular identification of shark meat from local markets in Southern Brazil based on DNA barcoding: Evidence for mislabeling and trade of endangered species. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. APR, p. 1–12, 2018.
- ARAUJO, A. C. B. et al. Diagnóstico sobre a avifauna apreendida e entregue espontaneamente na Região Central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 84849, n. 3, p. 279–284, 2010.
- ARIF, I. A. et al. DNA marker technology for wildlife conservation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 219–225, 2011.
- AVISE, J. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**. **Vol. 18**, n. May 2014, p. 489–522, 1987.
- AZEVEDO, O. **Uma avaliação dos padrões de caça do Estado de São Paulo**. [s.l.] UFSCar, 2018.
- BAKER, A. J.; TAVARES, E. S.; ELBOURNE, R. F. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. SUPPL. 1, p. 257–268, 2009.
- BARBANERA, F. et al. Conservation of endemic and threatened wildlife: Molecular forensic DNA against poaching of the Cypriot mouflon (*Ovis orientalis ophion*, Bovidae). **FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL-GENETICS**, v. 6, n. 5, p. 671–675, set. 2012.
- BARBARÁ, T. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: Potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3759–3767, 2007.
- BARRIENTOS, L. S. et al. DNA profile of dog feces as evidence to solve a homicide. **Legal Medicine**, v. 22, p. 54–57, 2016.
- BASU, A. How to conduct meta-analysis: A Basic Tutorial. **University of Canterbury**, n. May, p. 1–15, 2017.
- BIELIKOVA, M. et al. Multiplex PCR amplification of 13 microsatellite loci for *Aquila*

chrysaetos in forensic applications. **Biologia**, v. 65, n. 6, 2010.

BIOMATTERS LTD. **Geneious Prime® 2020.0.5**, 2020.

BLEVINS, K. R.; EDWARDS, T. D. Wildlife Crime. **21st Century Criminology: A Reference Handbook 21st Century criminology: A reference handbook**, p. 557–563, 2012.

BORATTO, R.; GIBBS, C. **Wildlife Crime**, 2019. (Nota técnica).

BOYD, D. K. et al. Identification of Rocky Mountain gray wolves. **WILDLIFE SOCIETY BULLETIN**, v. 29, n. 1, p. 78–85, 2001.

BRAZIL GOV. **Lei de Proteção á Fauna**, 1967.

BRITISH COLUMBIA. Hunting regulation b.c. Reg. 190/84. 2019.

BROWN, S. D. J. et al. Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES**, p. 562–565, 2012.

BURKE, T.; BRUFORD, M. W. DNA fingerprinting in birds. **Nature**, v. 327, n. 14, p. 3–6, 1987.

BURNS, K. J. et al. Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 75, n. 1, p. 41–77, 2014.

BUTLER, J. M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. San Diego: Academic Press, 2010.

CANIGLIA, R. et al. Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy. **FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL-GENETICS**, v. 4, n. 5, p. 334–338, out. 2010.

CANIGLIA, R. et al. Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 3, p. 397–404, 2013.

CARATTI, S. et al. Analysis of 11 tetrameric STRs in wild boars for forensic purposes. **Forensic Science International: Genetics**, v. 4, n. 5, p. 339–342, 2010.

CAVALCANTI, T. **Reintrodução de aves oriundas do comércio ilegal no Brasil: Estudos de caso com Sporophila albogularis, Sporophila nigricollis e Sicalis flaveola em uma área de caatinga**. [s.l.: s.n.].

CERIT, H.; AVANUS, K. Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. **Turkish Journal of Veterinary and**



**Animal Sciences**, v. 31, n. 6, p. 371–374, 2007.

CHEN WENWEN AND NEWMAN, C. L. Z. K. Y. O. K. M. R. B. C. D.; MACDONALD, D. W.; XIE ZONGQIANG AND ZHOU, Y. The illegal exploitation of hog badgers (*Arctonyx collaris*) in China: genetic evidence exposes regional population impacts.

**Conservation Genetics Resources**, v. 7, n. 3, p. 697–704, set. 2015.

CIAVAGLIA, S. A.; HENRY, J. M.; LINACRE, A. M. T. Profiling pythons to combat common illegal wildlife activities. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 4, n. 1, p. e31–e32, 2013.

CLARK, G. A. J. Systematic Interpretations of Foot-Scute Patterns in Neotropical Finches. **The Wilson Bulletin**, v. 98, n. 4, p. 594–597, 1986.

CLEMENTS, J. F. et al. **Clements checklist of birds of the world**. Disponível em: <<http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/>>.

COBLE, M. et al. Forensic DNA Evidence Interpretation, Second Edition. **Forensic DNA Evidence Interpretation, Second Edition**, 2016.

CONSORTIUM, I. B. OF L. **DNA BARCODING: A tool for specimen identification and species discovery**. Disponível em: <<https://ibol.org/about/dna-barcoding/>>.

COOPER, J. E.; COOPER, M. E.; BUDGEN, P. Wildlife crime scene investigation: Techniques, tools and technology. **Endangered Species Research**, v. 9, n. 3, p. 229–238, 2009.

CORRÊA, C. Isolamento e caracterização de locos de microssatélites para *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes, Aves). p. 52, 2009.

CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND. **Announcing the world's 36th biodiversity hotspot: the North American Coastal Plain**. Disponível em: <[http://www.cepf.net/news/top\\_stories/Pages/Announcing-the-Worlds-36th-Biodiversity-Hotspot.aspx](http://www.cepf.net/news/top_stories/Pages/Announcing-the-Worlds-36th-Biodiversity-Hotspot.aspx)>.

DALLIMER, M. Cross-species amplification success of avian microsatellites in the redbilled quelea *Quelea quelea*. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 4, p. 695–698, abr. 1999.

DAVOLI, F. et al. Infanticide in brown bear: a case-study in the Italian Alps - Genetic identification of perpetrator and implications in small populations. **NATURE CONSERVATION-BULGARIA**, n. 25, p. 55–75, fev. 2018.

DAVY, C. M. et al. Isolation and characterization of eleven novel polymorphic microsatellite loci in the spiny softshell turtle (*Apalone spinifera*). **Conservation**

**Genetics Resources**, v. 4, n. 3, p. 759–761, set. 2012.

DAWNAY, N. et al. Genetic data from 28 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in 6 bird of prey species. **Forensic Science International: Genetics**, v. 3, n. 2, p. e63–e69, 2009.

DE ARRUDA, M. P. et al. An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2031–2036, 2010.

DEAGLE, B. E. et al. Genetic screening for prey in the gut contents from a giant squid (*Architeuthis* sp.). **Journal of Heredity**, v. 96, n. 4, p. 417–423, 2005.

DEASSIS, J. B. et al. Genetic diversity and population structure in Brazilian Mangalarga Marchador horses. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 8, n. 4, p. 1519–1524, 2009.

DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; CHRITIE, D. A. **Handbook of the Birds of the World**. Disponível em: <<https://www.hbw.com/>>.

DERYCKE, S. et al. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

DEV, S. A. et al. Identification of market adulterants in East Indian sandalwood using DNA barcoding. **Annals of Forest Science**, v. 71, n. 4, p. 517–522, 2014.

DICKINSON, E. C.; REMSEN, J. V. J. The Howard and Moore Complete Checklist of the Birds of the World. In: 4. ed. Eastbourne, U.K: [s.n.].

DUBIEC, A.; ZAGALSKA-NEUBAUER, M. Molecular techniques for sex identification in birds. **Biological lett**, v. 43, n. 1, p. 3–12, 2006.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, jun. 2004.

ELLEGREN, H.; PRIMMER, C. R.; SHELDON, B. C. Microsatellite ‘evolution’: directionality or bias? **Nature Genetics**, v. 11, n. 4, p. 360–362, dez. 1995.

FAIN, S. R. et al. Forensic genetic identification of sturgeon caviars traveling in world trade. **Conservation Genetics**, v. 14, n. 4, p. 855–874, ago. 2013.

FANG, S.; WAN, Q. A genetic fingerprinting test for identifying carcasses of protected deer species in China. **Biological Conservation**, v. 103, n. 3, p. 371–373, 2002.

FELSENTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap Author (s): Joseph Felsenstein Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2408678> . **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

FERREIRA, J. M. **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)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

FITZSIMMONS, N. N.; MORITZ, C.; MOOR, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 1995.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular marine biology and biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–9, 1994.

FRANTZ, A. C. et al. Genetic structure and assignment tests demonstrate illegal translocation of red deer (*Cervus elaphus*) into a continuous population. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 11, p. 3191–3203, 2006.

FROSCH, C. et al. Case report of a fatal bear attack documented by forensic wildlife genetics. **FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL-GENETICS**, v. 5, n. 4, p. 342–344, ago. 2011.

FROSCH, C. et al. Noninvasive genetic assessment of brown bear population structure in Bulgarian mountain regions. **Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 79, n. 4, p. 268–276, 2014.

GABERT, A. et al. Molecular identification of *Todiramphus chloris* subspecies on the Arabian Peninsula using three mitochondrial barcoding genes and ISSR markers Ahmed. **Saudi Journal of Biological Sciences**, , v. 27, n. 1, p. 480–488, 2019.

GAMARRA, D. et al. Mitochondrial genes allow discrimination between three cynegetic species for forensic purposes. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, n. 1, p. e226–e227, 2011.

GENTILE, G.; CIAMBOTTA, M.; TAPIA, W. Illegal wildlife trade in Galápagos: Molecular tools help the taxonomic identification of confiscated iguanas and guide their rapid repatriation. **Conservation Genetics Resources**, v. 5, n. 3, p. 867–872, 2013.

GIBSON, J. F. et al. Diptera-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification Primers of Use in Molecular Phylogenetic Research. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 5, p. 976–997, 1 set. 2011.

GLEN, A. S. et al. Forensic DNA confirms intraguild killing of a chuditch (*Dasyurus*

geoffroii) by a feral cat (*Felis catus*). **Conservation Genetics**, v. 11, n. 3, p. 1099–1101, jun. 2010.

GOLDSTEIN, P.; DESALLE, R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. **Bioessays**, v. 33, p. 135–147, 2010.

GONÇALVES, B. P. **Análises genéticas , ações educativas e criação de banco de dados forense: estratégia multidisciplinar para proteção jurídica à conservação biológica de aves traficadas**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2018.

GONÇALVES, B.; WASKO, A. Conservation genetics applied to birds illegal trade. **Saúde, ética & justiça**, v. 18, p. 79–83, 2013.

GOODWIN, W.; LINACRE, A.; HADI, S. **An Introduction to Forensic Genetics**. 2nd. ed. England: [s.n.].

GOWATY, P. A.; KARLIN, A. A. Multiple maternity and paternity in single broods of apparently monogamous eastern bluebirds (*Sialia sialis*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 15, n. 2, p. 91–95, jul. 1984.

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

GUPTA, S. K. et al. Establishing the identity of the massacred tigress in a case of wildlife crime. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 1, p. 74–75, 2011.

HADAS, L.; HERMON, D.; BAR-GAL, G. K. Before they are gone – improving gazelle protection using wildlife forensic genetics. **Forensic Science International: Genetics**, v. 24, p. 51–54, 2016.

HAGENLUND, M. et al. Fauna crime: elucidating the potential source and introduction history of European smelt (*Osmerus eperlanus* L.) into Lake Storsjøen, Norway. **Conservation Genetics**, v. 16, n. 5, p. 1085–1098, 2015.

HAJIBABAEI, M. et al. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 959–964, 2006.

HARRISON, S.; NOSS, R. Endemism hotspots are linked to stable climatic refugia. **Annals of Botany**, v. 119, n. 2, p. 207–214, 2017.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. SUPPL. 1, 2003.

HIGGINS, K.; LYNCH, M. Metapopulation extinction caused by mutation accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 5, p. 2928–2933, 2001.

HOUCK, M. **Forensic Biology: Advanced Forensic Science Series**. 1st. ed. Petersburg, USA: Academic Press, 2010.

HOYSACK, D. J.; WEATHERHEAD, P. J. Sampling Blood From Birds: a Technique Assessment of Its Effect ' and an. **Blood**, p. 746–752, 1991.

HRDINA, A.; ROMPORTL, D. Evaluating Global Biodiversity Hotspots-Very Rich and even More Endangered. **Journal of Landscape Ecology(Czech Republic)**, v. 10, n. 1, p. 108–115, 2017.

HROVATIN, K.; KUNEJ, T. Genetic sex determination assays in 53 mammalian species: Literature analysis and guidelines for reporting standardization. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 2, p. 1009–1018, 2018.

HUNTER, J.; SCHMIDT, F. **Methods of Meta-Analysis**. 2. ed. London: SAGE Publications, 2002.

IBAMA. **Instrução Normativa N° 3, De 1° De Abril De 2011 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)**São Paulo, Brasil, 2011.

INGUI, D. L.; SILVEIRA, L. F. **Taxonomia das formas brasileiras de Sicalis flaveola (Passeriformes: Emberizidae) com base em caracteres morfológicos**. Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. **Anais**. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Instrução Normativa N° 169**Brasil, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Instrução Normativa N 10/2011**Brasil, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS

RENOVÁVEIS. **Tráfico de animais silvestres traz riscos à biodiversidade e ameaças à saúde silvestre e humana Parcerias apoiam órgãos de controle de tráfico animais silvestres** **Boletim Informativo | BI - CISS/012 Fevereiro** Brasília, Brasil, 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/4905-trafico-de-animais-contribui-para-extincao-de-espécies>>

INTERPOL. Global wildlife enforcement. n. March, 2018.

IUCN. **Summary statistics, Red List category.**

IUCN. **Diretrizes Para Reintroduções e outras Translocações para fins de Conservação.** [s.l: s.n.].

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species.** Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>.

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

JOBIN, R. M.; PATTERSON, D.; ZHANG, Y. DNA typing in populations of mule deer for forensic use in the Province of Alberta. **Forensic Science International: Genetics**, v. 2, n. 3, p. 190–197, 2008.

JONES, A. G. et al. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 1, p. 6–30, 2010.

JONES, M.; GHOORAH, A.; BLAXTER, M. JMOTU and Taxonator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19259., 2011.

JOO, S.; PARK, S. Identification of bird species and their prey using DNA barcode on feces from Korean traditional village groves and forests (mãeulsoop). **Animal Cells and Systems**, v. 16, n. 6, p. 488–497, 2012.

JOYCE, C.; STOVER, E. **Merriam-Webster Dictionary.** Disponível em: <<https://www.merriam-webster.com/>>.

JUN, J. et al. Wildlife forensics using mitochondrial DNA sequences: Species identification based on hairs collected in the field and confiscated tanned Felidae leathers. **Genes & Genomics**, v. 33, n. 6, p. 721–726, dez. 2011a.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 2007.

- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.
- KHIMOUN, A. et al. Contrasted patterns of genetic differentiation across eight bird species in the Lesser Antilles. **Genetica**, v. 144, n. 1, p. 125–138, 2016.
- KIJAS, J. et al. Evolution of Sex Determination Loci in Atlantic Salmon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.
- KITPIPIT, T. et al. Mini-SNaPshot multiplex assays authenticate elephant ivory and simultaneously identify the species origin. **Forensic Science International: Genetics**, v. 27, p. 106–115, 2017.
- KUSUKAWA, N. et al. Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. **Biotechniques**, p. 66–72, 1990.
- LAMICHHANEY, S. et al. Rapid hybrid speciation in Darwin's Finches. **Science**, v. 359, n. 6372, p. 224–228, 2018.
- LAOPICHIENPONG, N. et al. Assessment of snake DNA barcodes based on mitochondrial COI and Cytb genes revealed multiple putative cryptic species in Thailand. **Gene**, v. 594, n. 2, p. 238–247, 2016.
- LEE, J. C.-I.; HSIEH, H.-M.; TSAI, L.-C. DNA and Endangered Species. In: SIEGEL, J. A.; SAUKKO, P. J.; HOUCK, M. M. (Eds.). . **Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)**. Second Edition. Waltham: Academic Press, 2013. p. 409–412.
- LERAY, M. et al. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. **Frontiers in zoology**, v. 10, n. 1, p. 34, jan. 2013.
- LIJTMÄER, D. A. et al. DNA Barcoding Birds: From Field Collection to Data Analysis. In: [s.l: s.n.]. p. 127–152.
- LINACRE, A. et al. ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 5, p. 501–505, 2011.
- LITTELL, J.; CORCORAN, J.; PILLAI, V. **Systematic Reviews and Meta-Analysis**.

United States of America: [s.n.].

LIU, H. et al. Sex-specific markers developed by next-generation sequencing confirmed an XX/XY sex determination system in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **DNA Research**, v. 25, n. 3, p. 257–264, 2018.

LORENZINI, R. DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: A case study. **Forensic Science International**, v. 153, n. 2, p. 218–221, 2005.

LYNCH, M.; CONERY, J. S. The Origins of Genome Complexity. **Science**, v. 302, n. 5649, p. 1401–1404, 2003.

M, S. M. et al. Evaluation of Microsatellite Markers for Populations Studies and Forensic Identification of African Lions. v. 105, n. September, p. 856–866, 2017.

MACHADO, C. **Filogenia molecular e filogeografia do gênero salminus**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2016.

MANSILLA, N. et al. The complexity of mitochondrial complex iv: An update of cytochrome c oxidase biogenesis in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, 2018.

MARSHALL, T. C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 639–655, 1998.

MARSHALL, T. C. **Cervus 3.0.7**. London, UKField Genetics Company, 2014. Disponível em: <[www.fieldgenetics.com](http://www.fieldgenetics.com)>

MARTIN, S. Ivory Trade in Japan : A Comparative Analysis Ivory trade regulations of leading legal. [s.d.].

MCCORD, B. R.; BUEL, E. Capillary Electrophoresis in Forensic Genetics. In: SIEGEL, J. A.; SAUKKO, P. J.; HOUCK, M. M. (Eds.). . **Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)**. Second Edition. Waltham: Academic Press, 2013. p. 394–401.

MEUSNIER, I. et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. **BMC Genomics**, v. 9, p. 4–7, 2008.

MEYER DE SCHAUENSEE, R. A Guide to the Birds of South America Rodolphe Meyer de Schauensee Earl L. Poole John R. Quinn George M. Sutton Maude T. Meyer de Schauensee. **The Auk**, v. 88, n. 4, p. 930–932, out. 1971.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. **Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis**. World Reso ed. Washington, DC.: [s.n.].



MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. **Chapter 4: Biodiversity Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.millenniumassessment.org/documents/document.273.aspx.pdf?%0Ahttp://133.87.26.249/dspace/handle/2115/27447>>.

MILLER, S. M. et al. Evaluation of microsatellites for common ungulates in the South African wildlife industry. **Conservation Genetics Resources**, v. 8, n. 3, p. 329–341, set. 2016.

MITRA, I.; ROY, S.; HAQUE, I. Application of Molecular Markers in Wildlife DNA Forensic Investigations. **Journal of Forensic Science and Medicine**, v. 4, p. 156–60, 2018.

MMA. Lei da Vida. p. 38, 2014.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Revista Espanola de Nutricion Humana y Dietetica**, v. 20, n. 2, p. 148–160, 2016.

MONDOL, S.; MAILAND, C. R.; WASSER, S. K. Male biased sex ratio of poached elephants is negatively related to poaching intensity over time. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 5, p. 1259–1263, out. 2014.

MONERON, S.; OKES, N.; RADEMEYER, J. Pendants, Powder and Pathways: A rapid assessment of smuggling routes and techniques used in the illicit trade in African rhino horn. n. September, 2017.

MONROE, C. G. S. B. L.; SIBLEY, C. G. **Distribution and Taxonomy of Birds of the World**. [s.l.] Yale University Press, 1990.

MORETO, W. D.; LEMIEUX, A. M. From CRAVED to CAPTURED: Introducing a Product-Based Framework to Examine Illegal Wildlife Markets. **European Journal on Criminal Policy and Research**, v. 21, n. 3, p. 303–320, 2015.

MORIN, P. A.; DIZON, A. E. Genetics for Management. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (Eds.). **Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)**. Second Edition. London: Academic Press, 2009. p. 477–483.

MOURA, R. F.; DAWSON, D. A.; NOGUEIRA, D. M. The use of microsatellite markers in neotropical studies of wild birds: A literature review. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 1, p. 145–154, 2017.

MUCCI, N. et al. A new STR panel for parentage analysis in endangered tortoises. **Conservation Genetics Resources**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.

MUCCI, N.; MENGONI, C.; RANDI, E. Wildlife DNA forensics against crime: Resolution of a case of tortoise theft. **Forensic Science International: Genetics**, v. 8, n. 1, p. 200–202, 2014.

N, M. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. February, p. 853–858, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON DNA FORENSIC SCIENCE. Population Genetics. In: **The Evaluation of Forensic DNA Evidence**. 4. ed. Washington (DC): National Academies Press (US), 1996.

NAZARENO, A. G.; DOS REIS, M. S. Where did they come from? Genetic diversity and forensic investigation of the threatened palm species *Butia eriospatha*. **Conservation Genetics**, v. 15, n. 2, p. 441–452, abr. 2014.

NEILAN, B. A.; WILTON, A. N.; JACOBS, D. A universal procedure for primer labelling of amplicons. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 14, p. 2938–2939, 1997.

NIELSEN, R. et al. Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1673–1682, 2001.

NORMAN, M. Biodiversity Hotspots Revisited. **BioScience**, v. 53, n. 10, p. 916, 2006.

OGDEN, R. et al. Genetic data from 15 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in UK domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 2, p. e63–e65, 2012.

OGDEN, R.; DAWNAY, N.; MCEWING, R. Wildlife DNA forensics - Bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. **Endangered Species Research**, v. 9, n. 3, p. 179–195, 2009.

OLIVEIRA, D. et al. **Biodiversidade brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros MMA/SBF**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/140/115>>.

ONYIA, C. O. et al. A New Approach to Protection and Conservation of Cites-Listed Species: DNA Barcoding of Parrots in Nigeria. n. July, p. 0–4, 2019.

OTTENBURGHS, J. Multispecies hybridization in birds. **Avian Research**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2019.

OU, M. et al. An NGS-based approach for the identification of sex-specific markers in snakehead (*Channa argus*). **Oncotarget**, v. 8, n. 58, p. 98733–98744, 2017.

PANDAY, R. et al. Forensic Wildlife Parts and their Product Identification and Individualization Using DNA Barcoding. **The Open Forensic Science Journal**, v. 7, n. 1, p. 6–13, 2015.

PARKANYI, V. et al. Multilevel D-loop PCR identification of hunting game. **Applied and Translational Genomics**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. . GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537–2539, 2012.

PENTINSAARI, M. et al. Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–12, 2016.

PEREIRA, G. A.; BRITO, M. T. DE. Diversidade de aves silvestres brasileiras comercializadas nas feiras livres da Região Metropolitana do Recife , Pernambuco . **Atualidades Ornitológicas**, n. 126, p. 14–20, 2005.

PHILLIPS, M. L. Crime Scene Genetics: Transforming Forensic Science through Molecular Technologies. **BioScience**, v. 58, n. 6, p. 484–489, 2008.

PIACENTINI, V. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n. 2, p. 91–298, 2015.

PLUMER, L. et al. Assessing the roles of wolves and dogs in livestock predation with suggestions for mitigating human--wildlife conflict and conservation of wolves. **Conservation Genetics**, v. 19, n. 3, p. 665–672, jun. 2018.

PONS, J. et al. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic biology**, v. 55, p. 595–609, 2006.

PRIMMER, C. R. et al. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal of Avian Biology**, v. 36, n. 4, p. 348–360, 2005.

PRIMMER, C. R.; MQLLER, A. P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite. p. 365–378, 1996.

PROMEGA. Techinal Manual Wizard ® Genomic DNA Purification Kit Wizard ® Genomic DNA Purification Kit. **Promega Corporation. All Rights Reserved.**, p. 10–

11, 2017.

QIAGEN. DNeasy® Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue. **DNeasy® Blood & Tissue Handbook For purification of total DNA from animal blood animal tissue**, n. July, p. 1–59, 2006.

RAYMOND, J. J. et al. A criminalistic approach to biological evidence: Trace DNA and volume crime. **Science & Justice**, v. 50, n. 1, p. 46, 2010.

REGUEIRA, R. F. S.; BERNARD, E. Wildlife sinks: Quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. **Biological Conservation**, v. 149, n. 1, p. 16–22, 2012.

REID, K.; HOAREAU, T. B.; BLOOMER, P. High-throughput microsatellite marker development in two sparid species and verification of their transferability in the family Sparidae. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 4, p. 740–752, 2012.

REIS, R. E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.

REMSEN, J. V et al. **A Classification of the Bird Species of South America**. Disponível em: <<http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.htm>>.

RENTAS. **1 National Report on the Traffic of Wild Animals**. Brazil: [s.n.]. Disponível em: <[http://www.rentas.org.br/wp-content/uploads/2014/02/RELATORIO-INGLES\\_final.pdf](http://www.rentas.org.br/wp-content/uploads/2014/02/RELATORIO-INGLES_final.pdf)>.

RENTAS. **Wild Life: the narrow threshold between preservation and destruction**. [s.l: s.n.].

RENDO, F. et al. Microsatellite based ovine parentage testing to identify the source responsible for the killing of an endangered species. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 4, p. 333–335, 2011.

REZENDE, R. DE S. **Filogenia Molecular do gênero Sicalis (Passeriforme, Aves) Enfoque na filogeografia do Canário-da-terra (Sicalis flaveola)**. [s.l.] Universidad de Brasília, 2015.

RIBEIRO, L. B.; SILVA, M. G. O comércio ilegal de aves põe em risco a diversidade das aves no Brasil. **Cienc. Cult.**, v. 59, n. 4, p. 4–5, 2007.

RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. **The Birds of South America: The Oscine passerines**. [s.l: s.n.].

RODRIGUES, E. Biologia da Conservação: ciência da crise Conservation Biology; a crisis science. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 2, p. 261–272, 2002.

SAEIDI, Z. et al. Population genetic studies of *Liza aurata* using D-Loop sequencing in the southeast and southwest coasts of the Caspian Sea. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 13, n. 1, p. 216–227, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANCHES, A. et al. Wildlife forensic DNA and lowland tapir (*Tapirus terrestris*) poaching. **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 1, p. 189–193, jan. 2011.

SANDOVAL-ARIAS, S. M. Extracción de ADN humano mediante dos métodos para la tipificación forense a partir de muestras fecales en papel FTA. **Revista Tecnología en Marcha**, v. 27, n. 4, p. 14, 2014.

SARANHOLI, B. H.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; GALETTI, P. M. Evidence of recent fine-scale population structuring in South American Puma concolor. **Diversity**, v. 9, n. 4, 2017.

SCHEER, S. et al. **Demand under the Ban – China Ivory Consumption Research (2017)**. GLOBESCAN ed. [s.l.: s.n.].

SCHLOTTERÖER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 63–65, nov. 1991.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, 2000.

SHARPE, R. B.; BRITISH MUSEUM (NATURAL HISTORY), D. OF Z. **Catalogue of the Birds in the British Museum**. London: [s.n.], 1874.

SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J. E. **Phylogeny and classification of birds: A study in molecular evolution**. New Haven/London: Yale University Press, 1990. v. 6

SIGNOROVITCH, J.; NIELSEN, R. PATRI - Paternity inference using genetic data. **Bioinformatics**, v. 18, n. 2, p. 341–342, 2002.

SILVEIRA, L. F.; MÉNDEZ, A. C. Caracterização Das Formas Brasileiras Do Gênero *Sicalis* (Passeriformes, Emberizidae). **Atualidades Ornitológicas On-Line**, n. March, p. 6–8, 1999.

SINGH, A. et al. A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India. **Forensic Science International**, v. 141, n. 2–3, p. 143–147, 2004.

SIQUEIRA, R. A. S. et al. Análise da condição corpórea, biometria externa e das

vísceras do trato gastrointestinal de canários-da-terra, *Sicalis flaveola braziliensis*. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 379–383, 2013.

SMITH, L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. **BMC Ecology**, v. 4, p. 1–11, 2004.

SONG, X. B. et al. Genetic polymorphisms of 9 non-combined of DNA index system short tandem repeat loci of Chinese Tibetan ethnic minority group in Tibet. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 4, p. 356–357, 2011.

STEINKELLNER, H. et al. Conservation of (GA)(n) microsatellite loci between *Quercus* species. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 12, p. 1189–1194, 1997.

SWARTZ, M.; KRULL, I. **Handbook of Analytical Validation**. [s.l.] CRC Press, 2012.

SZABOLCSI, Z. et al. Constructing STR Multiplexes for Individual Identification of Hungarian Red Deer. **JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES**, v. 59, n. 4, p. 1090–1099, jul. 2014.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TAVARES, E. S.; BAKER, A. J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2008.

TAYLOR, D.; BRIGHT, J. A.; BUCKLETON, J. Interpreting forensic DNA profiling evidence without specifying the number of contributors. **Forensic Science International: Genetics**, v. 13, p. 269–280, 2014.

THITARAM, C. et al. Social group formation and genetic relatedness in reintroduced Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 172, p. 52–57, 2015.

TIZARD, J. et al. DNA barcoding a unique avifauna: An important tool for evolution, systematics and conservation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

TROUWBORST, A. et al. International Wildlife Law: Understanding and Enhancing Its Role in Conservation. **BioScience**, v. 67, n. 9, p. 784–790, 2017.

UN. Human Development Indices and Indicators. 2018 Statistical Update. **United Nations Development Programme**, v. 27, n. 4, p. 123, 2018.

- UNODC. **Crime Scene and Physical Evidence Awareness**. New York: [s.n.].
- UNODC. **World Wildlife Crime Report**. [s.l: s.n.].
- UNPD. **National Human Development Report 2018**. USA: [s.n.].
- VAN HOPPE, M. J. C. et al. SkydancerPlex: A novel STR multiplex validated for forensic use in the hen harrier (*Circus cyaneus*). **Forensic Science International: Genetics**, v. 22, p. 100–109, 2016.
- VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.
- VUCICEVIC, M. et al. Sex Determination in 58 Bird Species and Evaluation of CHD Gene as a Universal Molecular Marker in Bird Sexing. **Zoo Biology**, v. 32, n. 3, p. 269–276, 2013.
- WANG, J. Computationally efficient sibship and parentage assignment from multilocus marker data. **Genetics**, v. 191, n. 1, p. 183–194, 2012.
- WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls. **BioEssays**, v. 29, n. 2, p. 188–197, 2007.
- WEBB, J. T. PROSECUTING WILDLIFE TRAFFICKERS: IMPORTANT CASES, MANY TOOLS, GOOD RESULTS. In: **Res Communes**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 1–52.
- WESSELINK, M.; KUIPER, I. Individual identification of fox (*Vulpes vulpes*) in forensic wildlife investigations. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, n. 1, p. e214–e215, 2011.
- WHITE, C. L.; DUSEK, R. J. Wildlife Specimen Collection, Preservation, and Shipment. **Book 15, Field Manual of Wildlife Diseases**, p. 24, 2015.
- WHITE, N. E. et al. Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian black-cockatoos (*Calyptorhynchus* spp.). **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 5, p. 664–670, 2012.
- WORLD WIDELIFE FUND. **Traffic: The Wildlife Trade Monitoring network**. Disponível em: <worldwildlife.org>.
- YADONG, G. et al. Identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) based on COI gene in China. **Romanian Journal of Legal Medicine**, v. 18, n. 3, p. 217–224, 2010.
- YEE, E. Y. S. et al. Molecular sex identification of painted storks (*Mycteria leucocephala*): using FTA cards, horizontal PAGE and quick silver staining. **Journal**

**of Genetics**, v. 93, n. December, p. 15–18, 2016.

ZUCOLOTO, R. B. Desenvolvimento de seqüências de DNA microssatélite para estudo de populações remanescentes de Jacaré-de-Papo-Amarelo ( *Caiman latirostris* ), da região central do estado de São Paulo PIRACICABA Estado de São Paulo - Brasil Janeiro - 2003 Desenvolvimento d. 2003.



## **10. APÊNDICE**

**10.1 Apêndice 1: *Draft* do artigo da Meta-Análise (Sometido para publicação e não incluso neste documento)**

## 10.2 Apêndice 2: Tabela de amostras utilizadas nas análises moleculares

Codigo	Lugar de coleta	Identificação da sp	Análises de parentesco	Material Coletado
5	1	x		Sangue ulnar
6	1	x		Sangue ulnar
7	1	x		Sangue ulnar
8	1	x		Sangue ulnar
9	1	x		Sangue ulnar
15	2	x		Sangue ulnar
17	2	x		Sangue ulnar
18	2	x		Sangue ulnar
20	2	x		Sangue ulnar
23	6	x		Sangue ulnar
29	3		x	Sangue ulnar
30	3		x	Sangue ulnar
31	3		x	Sangue ulnar
32	3		x	Sangue ulnar
35	3		x	Sangue ulnar
36	3		x	Sangue ulnar
40	3		x	Sangue ulnar
41			x	Sangue ulnar
42			x	Sangue ulnar
43			x	Sangue ulnar
44			x	Sangue ulnar
45			x	Sangue ulnar
46			x	Sangue ulnar
53	6	x	x	Sangue ulnar
54	6	x	x	Sangue ulnar
55	6	x	x	Sangue ulnar
56	6	x	x	Sangue ulnar
57			x	Sangue ulnar
58			x	Sangue ulnar
59			x	Sangue ulnar
63	6	x	x	Sangue ulnar
64	6	x		Sangue ulnar
65	6	x		Sangue ulnar
66	6	x		Sangue ulnar
67	6	x		Sangue ulnar
70	7	x	x	Sangue ulnar
71			x	Sangue ulnar
72			x	Sangue ulnar
73			x	Sangue ulnar
74			x	Sangue ulnar
75			x	Sangue ulnar
76			x	Sangue ulnar
80	MZUSP	x		Tecido

81	MZUSP	x		Tecido
83	MZUSP	x		Tecido
85	MZUSP	x		Tecido
86	MZUSP	x		Tecido
87	MZUSP	x		Tecido
89	MZUSP	x		Tecido
93			X	
94	5	x	X	Sangue ulnar
955			X	
96			X	
97			X	
98			X	
99			X	
100			X	
101			X	
102	8	x		Sangue ulnar
103	8	x		Sangue ulnar
104	8	x		Sangue ulnar
108	MZUSP	x		Tecido
111	MZUSP	x		Tecido
112	MZUSP	x		Tecido
113	MZUSP	x		Tecido
114	MZUSP	x		Tecido
115	MZUSP	x		Tecido
116	MZUSP	x		Tecido
117	MZUSP	x		Tecido
118	MZUSP	x		Tecido
120	MZUSP	x		Tecido
121	MZUSP	x		Tecido
122	MZUSP	x		Tecido
123	MZUSP	x		Tecido
124	MZUSP	x		Tecido
125	MZUSP	x		Tecido
126	MZUSP	x		Tecido

### 10.3 Apêndice 3: Tabela detalhada com as informações das amostras utilizadas

Código/ Accession number	Lugar de coleta	Taxonomia cadastrada no SISPASS			Taxonomia molecular			Material Coletado	Pais	Estado	Latitude	Longitude
5	1	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
6	1	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
7	1	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
8	1	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
9	1	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
15	2	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
17	2	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
18	2	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
20	2	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.14	-47.81
23	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
53	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
54	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
55	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
56	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
63	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
64	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
65	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
66	6	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>	<i>brasiliensis</i>	<i>Sicalis</i>	<i>flaveola</i>		Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89

67	6	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
70	7	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-22.02	-47.89
80	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
81	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
83	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
85	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
86	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
87	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
89	MZUSP	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	Tecido	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
94	5	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-23.59	-46.61
102	8	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.15	-47.81
103	8	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.15	-47.81
104	8	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	Sangue ulnar	Brazil	São Paulo	-21.15	-47.81
108	MZUSP	<i>Sicalis citrina</i>	<i>Sicalis citrina</i>	Tecido	Brazil	Goiás	NI	NI
111	MZUSP	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	Tecido	Brazil	Pará	-9.73	-50.18
112	MZUSP	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	Tecido	Brazil	Pará	-9.88	-50.26
113	MZUSP	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	Tecido	Brazil	Pará	-9.88	-50.26
114	MZUSP	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	Tecido	Brazil	Pará	-9.78	-50.2
115	MZUSP	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	Tecido	Brazil	Pará	-9.78	-50.2
116	MZUSP	<i>Sicalis columbiana goeldii</i>	<i>Sicalis columbiana goeldi</i>	Tecido	Brazil	Amazonas	-3.68	-59.09
117	MZUSP	<i>Sicalis columbiana goeldii</i>	<i>Sicalis columbiana goeldi</i>	Tecido	Brazil	Pará	-1.61	-52.76
118	MZUSP	<i>Sicalis columbiana goeldii</i>	<i>Sicalis columbiana goeldi</i>	Tecido	Brazil	Rondônia	-9	-61.9
120	MZUSP	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	Tecido	Brazil	Minas Gerais	-20.73	-44.54
121	MZUSP	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	Tecido	Brazil	ND	NI	NI
122	MZUSP	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	Tecido	Brazil	ND	NI	NI
123	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	Mato Grosso do Sul	NI	NI
124	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	Mato Grosso do Sul	NI	NI
125	MZUSP	<i>Sicalis flaveola valida</i>	<i>Sicalis flaveola valida</i>	Tecido	Brazil	Mato Grosso do Sul	NI	NI

126	MZUSP	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	Tecido	Brazil	Minas Gerais	-20.8	-44.8
127	MZUSP	<i>Sicalis flaveola pelzelni</i>	<i>Sicalis flaveola pelzelni</i>	Tecido	Brazil	Mato Grosso	-14.99	-59.92
AWCB004-09	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola pelzelni</i>	<i>Sicalis flaveola pelzelni</i>				-31.89	-58.24
AWCB054-09	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>				-31.89	-58.24
KAARG051-07	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>				-23.91	-65.48
KAARG055-07	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>				-25.92	-67.36
KAARG602-07	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>				-25.12	-58.33
KBAR279-06	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>				-23.9	-65.47
KBAR280-06	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>				-23.27	-65.75
KBAR281-06	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>				-41.15	-70.41
KBAR282-06	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>				-41.15	-70.41
KBAR283-06	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>				-41.15	-70.41
KBAR285-06	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>				-23.28	-65.76
KBAR310-06	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>				-41.15	-70.41
KBAR391-06	BOLD Systems	<i>Sicalis luteocephala</i>	<i>Sicalis luteocephala</i>				-22.14	-22.14
KBAR600-06	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>				-39.45	-62.7
KBAR624-06	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>				-24.16	-65.32
KBAR625-06	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>				-24.16	-65.32
KBAR744-06	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>				-25.92	-67.36
KBAR745-06	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>				-25.92	-67.36
KBAR785-06	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>				-27.55	-58.68
KBAR786-06	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>				-27.55	-58.68
KBAR811-06	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>				-27.55	-58.68
KBAR816-06	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>				-27.55	-58.68

KBARG358-07	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>	-40.83	-65.11
KPARG004-08	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>	-39.45	-62.7
KPARG006-08	BOLD Systems	<i>Sicalis luteola</i>	<i>Sicalis luteola</i>	-39.45	-62.7
KPARG030-08	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>	-23.91	-65.48
KPARG040-08	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>	-23.27	-65.76
KPARG043-08	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>	-25.92	-67.36
KPARG044-08	BOLD Systems	<i>Sicalis olivascens</i>	<i>Sicalis olivascens</i>	-25.92	-67.36
KPARG085-08	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	-27.55	-58.68
KPARG115-08	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	-27.58	-58.66
KPARG338-08	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	-34.55	-58.5
KPARG346-08	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	-34.55	-58.5
BBB356-13	BOLD Systems	<i>Sicalis flaveola</i>	<i>Sicalis flaveola</i>	-15.98	-39.95

Nota: As siglas correspondem a não identificado (NI)

### 10.3 Apêndice 4: Resultados da análise de maternidade utilizando o LOD Score

	Offspring ID	Loci typed	First parent non-exclusion probability	Second parent non-exclusion probability	Father ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Candidate mother ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Pair top LOD	Pair confidence	Trio loci compared	Trio loci mismatching	Trio LOD score	Trio top LOD	Trio confidence	
Família 1	31	5	0,526		0,281	29	4	4	0	0,479	30	5	5	1	-0,799	-0,799	-	5	1	-0,677	-0,677	-
	32	4	0,839		0,119	29	4	4	0	0,068	30	5	4	0	1,040	1,040	+	4	0	1,450	1,450	+
	36	6	0,548		0,292	29	4	4	0	0,479	30	5	5	1	-0,799	-0,799	-	5	1	-0,677	-0,677	-
Família 2	43	4	0,731		0,308	41	4	4	1	-1,140	42	4	4	0	0,195	0,195	+	4	1	1,290	1,290	+
Família 3	44	4	0,443		0,301	43	4	4	0	-0,204	42	4	4	0	0,436	0,436	-	4	0	0,827	0,827	-
Família 4	56	4	0,735		0,980	53	5	4	1	-0,894	54	5	3	1	-0,920	0		3	1	-0,336	0	
	56	4	0,735		0,980	53	5	4	1	-0,894	55	5	3	1	-0,920	0		3	1	-0,336	0	



Familia 5	57	6	0,499	0,666	53	5	5	1	-0,755	55	5	5	1	-0,287	-0,287	-	5	1	0,312	0,312	-
	58	6	0,413	0,241	53	5	5	2	-2,330	54	5	5	1	-0,25	-0,25	-	5	3	-0,299	-0,299	-
	59	6	0,607	0,215	53	5	5	1	-1,030	55	5	5	2	-2,08	-2,08	-	5	3	-1,82	-1,82	-
	70	6	0,307	0,169	75	6	6	1	-0,89	72	5	5	0	0,671	0,671	-	5	1	0,714	0,714	+
	71	5	0,660	0,165	75	6	5	0	-0,345	72	5	4	0	-0,366	-0,366	-	4	0	0,351	0,351	-
	73	5	0,454	0,323	75	6	5	1	-1,320	72	5	5	1	-1,05	0,00E+00		5	1	-0,0608	-0,0608	-
76	5	0,584	0,327	75	6	4	0	0,323	74	6	4	1	-0,926	0,00E+00		4	1	-0,651	-0,651	-	

## 10.4 Apêndice 5: Resultados da análise de paternidade utilizando o LOD Score

	Offspring ID	Loci typed	First parent non-exclusion probability	Second parent non-exclusion probability	Mother ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Candidate father ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Pair top LOD	Pair confidence	Trio loci compared	Trio loci mismatching	Trio LOD score	Trio top LOD	Trio confidence
Família 1	31	5	0,526	0,822	30	5	5	1	-0,799	29	4	4	0	0,479	0,479	-	4	0	0,601	0,601	+
	32	4	0,839	0,839	30	5	4	0	1,04	29	4	4	0	0,068	0,0672	+	4	0	0,475	0,475	+
	36	6	0,548	0,731	30	5	5	1	-0,799	29	4	4	0	0,479	0,479	-	4	0	0,601	0,601	+
Família 2	43	4	0,731	0,134	42	4	4	0	0,195	41	4	4	1	-1,14	-1,14	-	4	1	-0,0396	-0,0396	+
Família 3	44	4	0,443	0,213	42	4	4	0	0,436	41	4	4	2	-2,4	-2,4	-	4	3	-3,13	-3,13	-
Família 6	95	4	0,175	0,572	94	3	3	1	-0,661	98	4	4	2	-2,14	-2,14	-	4	2	-1,57	-1,57	-
	95	3	0,770	0,770	94	3	2	0	0,361	98	4	3	0	-0,271	-0,271	-	3	0	-0,281	-0,281	-
	95	3	0,582	0,237	94	3	2	0	0,582	93	4	3	1	-0,918	0,00E+00	-	3	1	-0,526	-0,526	-
Família 7	100	6	0,120	0,278	99	6	6	3	-3,36	98	6	6	1	-0,805	-0,805	-	6	3	0,216	0,216	-
	101	6	0,408	0,117	99	6	6	0	0,756	98	6	6	0	-0,512	-0,512	-	6	1	-0,568	-0,568	-

## 10.5 Apêndice 5. Resultados da análise de maternidade utilizando o Delta Score

	Offspring ID	Loci typed	First parent non-exclusion probability	Second parent non-exclusion probability	Father ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Candidate mother ID	Loci typed	Pair loci compared	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Pair Delta	Pair confidence	Trio loci compared	Trio loci mismatching	Trio LOD score	Trio Delta	Trio confidence
Família 4	56	4	0,735	0,980	53	5	4	1	-0,894	54	5	3	1	-0,920	0		3	1	-0,336	0	
	56	4	0,735	0,980	53	5	4	1	-0,894	55	5	3	1	-0,920	0		3	1	-0,336	0	
	57	6	0,499	0,666	53	5	5	1	-0,755	55	5	5	1	-0,287	0		5	1	0,312	0,312	-
	58	6	0,413	0,241	53	5	5	2	-2,330	54	5	5	1	-0,250	0		5	3	-0,299	0	-
	59	6	0,607	0,215	53	5	5	1	-1,030	55	5	5	2	-2,080	0		5	3	0	0	-
Família 5	70	6	0,307	0,169	75	6	6	1	-0,890	72	5	5	0	0,671	0,671	+	5	1	0,714	0,714	+
	71	5	0,66	0,165	75	6	5	0	-0,345	72	5	4	0	-0,366	0		4	0	0,351	0,351	+
	73	5	0,454	0,323	75	6	5	1	-1,320	72	5	5	1	-1,050	0		5	1	-0,061	0	
	76	4	0,584	0,327	75	6	4	0	0,323	74	6	4	1	-0,926	0		4	1	-0,651	0	