

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Genética,
Programa de Pós-Graduação em Genética

Grécia Mikhaela Nunes de Lima

**Desenvolvimento De Novos Marcadores Microssatélites Para Estudos
Genéticos De Bicudo Verdadeiro E Análise Genética De Espécies De Bicudos
Em Cativeiro Em Minas Gerais Utilizando Marcador Mitocondrial**

Belo Horizonte

2021

Grécia Mikhaela Nunes de Lima

Desenvolvimento De Novos Marcadores Microssatélites Para Estudos Genéticos De Bicudo Verdadeiro E Análise Genética De Espécies De Bicudos Em Cativo Em Minas Gerais Utilizando Marcador Mitocondrial

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte

2021

043

Lima, Grécia Mikhaela Nunes de.

Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para estudos genéticos de bicudo verdadeiro e análise genética de espécies de bicudos em cativeiro em Minas Gerais utilizando marcador mitocondrial [manuscrito] / Grécia Mikhaela Nunes de Lima. – 2021.

46 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Bicudo (Ave). 3. Repetições de Microssatélites. 4. DNA Mitocondrial. I. Kalapothakis, Evanguedes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO / TESE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	312/2021 entrada
Grécia Mikhaela Nunes de Lima	2º/2019 CPF: 088.002.586-70

Às quatorze horas do dia **30 de julho de 2021**, reuniu-se remotamente, devido ao isolamento social decorrente da pandemia de COVID-19, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Desenvolvimento De Novos Marcadores Microssatélites Para Estudos Genéticos De Bicudo Verdadeiro E Análise Genética De Espécies De Bicudos Em Cativeiro Em Minas Gerais Utilizando Marcador Mitocondrial**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Evanguedes Kalapothakis**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Evanguedes Kalapothakis	UFMG	494.307.426-04	Aprovada
Daniel Ambrózio da Rocha Vilela	IBAMA	972.409.586-04	Aprovada
Mariana Pires de Campos Telles	UFG	659.506.581-91	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de julho de 2021.

Evanguedes Kalapothakis (UFMG)

Daniel Ambrózio da Rocha Vilela (IBAMA)

Mariana Pires de Campos Telles (UFG)

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Ambrózio da Rocha Vilela, Usuário Externo**, em 02/08/2021, às 22:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Pires de Campos Telles, Usuário Externo**, em 03/08/2021, às 12:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Presidente**, em 10/08/2021, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0862273** e o código CRC **144F179B**.

Referência: Processo nº
23072.238488/2021-31

SEI nº
0862273



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Desenvolvimento De Novos Marcadores Microssatélites Para Estudos Genéticos De Bicudo Verdadeiro E Análise Genética De Espécies De Bicudos Em Cativeiro Em Minas Gerais Utilizando Marcador Mitocondrial"

Grécia Mikhaela Nunes de Lima

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Evanguedes Kalapothakis
UFMG

Daniel Ambrózio da Rocha Vilela
IBAMA

Mariana Pires de Campos Telles
UFG

Belo Horizonte, 30 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Ambrózio da Rocha Vilela, Usuário Externo**, em 02/08/2021, às 22:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Pires de Campos Telles, Usuário Externo**, em 03/08/2021, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evanguedes Kalapothakis, Presidente**, em 10/08/2021, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0862291** e o código CRC **1C423ED9**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar oportunidades e capacidade

Ao Daniel Vilela, por ter acreditado em mim e me dar a oportunidade de enfrentar os desafios deste projeto tão importante

Ao Evanguedes Kalapothakis pela orientação e conselhos durante o trabalho

À minha família pelo apoio nos momentos mais difíceis e por acreditarem em mim

Ao Marco Alves que além de colega de trabalho é um grande amigo que acompanhou essa jornada de perto e me consolou em diversos momentos que eu não via saída

A todos os colaboradores da WAITA que também confiaram a mim essa parte tão importante do projeto

Aos analistas do IBAMA e IEF que contribuíram para a realização deste trabalhosa

Ao meu parceiro de bancada Marcos Amorim, pelo apoio e troca de conhecimentos e por ter confirmado que pelo menos não sou um vampiro (risos)

Aos colegas do LBMM que me ajudaram muito na bancada e me ensinaram muitas coisas novas

RESUMO

O bicudo verdadeiro (*Sporophila maximiliani*) é uma ave bastante admirada entre os apreciadores de aves canoras de gaiola, principalmente na região central do Brasil. A espécie é considerada criticamente ameaçada no Brasil, estando extinta nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Em contraste, a população de bicudos legalmente em cativeiro é bastante significativa, com mais de 300 mil indivíduos. Conhecer a situação genética do bicudo é essencial para a tomada de decisões antes da soltura, uma vez que mesmo com as características físicas próximas de indivíduos de vida livre, sua diversidade genética ou a presença de híbridos pode prejudicar a sobrevivência da espécie na natureza a longo prazo. Por isso o desenvolvimento de marcadores moleculares que permitem avaliar a diversidade genética e a presença de possíveis híbridos, é essencial para a condução de programas de reintrodução de forma segura e bem sucedidas a longo prazo. Este trabalho teve por objetivo padronizar marcadores microsatélites compatíveis com a tecnologia NGS e analisar sequências de COI de espécimes em cativeiro de Minas Gerais. Foram desenhados 50 pares de primers e submetidos a PCRs em diferentes condições, dos quais 13 foram padronizados, sendo a maioria sensível a pequenas quantidades de DNA e pouco específicas; o que pode ser útil para futuros estudos com outras espécies do gênero. Foram analisadas 119 sequências do gene mitocondrial COI e três espécies: *S. atrirostris*, *S. crassirostris* e *S. maximiliani*. Não foi observado um agrupamento entre as espécies, podendo estar relacionada com a hibridização em cativeiro, devido à dificuldade de identificação das fêmeas de diferentes espécies, também não foi observada uma estruturação genética dentro dos criatórios, provavelmente devido ao fluxo gênico devido à transferência de animais entre esses locais. Com isso, novos estudos com diferentes marcadores precisam ser realizados a fim se conhecer melhor a situação genética da espécie em cativeiro.

Palavras-chave

***Sporophila maximiliani*, microsatélites, NGS, mtDNA.**

ABSTRACT

The Great-Billed Seedfinch (*Sporophila maximiliani*) is a widely admired bird among cage songbird lovers, especially in central Brazil. The species is considered critically endangered in Brazil, being extinct in the states of Rio de Janeiro and São Paulo. In contrast, its population legally in captivity is quite significant, with more than 300,000 individuals. Knowing the boll weevil's genetic status is essential for decision-making before release, since even with physical characteristics close to free-living individuals, its genetic diversity or the presence of hybrids can affect the species' long-term survival in the wild. term. Therefore, the development of molecular markers that allow the assessment of genetic diversity and the presence of possible hybrids is essential for conducting safe and successful long-term reintroduction programs. This work aimed to standardize microsatellite markers compatible with NGS technology and analyze COI sequences from specimens in captivity from Minas Gerais. Fifty pairs of primers were designed and submitted to PCRs under different conditions, of which 13 were standardized, most being sensitive to small amounts of DNA and not very specific; which can be useful for future studies with other species of the genus. 119 sequences of the mitochondrial COI gene and three species were analyzed: *S. atrirostris*, *S. crassirostris* and *S. maximiliani*. A grouping between species was not observed, which may be related to hybridization in captivity, due to the difficulty in identifying females of different species, nor was there a genetic structure within the breeding sites, probably due to the gene flow due to the transfer of animals between these locations. Thus, new studies with different markers need to be carried out in order to better understand the genetic status of the species in captivity.

Keywords

***Sporophila maximiliani*, Microsatellites, NGS, mtDNA.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Machos de <i>A-S. maximiliani</i> , <i>B-S. atirostris</i> e <i>C-S. crassirostris</i> destacando as características morfológicas das espécies.	11
Figura 2: Visualização de amostras de DNA extraídas de <i>S. maximiliani</i>	19
Figura 3: Resultado do primeiro teste dos marcadores.	20
Figura 4: Resultado do teste de baixa estrigência com os primers com adaptadores em gel de agarose 2%.	21
Figura 5: Imagens cortadas de géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata, comparando diferenças entre os mesmos marcadores antes e depois de adicionar a sequência adaptadora.	21
Figura 6: Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata com os marcadores selecionados para a análise de polimorfismo.	22
Figura 7: Géis de agarose 2% com resultados de testes com diferentes quantidades de DNA.	23
Figura 8: Gel de agarose 2% com resultados do teste de especificidade.	25
Figura 9: Árvore Neighbour-Joining com todas as sequências de COI deste estudo e as sequências adicionais disponíveis no GenBank.	29
Figura 10: Rede de haplótipos do gene COI.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificações dos primers padronizados e selecionados para o sequenciamento. Nome de cada marcador, motifs de repetição, sequências dos primers, TA: temperatura de ideal de anelamento, quantidade de DNA ideal para amplificação escolhida para o preparo das bibliotecas de sequenciamento, quantidade mínima de DNA para amplificação do marcador em uma reação com 35 ciclos, porcentagem de DMSO utilizada em alguns marcadores, nomes das espécies do gênero <i>Sporophila</i> testados em que “+” indica a amplificação e “-” não amplificação.	27
Tabela 2: Lista dos criatórios com suas respectivas cidades, onde foram coletados dados morfológicos e amostras biológicas e número de sequências obtidas de <i>S. atirostris</i> , <i>S. crassirostris</i> e <i>S. maximiliani</i> . As coletas e o sequenciamento foram realizados por Mesquita (2018).	28
Tabela 3: AMOVA de <i>S. maximiliani</i> entre grupos de diferentes criatórios.	32

LISTA DE ABREVIATURA

°C	Graus Celsius.
BH	Belo Horizonte
cm	Centímetros
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético.
IUCN	International Union for Conservation of Nature.
LBMM	Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares.
M	Molar.
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio.
mA	miliampere
mL	Mililitro.
mtDNA	DNA mitocondrial
µL	Microlitro
ng	Nanograma
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
pb	Pares de bases.
PCR	Reação em cadeia da polimerase.
Pmol	Picomol
<i>S. atirostris</i>	<i>Sporophila atirostris</i>
<i>S. crassirostris</i>	<i>Sporophila crassirostris</i>
<i>S. maximiliani</i>	<i>Sporophila maximiliani</i>
<i>S. m. parkesi</i>	<i>Sporophila maximiliani parkesi</i>
<i>S. m. maximiliani</i>	<i>Sporophila maximiliani maximiliani</i>
TE	Tris EDTA.
V	Voltagem.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1.INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Sporophila maximiliani</i>	9
1.2 <i>Genética da Conservação</i>	12
3.OBJETIVOS	15
3.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	15
3.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 <i>Coleta material biológico</i>	16
4.2 <i>Extração de DNA</i>	16
4.3 <i>Busca de Microsatélites</i>	16
4.4 <i>Teste de sensibilidade dos marcadores selecionados</i>	17
4.5 <i>Teste de especificidade</i>	18
4.6 <i>Análises mtDNA</i>	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 <i>Extração de DNA das amostras coletadas no CETAS-BH</i>	19
5.2 <i>Teste de sensibilidade dos marcadores selecionados</i>	20
5.3 <i>Teste de especificidade</i>	24
5.3 <i>Análise mtDNA de animais em cativeiro</i>	26
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1.INTRODUÇÃO

1.1 *Sporophila maximiliani*

O gênero *Sporophila* compõe um grupo diversificado de espécies de aves granívoras, distribuídas do sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (Meyer de Schauensee, 1952). As espécies deste gênero possuem como características marcantes um pequeno tamanho corporal, bicos grossos e curtos e forte dimorfismo sexual, em que os machos apresentam a plumagem tipicamente colorida e as fêmeas são muito parecidas e de cores pardas e monótonas (Ridgely & Tudor, 1989).

A maior parte das classificações taxonômicas do gênero utilizaram o padrão de plumagem do macho como critério de organização (Meyer de Schauensee, 1970; Ridgely & Tudor, 1989; Stiles, 1996). Apesar da incerteza da taxonomia do grupo desde sua descrição inicial (Hellmayr 1938, Meyer de Schauensee 1952, Burns et al. 2002), filogenias moleculares confirmaram que o gênero se agrupa em um clado monofilético, incluindo os gêneros *Oryzoborus* e *Dolospingus* que se mostraram fortemente relacionados (Lijtmaer et al. 2004, Robbins et al. 2005). Desta forma, diversos autores têm sugerido que os gêneros *Oryzoborus* e *Dolospingus* deveriam compor um único grupo, juntamente com *Sporophila* (Sato et al., 2001; Burns et al. 2002, Lijtmaer et al., 2004). Benites e colaboradores criticaram esta reorganização do grupo pela insuficiência de amostras em trabalhos relacionados com os gêneros *Oryzoborus* e *Sporophila*. Mason & Burns (2013) apresentam um trabalho mais abrangente sobre filogenia molecular do grupo, o qual inferiram um clado bem fundamentado, que suportou todas as seis espécies que até então eram alocadas no gênero *Oryzoborus*, sendo foi incluído dentro de *Sporophila*.

Em classificações mais antigas deste grupo de aves, os bicudos que apresentavam a coloração de bico branco e os bicudos com a cor de bico preto eram considerados parte do complexo de espécies *S. crassirostris* (Meyer de Schauensee, 1970; Peters, 1970), no entanto, em taxonomias mais recentes (Ridgely & Tudor, 1994; Jaramillo & Sharpe, 2017) o bicudo de bico preto (*S. a. atrirostris* e *S. a. gigantirostris*), o bicudinho do norte (*S. c. crassirostris* e *S. c. occidentalis*) e o bicudo

da nicaragua (*S. nuttingi*) são considerados como taxa separados do bicudo verdadeiro *S. maximiliani* (Ubaid et al., 2018).

Sporophila maximiliani (Cabanis, 1851), popularmente conhecido como “bicudo” ou “bicudo verdadeiro”, é uma ave bastante admirada entre os apreciadores de aves canoras de gaiola, principalmente na região central do Brasil (Straube & Uben-Filho, 2009). O seu tamanho corporal é de aproximadamente 15 cm de comprimento. Os machos apresentam coloração quase totalmente negra com penas reluzentes e reflexos azuis esverdeados, que pode variar de acordo com a luz incidente nas penas e as coberteiras inferiores das asas e axilares são brancas, onde ainda é possível notar uma pequena mancha branca (Ridgely & Tudor, 1989; Sick, 1997; Straube & Uben-Filho, 2008). O bico é alto e grosso com coloração branco-marfim e apresenta uma estrutura óssea irregular e chanfrada, que lhe dá uma aparência rajada, além de ser desproporcional ao tamanho da cabeça. Os jovens e as fêmeas apresentam coloração parda, com um tom mais escuro no dorso e as partes inferiores das asas esbranquiçadas, porém a coloração do bico diverge ao do macho adulto, apresentando uma coloração escura (Ridgely & Tudor, 1989; Sick, 1997; Straube & Uben-Filho, 2009). São territorialistas monogâmicos e procriam pouco, sendo dois ovos por ano em média (Sick, 1997; Tostes, 1997). Também existem registros de formação de híbridos de bicudo com curió (*Sporophila angolensis*), conhecido como “bicurió” (Sick, 1997).

As subespécies *S. m. parkesi* (Cabanis) e *S. m. maximiliani* Olson, reconhecidas por alguns autores como bicudo verdadeiro, têm ocorrência quase que restrita ao Cerrado, com distribuição local e irregular nos estados brasileiros de Goiás, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e no leste da Bolívia (Jaramillo & Sharpe, 2017). A subespécie *S. m. parkesi* tem ocorrência que varia do norte da América do Sul, ao leste da Venezuela, do sudeste de Sucre ao sul até o Delta Amacuro, e no norte da Bolívia ao longo da margem sul do rio Orinoco, Guiana Ocidental e extremo norte do Brasil, nos estados do Amapá e Pará (Rising et al., 2011; Ubaid et al., 2018).

Apesar da espécie *S. maximiliani* apresentar uma ampla distribuição, poucos ornitólogos conseguiram visualizar esta espécie em vida livre nas quatro últimas décadas (Medolago et al., 2016), sendo avistada recentemente em Minas Gerais após

80 anos sem registros (Gente, 2020). A espécie foi intensamente caçada por traficantes de animais silvestres, devido ao seu canto melodioso, sua raridade crescente e alto valor de mercado; onde um espécime campeão de torneios de canto pode ser comercializado por dezenas de milhares de reais (Ridgely & Tudor, 1994; Silveira & Straube, 2008; Straube & Urban-Filho, 2009; BirdLife Internacional, 2017). Como resultado da intensa retirada de indivíduos da natureza, o bicudo verdadeiro foi extinto da maioria das áreas de ocorrência natural, e este desaparecimento aconteceu antes que os estudos necessários para produzir informações sobre dados básicos de campo e de história natural fossem conduzidos (Ubaid *et al.*, 2018).



Figura 1: Machos de A-*S. maximiliani*, B-*S. atrirostris* e C-*S. crassirostris* destacando as características morfológicas das espécies.

Dados recentes mostram um número altíssimo de exemplares da espécie *S. maximiliani* mantidos legalmente em cativeiro no Brasil, chegando a mais de 300 mil espécimes (IBAMA, 2017). Este número sugere que os criadores de bicudos já possuem pleno domínio da reprodução da espécie em cativeiro no País. Assim, reproduções direcionadas e monitoradas podem ser uma estratégia de conservação promissora para programas de reintrodução. No entanto, este plano deve ser executado com extremo cuidado, pois hibridações ocorreram de maneira intensiva durante muitas décadas nas reproduções em cativeiro (Ubaid *et al.*, 2018). As razões que levam a hibridação em cativeiro são a dificuldade na identificação das fêmeas de diferentes espécies do grupo, pois estas são morfologicamente muito parecidas e o fato que a grande maioria dos criadores tem praticado o cruzamento interespecífico com intuito de obter aves com características morfológicas desejadas como cor de bico e habilidades de canto (Ubaid *et al.*, 2018). Além disso, a reprodução em cativeiro tende a um aumento da endogamia, reduzindo a variabilidade genética dos indivíduos (Frankham *et al.*, 2002; Arif & Khan 2009).

1.2 Genética da Conservação

A genética da conservação é a aplicação de conhecimentos genéticos em ações de preservação de espécies, e recentemente tem recebido uma maior atenção (Frankham, 2003; Allendorf & Luikart, 2007; Arif & Khan 2009). Nesta área, informações acerca das relações entre indivíduos são especialmente importantes, principalmente em programas de reprodução em cativeiro, que buscam a redução de acasalamentos entre indivíduos aparentados, objetivando a redução da endogamia e a perda da diversidade genética (Frankham *et al.*, 2002; Arif & Khan 2009). A diversidade genética, também conhecida como polimorfismo genético, pode ser descrita como a variação em uma determinada sequência de DNA entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie ou população (Ellegren *et al.*, 2016). Essa diversidade está diretamente relacionada com a habilidade das espécies de se contrapor a mudanças ocorridas no meio ambiente (Frankham, 2003; Ellegren *et al.*, 2016). Uma baixa variação genética também pode ser responsável por uma baixa

aptidão individual, e conseqüentemente uma fraca adaptabilidade (Lande, 1988; Arif & Khan, 2009).

Diversos marcadores moleculares são utilizados na investigação da diversidade genética de uma determinada população, declínio populacional recente e informações sobre história demográfica populacional (Allendorf, 2010; Jackson & Groombridge, 2013). Diferentes histórias evolutivas podem ser reveladas por diferentes genes, o que leva frequentemente a necessidade do uso de diferentes marcadores moleculares com intuito de fornecer informações precisas sobre as relações sistemáticas e taxonômicas de uma espécie (Avice, 2004).

Microssatélites são regiões repetitivas do DNA, compostas por *motifs* de um a seis nucleotídeos, e apresentam elevadas taxas de mutação em relação a outras regiões genome (Jarne & Lagoda, 1996; Field & Wills, 1998; Tóth et al., 2000). São codominantes, sendo possível diferenciar homozigotos de heterozigotos; e os diferentes alelos são caracterizados de acordo com o número de repetições dos motifs, apresentando tamanhos diferentes. Sua taxa de mutação não uniforme, podendo variar entre os *loci*, alelos e espécies diferentes (Estoup & Angers, 1998; Field & Wills, 1998; Tóth et al., 2000). Microssatélites polimórficos são aplicados em diversos estudos como: mapeamento genético, forense, conservação, antropologia molecular, história evolutiva (Buschiazzo and Gemmell, 2006; Chistiakov et al., 2006; Yazbeck and Kalapothakis, 2007; Bhargava and Fuentes, 2010; Guichoux et al., 2011; Jan & Fumagalli; 2016; Costa et al., 2017; Srithawong et al., 2020, Medolago et al. 2020).

O Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) é uma sequência curta de DNAm que segue padrões e características que permitem o seu uso como marcador molecular para execução de identificações rápidas a nível de espécie para diversos grupos de animais (Valentini et al., 2009; Bucklin et al., 2011). Este gene faz parte do complexo que codifica para a enzima Citocromo c oxidase, um polipeptídeo que atua na cadeia de transporte de elétrons presente na membrana interna das mitocôndrias. A sequência do COI representa uma das sete subunidades formadora deste complexo (Patwardhan, 2014). Estudos que utilizam o marcador molecular COI, têm obtido excelentes resultados no processo de discriminação de diversas espécies, o que o transformou em uma importante ferramenta para elucidar casos que necessitam de uma investigação mais profunda, seja em taxonomia ou fenômenos evolutivos. Destes

podemos citar hibridação, radiações recentes, identificação de clados irmãos ou espécies crípticas (Stoeckle & Thaler, 2014; Barreira et al., 2016).

2.JUSTIFICATIVA

Apesar da expressiva população legalmente em cativeiro, com mais de 300 mil indivíduos, o bicudo é considerado criticamente ameaçado no Brasil, sendo considerada extinta nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Machado et al., 2005). Embora existam alguns programas de conservação e de reintrodução da espécie no Brasil (Machado et al., 2019), os estudos relacionados a informações genéticas desta espécie são poucos (Ludwig et al. 2017; Medolago et al., 2018; de Melo et al., 2020), apesar de extremamente importantes para nortear os programas de reprodução em cativeiro, buscar a redução da endogamia e aumentar a diversidade genética. Uma baixa variação genética pode ser responsável por uma baixa aptidão individual, e consequentemente uma fraca adaptabilidade dos indivíduos e populações, condenando todos os esforços de conservação ao fracasso (Frankham *et al.*, 2002; Lande, 1988; Arif & Khan, 2009). Novas tecnologias na genotipagem de microssatélites têm sido utilizadas em genética da conservação (Scheible et al., 2011; Vartia et al., 2015). Com o NGS, milhares de *loci* de microssatélites podem ser identificados em uma única corrida. A genotipagem por sequenciamento (GBS) para sequenciar uma região alvo permite a análise de múltiplas sequências alvo de diferentes amostras simultaneamente, economizando tempo e dinheiro (Van Neste et al., 2012; Narum et al., 2013; König et al., 2015 Pimentel et al., 2018). A mesma pode ser aplicada para outros alvos, como mtDNA. Por meio dessa tecnologia, amostras de diversos espécimes de diferentes criatórios podem ser sequenciadas com vários *loci* em uma única corrida, permitindo uma análise mais abrangente da situação genética de *S. maximiliani* e espécies próximas em cativeiro, auxiliando assim na tomada de decisões nos programas de reintrodução da espécie.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter marcadores microssatélites com alto grau de polimorfismo para *Sporophila maximiliani* que possam ser utilizadas para subsidiar programas de reintrodução da espécie e analisar dados mitocondriais pré-existentes de *Sporophila maximiliani* coletados em criatórios de Minas Gerais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar marcadores microssatélites que forneçam informações sobre a genética de *Sporophila maximiliani* a fim serem utilizados como instrumentos para identificação das variações genéticas entre indivíduos, dentro da espécie e em subespécies correlatas;
- Desenvolver e padronizar uma metodologia eficiente de processamento de amostras de passeriformes para estudos genéticos, incluindo bicudos, por meio da técnica de alto rendimento denominada sequenciamento de nova geração – NGS;
- Avaliar a capacidade do COI de discriminar de espécies morfológicamente próximas à *S. maximiliani*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta material biológico

Foram selecionados para coleta de amostras de sangue, 30 espécimes recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) em Belo Horizonte. Foram coletados aproximadamente 50 μ L de sangue, em microtubos de 0,6 mL contendo 50 μ L de EDTA 0,2M. O sangue foi coletado por meio de um corte na unha do dedo mais longo, com o auxílio de um alicate de unha, em sentido antero-posterior. Após a coleta, o material foi armazenado à -20°C até a extração de DNA.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi conduzida de acordo com o protocolo de extração com Fenol-Clorofórmio, adaptado de Sambrook (2001). Ao final do processo o DNA foi ressuscitado em 30 μ L de TE (Phoneutria - 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM de EDTA). A avaliação do grau de pureza, degradação, presença de contaminantes e concentração do DNA genômico extraído foi conduzida em gel de agarose 0,7% (p/v) em eletroforese, com tampão TBE (Tris Borato EDTA) 1X. Para visualização em transiluminador UV, o gel foi corado com brometo de etídio.

4.3 Busca de Microssatélites

Sequências de DNA de *Sporophila maximiliani*, gerados a partir do sequenciamento de nova geração e disponíveis no banco de dados de bioinformática do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM), foram analisadas *in silico* utilizando-se o programa msatcommander (Faircloth, 2008). Regiões contendo microssatélites foram selecionadas para desenho de primers. O desenho dos primers foi baseado nos seguintes critérios: regiões de microssatélite com no mínimo 7 repetições di, tri ou tetranucleotídeos; primers com alto conteúdo GC (50 a 60%) e sem formação ou baixa formação de dímeros e/ou autoanelamento; e fragmentos com tamanho entre 100 e 300pb.

4.4 Teste de sensibilidade dos marcadores selecionados

O teste de sensibilidade dos primers selecionados foram realizados utilizando-se DNA genômico de *S. maximiliani*, obtido a partir do tecido muscular da ave, macerado com gelo seco até que se tornar um pó bem fino, e submetido posteriormente ao método de extração com proteinase K e fenol clorofórmio (adaptado de Sambrook, 2001). Inicialmente 50 primers foram selecionados e suas sequências enviadas para síntese. Os testes de amplificação foram realizados com baixa estringência, utilizando-se o pré-mix 4B 2X Phoneutria, temperatura de anelamento (TA) de 56°C, 40 ciclos, 10 ng de DNA, para verificação do funcionamento dos primers que foram diluídos para uma concentração de 5 pmol. A ciclagem da PCR incluiu 94°C por 5 min, 35 ciclos a 92°C por 30 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 30 seg e uma extensão final de 72°C por 5 min (Termociclador, modelo VERITI 96-Well Thermal Cycler, 0,2 mL Applied Biosystems© com volume final de 20 µL). Este ciclo foi utilizado nos testes posteriores, alterando-se apenas a temperatura de anelamento (TA). A formação dos produtos foi verificada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo.

Nos primers que geraram amplicons, foram adicionadas sequências complementares ao index presentes nos kits Nextera da Illumina, como descritas a seguir: *Forward* – 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG + sequência específica do *locus* 3' e *Reverse* – 5' 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATG TGTATAAGAGACAG + sequência específica do *locus* 3'. Com estes foram realizados testes de alta estringência, para estabelecimento das melhores condições de amplificação, para que apenas bandas específicas fossem geradas. Estes testes incluíram variação na temperatura de anelamento (56°C a 65°C), concentração de DNA (0.5 a 10 ng), utilização de diferentes concentrações de DMSO (3, 6 e 9% da reação). Os produtos destas reações foram avaliados em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. Após a escolha dos primers, os mesmos serão submetidos a uma primeira análise de genotipagem pelo método de alto rendimento desenvolvido no Miseq (Pimentel et al 2018), utilizando-se em torno de 30 indivíduos distintos de *S. maximiliani*.

4.5 Teste de especificidade

Para avaliar a especificidade dos marcadores, foram realizadas reações com quatro espécies do mesmo gênero *Sporophila*: *S. angolensis* (Curió), *S. plumbea* (Patativa), *S. nigricolis* (Pretinho) e *S. caerulescens* (Coleirinho).

4.6 Análises mtDNA

Foram analisadas apenas as sequências de *COI* geradas no LBMM e publicado por Mesquita (2018). Foram coletadas amostras de 11 criatórios legalizados em distribuídos em Minas Gerais e do CETAS-BH, onde foram coletados dados morfológicos e amostras de sangue para estudos genéticos de *S. maximiliani*, *S. atirostris*, *S. crassirostris* e *S. c. occidentalis*, segundo informações dos criadores e avaliação da morfologia durante as coletas.

As sequências foram filtradas utilizando o software PRINSEQ (Schmieder, 2011). Posteriormente foi realizado a classificação das reads por indivíduo contra o genoma completo do *S. maximiliani* depositado no Genbank (NC_035673). As sequências de *COI* e *Dloop* de cada indivíduo foram realinhadas e individualizadas através do programa Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). As sequências individualizadas foram alinhadas no programa Mega-X (Kumar et al., 2018), utilizando Clustal W (Thompson et al., 1994). A partir do alinhamento gerado foram geradas árvores de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo de distância nucleotídica Kimura 2 parâmetros, para verificar se as espécies correspondiam com a identificação baseada em morfologia.

Os haplótipos foram gerados no software DNAsp (Rosas et al, 2017). Foi também construída uma “rede” haplotípica (*network*) usando-se o algoritmo *Median-joining* (MJ) (Bandelt et al. 1999) com o programa PopArt. (Leigh & Bryant, 2015), Análise de Variância Molecular (AMOVA) no programa Arlequin versão 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) a diversidade genética entre as espécies e entre *S. maximiliani* dos diferentes criatórios para avaliar a presença de uma estruturação e avaliar o potencial discriminatório do marcador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA das amostras coletadas no CETAS-BH

O DNA foi extraído de 30 indivíduos recebidos no CETAS-BH. As amostras foram identificadas de acordo com a numeração de entrada de amostras no banco de DNA do LBMM. A extração foi confirmada por meio da visualização em gel de agarose 0,7% em duas etapas: com placa apenas para verificar a presença de DNA e eletroforese para avaliar a qualidade do DNA. Na primeira etapa, o gel de agarose corado com brometo aquecido é despejado em uma placa de petri para solidificar, em seguida, as placas são levadas à estufa 37°C para secar. Essas placas podem ser utilizadas imediatamente ou embaladas e armazenadas em geladeira por até 15 dias. Para a visualização foi adicionada 0,2 µL de cada amostra direto na placa e a mesma foi coberta com papel alumínio por três minutos e levada ao transiluminador para avaliação da presença de DNA e registro fotográfico (Figura 2). Na segunda etapa o gel é preparado em moldes para eletroforese horizontal e adicionados 2 µL de cada amostra corada com tampão de amostra, a corrida se deu com 180 mA por uma hora. Duas dessas amostras foram utilizadas para a padronização dos microssatélites e o restante foi armazenado a – 20°C para posterior genotipagem.

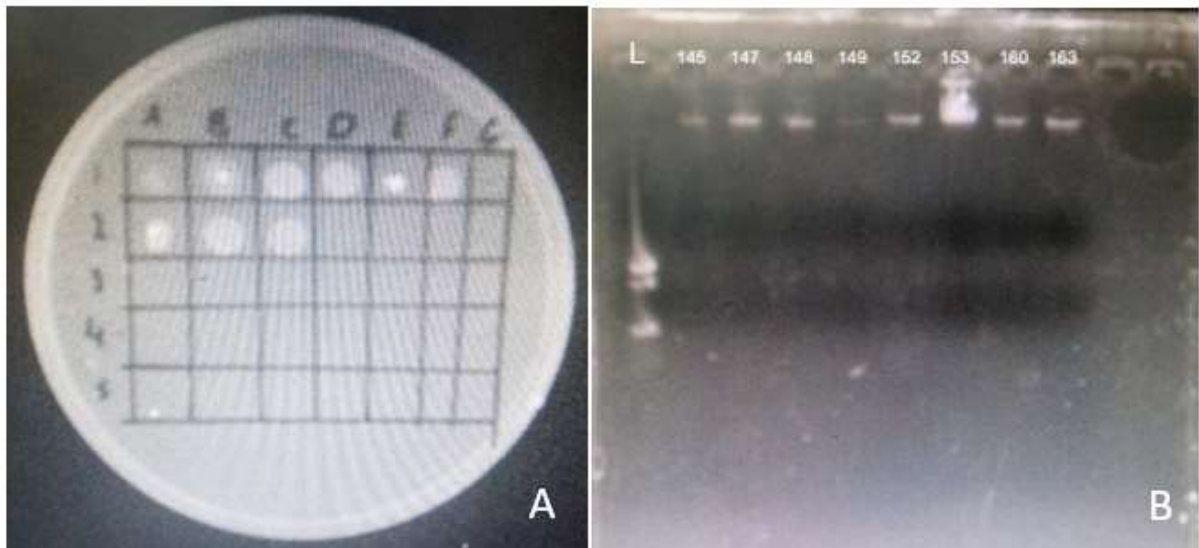


Figura 2: Visualização de amostras de DNA extraídas de *S. maximiliani*, Figura A: placa com gel de agarose 0,7%, onde A1: padrão, B1: AV.145, C1: AV.147, D1: AV.148, E1: AV.149, F1: AV.152, A2: AV.153, B2: AV.160, C2: AV.162. Figura B: as mesmas amostras visualizadas após eletroforese em gel de agarose 0,7% para avaliação da qualidade do DNA obtido.

5.2 Teste de sensibilidade dos marcadores selecionados

No primeiro teste 29 pares de primers apresentaram *amplicons* (Figura 3), estes foram revelados em gel de poliacrilamida para verificar a presença de bandas inespecíficas e se a banda de interesse poderia ser diferenciada. Desses foram selecionados 28 para receberem a sequência de adaptadores. Dos primers com adaptadores, 19 amplificaram (Figura 4) e apresentaram um aumento de bandas inespecíficas e foram submetidos aos testes de alta estrigência conforme descrito em material e Métodos item 4.4. Após esses testes, 13 marcadores foram selecionados para o sequenciamento para análise de polimorfismo (Figura 5).

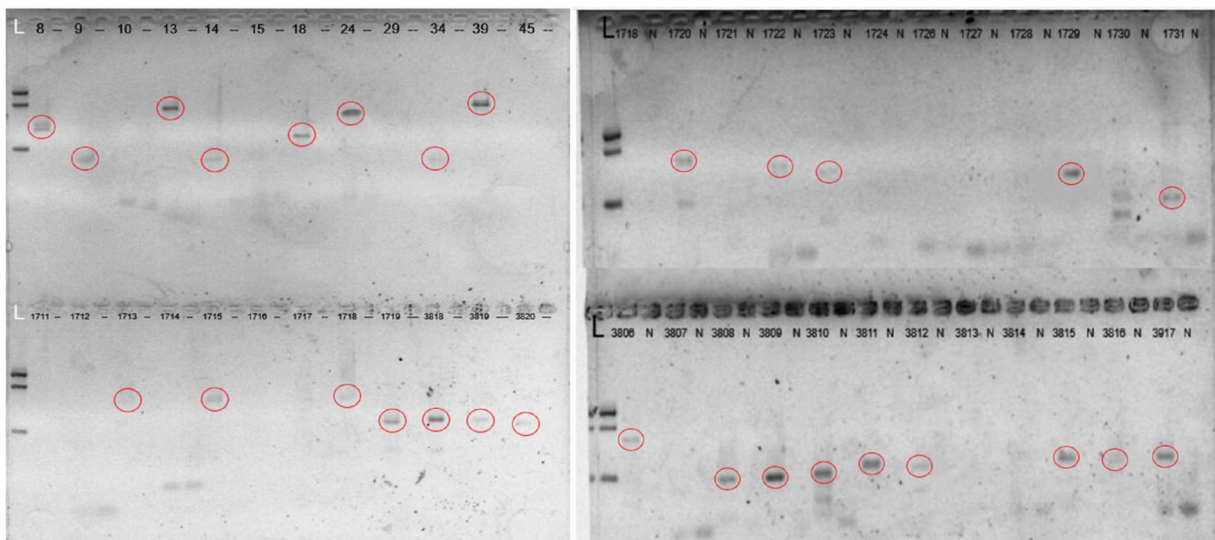


Figura 3: Resultado do primeiro teste dos marcadores com temperatura de anelamento de 56°C, 10 ng de DNA, e reação com 35 ciclos. Os marcadores que amplificaram tiveram suas bandas destacadas com um círculo vermelho. L: Ladder, 8: BIC08, 9: BIC09, 10: BIC10, 13: BIC13,14: BIC14,15: BIC15,18: BIC18, 24: BIC24, 29: BIC29, 34: BIC34, 39: BIC39, 45: BIC45, 1711: BIC1711, 1712: BIC1712, 1713: BIC1713, 1714: BIC1714, 1715: BIC1715, 1716: BIC1716, 1717: BIC1717, 1718: BIC1718, 1719: BIC1719, 1720: BIC1720, 1722: BIC1722, 1724: BIC1724, 1726: BIC1726, 1727: BIC1727, 1728: BIC1728, 1729: BIC1729, 1730: BIC1730, 1731: BIC1731, 3806: BIC3806, 3807: BIC3807, 3808: BIC3808, 3809: BIC3809, 3810: BIC3810, 3811: BIC3811, 3812: BIC3812, 3813: BIC3813, 3814: BIC3814, 3815: BIC3815, 3816: BIC3816, 3817: BIC3817, 3818: BIC3818, 3819: BIC3819, 3820: BIC3820.

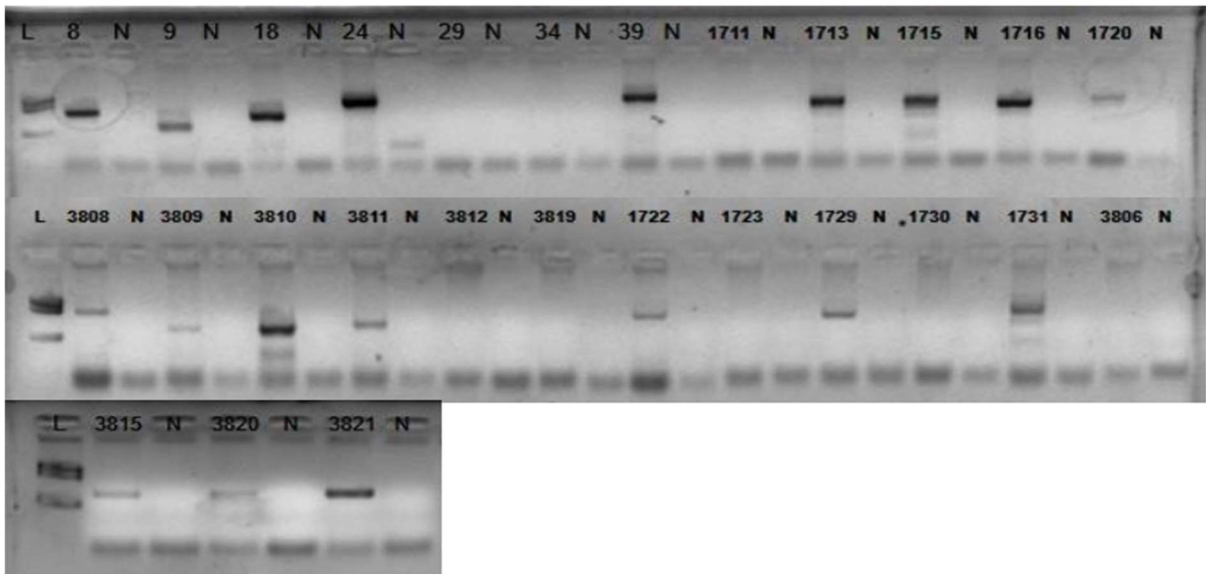


Figura 4: Resultado do teste de baixa estringência com os primers com adaptadores em gel de agarose 2%, e marcador de peso molecular 752 da Phoneutria. Temperatura de anelamento: 56°, DNA: 10 ng. 8: BIC08, 9: BIC09, 18: BIC18, 24: BIC24, 29: BIC29, 34: BIC34, 39: BIC39, 1711: BIC1711, 1713: BIC1713, 1715: BIC1715, 1716: BIC1716, 1720: BIC1720, 3808: BIC3808, 3809: BIC3809, 3810: BIC3810, 3811: BIC3811, 3812: BIC3812, 3819: BIC3819, 1722: BIC1722, 1723: BIC1723, 1729: BIC1729, 1730: BIC1730, 1731: BIC1731, 3806: BIC3806, 3815: BIC3815, 3820: BIC3820, 3821: BIC3821.

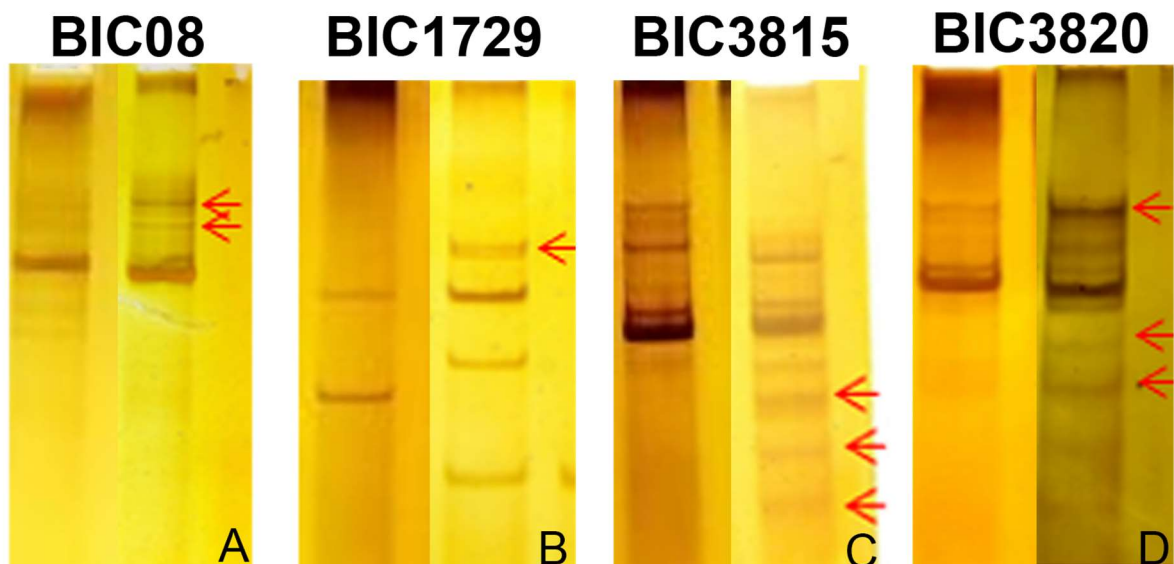


Figura 5: Imagens cortadas de géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata, comparando diferenças entre os mesmos marcadores antes e depois de adicionar a sequência adaptadora. A: BIC08 sem o adaptador (esquerda) e com adaptador (direita); B: BIC1729 sem o adaptador (esquerda) e com adaptador (direita); C: BIC3815 sem o adaptador (esquerda) e com adaptador (direita); D: BIC3820 sem o adaptador (esquerda) e com adaptador (direita). As setas em vermelho destacam as bandas inespecíficas que ficaram mais evidentes e/ou apareceram após a adição dos a

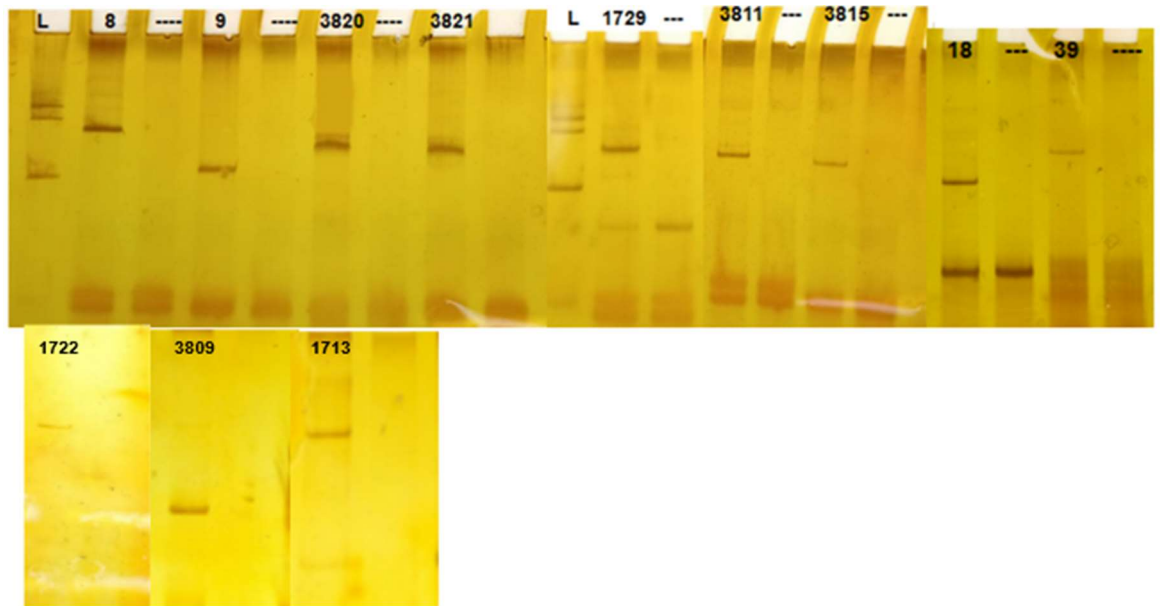


Figura 6: Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata com os marcadores selecionados para a análise de polimorfismo. As reações se seguiram de acordo com as condições descritas na Tabela 1. L: Ladder (Phoneutria 752), 8: BIC08, 9: BIC09, 3820: BIC3820, 3821: BIC3821, 1729: BIC1729, 3811: BIC3811, 3815: BIC3815, 18: BIC18, 39: BIC39, 1722: BIC1722, 3809 :BIC3809, 1713: BIC1713.

Após a padronização dos marcadores, testes com diferentes quantidades de DNA foram realizados, inicialmente com 5 ng e 1ng. Dos marcadores testados, todos amplificaram com 5 ng, com exceção de BIC1722, BIC1723, BIC3809, BIC3811 e BIC3815 que não puderam ser testados (Tabela 1). Os marcadores BIC8, BIC18, BIC1713, BIC1729 e BIC3821 que amplificaram com apenas 1 ng e foram testados com 0,5 ng e 0,1 ng. Destes, apenas BIC08, BIC18 e BIC3821 amplificaram bem com 0,5 ng (Figura 6). Apesar de não ter sido possível validar dos marcadores, devido ao avanço da pandemia de COVID-19, estes se mostraram promissores ao amplificar com outras espécies e alguns amplificaram com pequenas quantidades de DNA, podendo ser úteis quando apenas é possível coletar pequenas quantidades de amostra e até mesmo vestígios encontrados em campo.

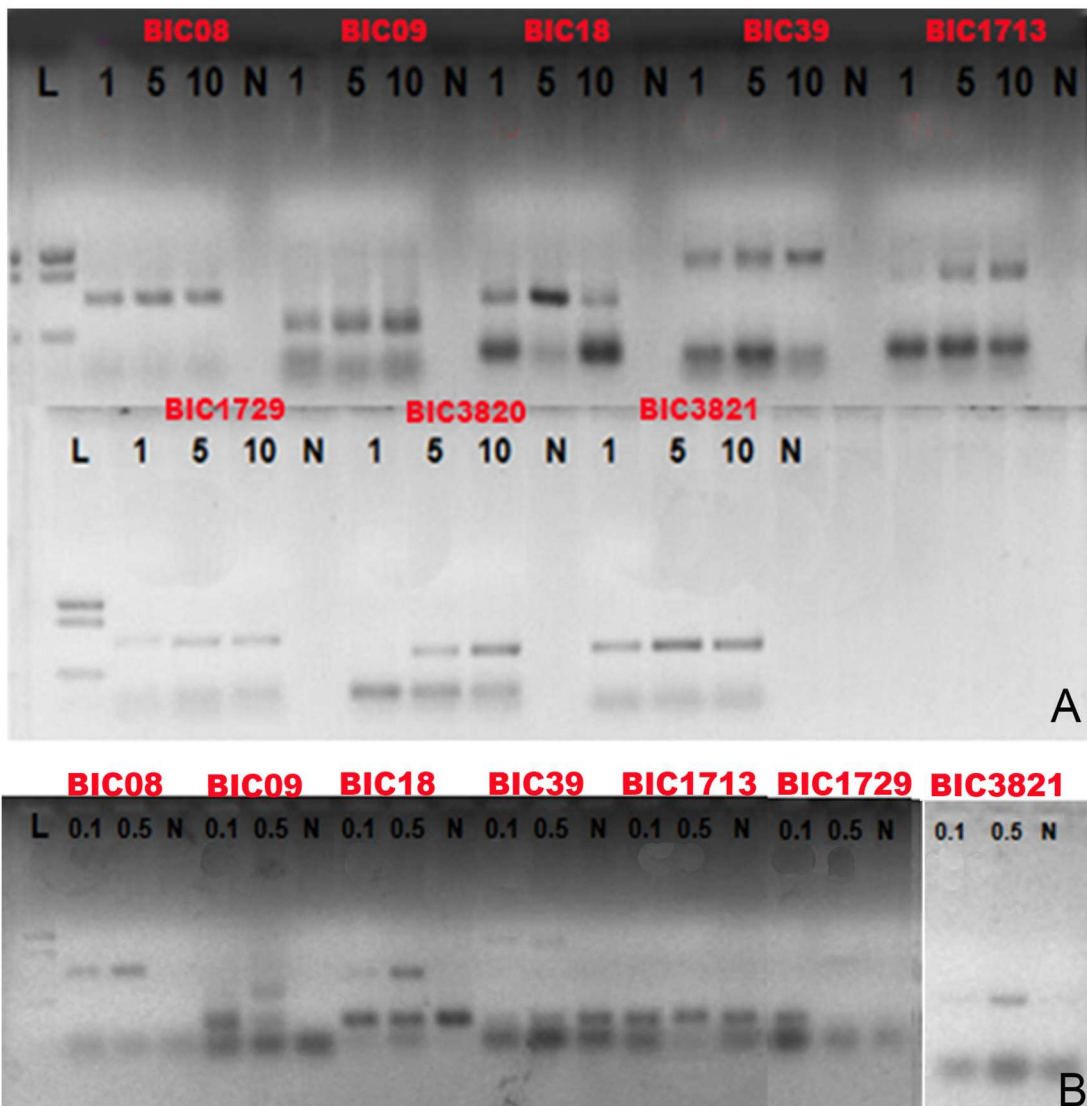


Figura 7: Géis de agarose 2% com resultados de testes com diferentes quantidades de DNA. Os nomes dos marcadores estão em vermelho. Figura A: testes comparando 1, 5 e 10 nanogramas. L: Ladder, 1: 1 ng, 5: 5 ng, N: controle negativo para cada primer. Figura B: Testes com marcadores que amplificaram com 1 ng, utilizando 0,5 e 0,1 ng. L: Ladder, 1: 1 ng, 5: 5 ng.

Até o momento, 36 marcadores microsatélites foram desenvolvidos e publicados para *S. maximiliani*. A partir dos mesmos *contigs* utilizados neste estudo (Ludwig et al., 2017), 22 microsatélites polimórficos foram desenvolvidos, sendo 16 tetra, três penta e três hexa-nucleotídeos; o polimorfismo de cada marcador foi avaliado manualmente a partir da visualização em gel de poliacrilamida, com 14 amostras *S. maximiliani* coletadas em cativeiro (de Melo et al., 2021).

Outro conjunto de microssatélites foi isolado, a partir de *contigs* gerados por sequenciamento NGS, por Medolago e colaboradores (2018), dos quais 12 são dinucleotídeos e dois são trinucleotídeos. A análise de polimorfismo foi realizada por meio de sequenciamento de Sanger, com 15 amostras de *S. maximiliani* também obtidas em cativeiro. Além disso, os mesmos marcadores se mostraram polimórficos para *S. bouvreuil* (caboclinho-branco) e *S. pileata* (caboclinho-frade).

Apesar de já estar disponível um número considerável de marcadores, a genotipagem por sequenciamento é um método de alto rendimento que permite a análise de múltiplos *loci* de um elevado número de amostras distintas em uma única corrida, permitindo estudos com um melhor custo-benefício, além de economizar tempo (Klee et al. 2011, König et al. 2015, Shokralla et al. 2015). Entretanto, essa tecnologia ainda é pouco empregada para procedimentos de genotipagem utilizando marcadores moleculares (Scheible et al. 2011, Van Neste et al. 2012, Vartia et al. 2016), inclusive na área da conservação. Porém a padronização de marcadores compatíveis com esse método pode ser mais trabalhosa, pois, devido à inserção dos adaptadores, pode ocorrer um aumento de bandas inespecíficas (Figura 5) ou a não amplificação de alguns marcadores (Figura 4).

5.3 Teste de especificidade

O teste foi realizado com todos os marcadores selecionados exceto BIC1713, BIC1722, BIC1723, BIC3809, BIC3811, BIC3815. Foram utilizadas amostras de *S. caeruleus* (Coleirinho), *S. angolensis* (Curió), *S. plúmbea* (patativa) e *S. nigricolis* (Pretinho). Dos marcadores testados com as espécies descritas nos métodos, apenas BIC09 foi específico apenas para Bicudo (Figura 6). Três amplificaram para as quatro espécies e três amplificaram para todas exceto *Sporophila plumbea*, conforme mostrado na Figura 8 e Tabela 1.

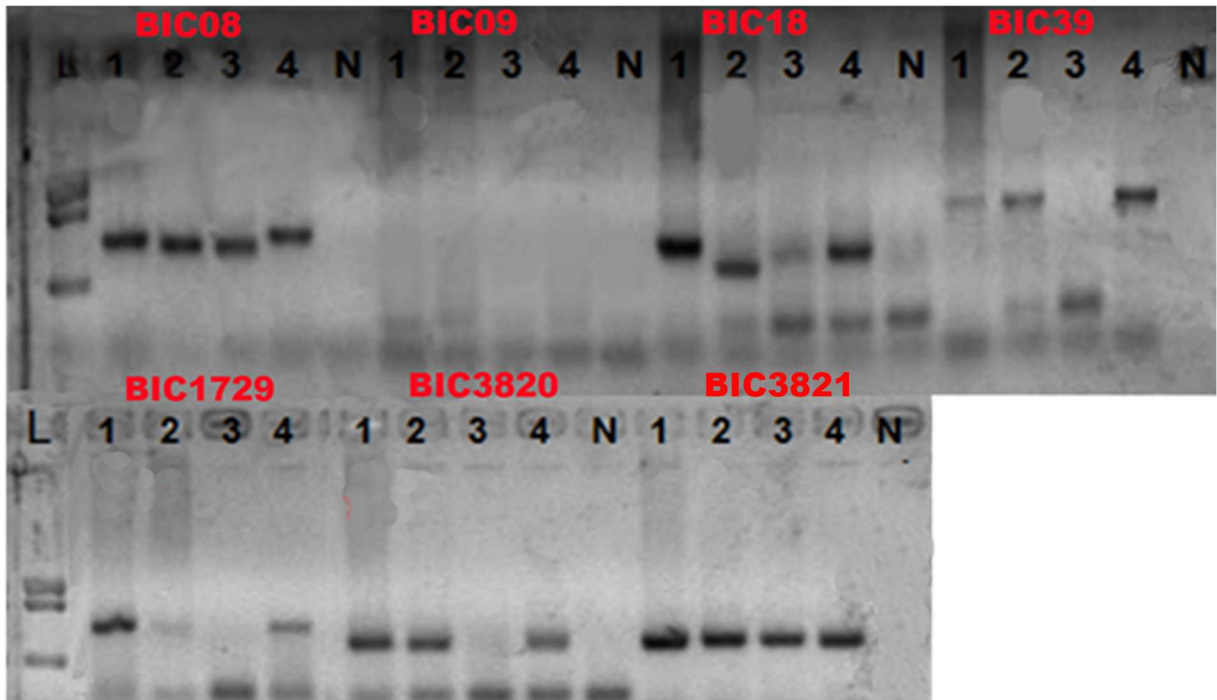


Figura 8: Gel de agarose 2% com resultados do teste de especificidade. Em vermelho estão os nomes dos marcadores. 1-*S. caerulescens*; 2-*S. angolensis*; 3-*S. plumbea*; 4-*S. nigricolis*, N: Controle negativo.

Neste teste, das espécies que amplificaram com os marcadores, apenas *S. angolensis* tem microssatélites disponíveis na literatura (Lima-Rezende et al, 2019). Com isso, esses novos marcadores podem ser validados para as quatro espécies, aumentando o número disponível para *S. angolensis* e novos para as outras três espécies, que também sofrem pressão do tráfico (IBAMA, 2017), podendo ser utilizados em futuros estudos. Assim como feito com marcadores inicialmente desenvolvidos para *S. maximiliani*, em estudos com *S. pileata* e *S. bouvreuil*, onde encontraram evidências de hibridização entre as duas espécies (Medolago et al, 2018; Medolago et al. 2020).

5.3 Análise mtDNA de animais em cativeiro

119 sequências de 400 pb do gene mitocondrial COI, geradas por Mesquita (2018) sendo três de *S. atrostris*, coletados em dois criatórios localizados no município de Patrocínio, e duas de *S. crassirostris*, coletados no CETAS-BH, e 115 de *S. maximiliani*, conforme a identificação morfológica durante as coletas. Tanto o *S. atrostris* (bicudo de bico preto), como *S. crassirostris* (bicudinho) são pouco encontrados em cativeiro, resultando em um número reduzido de dados dessas espécies. Um dos criatórios disponibilizou uma maior quantidade de *S. atrostris* (bicudo de bico preto), devido ao interesse de reproduzir indivíduos dessa espécie por apreciar sua estética. Dentre todos os indivíduos identificados como *S. maximiliani*, de todos os locais de coleta, 54 são fêmeas. Estas sequências foram reavaliadas, a fim de verificar se o gene COI seria capaz de separar essas espécies em cativeiro.

Três sequências de *S. crassirostris*, depositadas por Schindel et al. (2011), obtidas a partir de material da coleção do National Museum of Natural History of Smithsonian Institute e uma sequência de *S. angolensis*, *S. nigricolis* e *S. plumbea* foram adicionadas como grupo externo na construção de uma árvore *Neighbor-Joining*, cada indivíduo recebeu um código do local de coleta descrito na Tabela 2. Na árvore não foi observado um agrupamento de indivíduos do mesmo local de coleta ou separação das espécies. Os indivíduos identificados como *S. crassirostris* não agruparam entre si e as sequências adicionadas, porém um é mais próximo das sequências do GenBank.

Foram identificados 14 haplótipos sendo o haplótipo 1 o mais frequente, presente em 109 indivíduos, incluindo todos os *S. atrostris* e um *S. crassirostris*. Os *S. crassirostris* do Genbank apresentaram três haplótipos, mais próximos entre si (Figura 7). Foram identificadas a existência de 18 sítios de segregação, sendo 17 *singletons* e um parcimoniosamente informativo, diversidade haplotípica (h) de 0,203, diversidade nucleotídica (π) de 0,00234.

Tabela 1: Especificações dos primers padronizados e selecionados para o sequenciamento. Nome de cada marcador, *motifs* de repetição, seqüências dos primers, TA: temperatura de ideal de anelamento, quantidade de DNA ideal para amplificação escolhida para o preparo das bibliotecas de sequenciamento, quantidade mínima de DNA para amplificação do marcador em uma reação com 35 ciclos, porcentagem de DMSO utilizada em alguns marcadores, nomes das espécies do gênero *Sporophila* testados em que “+”indica a amplificação e “-” não amplificação.

Locus	Motif	Seqüência dos primers(5'-3')	TA (°C)	Quantidade de DNA (30 ciclos)	Limite mínimo de DNA (35 ciclos)	DMSO (% do volume)	<i>S. angolensis</i>	<i>S. caerulescens</i>	<i>S. nigricolis</i>	<i>S. plumbea</i>
BIC08	AAAG	F: TTC AAC CCG TCA GAC CTT AC R: AGC ACG CTG AAC TTC AAT TAC	62	5 ng	0.5 ng	-	+	+	+	+
BIC09	ATCC	F: TCA AGT ACC TG CTG TCC GTC R: AAG GCT TCT TGA GAG GGT GG	62	5 ng	1 ng	5	-	-	-	-
BIC18	CATT	F: ACA GGA TGA GAA GTT GCC TC R: TTC CCT CCC AGT TTA AGC CC	62	10 ng	0.5 ng	7,5	+	+	+	+
BIC39	AACC	F: TCC CTG TGT TCC TCT GAT GG R: CGT GGAATT TCT GCC TCC TG	60	10 ng	1 ng	-	+	+	+	-
BIC1713	TAT	F: TCT CTG CCC ACT CAA CCT TC R: CAA TGA GCT GCT ACT TGA GGC	60	10 ng	5 ng	-	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado
BIC1722	ATC	F: GCT CAA ACA TCT CTG CCA CC R: GAC CAG GGT TGT GTC TTT GG	56	10 ng	Não testado	-	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado
BIC1723	TAT	F: TCT CTG CCC ACT CAA CCT TC R: CAA TGA GCT GCT ACT TGA GGC	56	10 ng	Não testado	-	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado
BIC1729	AGC	F: TCT CTC CAA ACC AGC CCT TC R: TGT GTC ACT GAT ACC CTG GC	58	10 ng	1 ng	-	+	+	+	-
BIC3809	AC	F: AGA CCC ATC AAC AGA GAG GC R: AGA ATT TGC GAT GTG GGC TG	56	10 ng	Não testado	-	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado
BIC3811	AC	F: ACC TTC ACC CTT CCT CTG TG R: ACC TGC ATG AAG ACC TGA GG	60	10 ng	Não testado	-	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado
BIC3815	CT	F: CAC TGC CTG ATG TGG AAC TG R: AGG GAG AGG GAA GCA AAG TC	60	10 ng	Não testado	-	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado
BIC3820	TG	F: TCC TGT GAC TGA TAG CTG CC R: AAC AGC CCA ATG ATT TGC CC	62	5 ng	5 ng	-	+	+	+	-
BIC3821	CT	F: CAC CGC GAT CCT TCA TCA TG R: GAG CAA AGC CAG TGA CAC AG	62	10 ng	1 ng	-	+	+	+	+

Tabela 2: Lista dos criatórios com suas respectivas cidades, onde foram coletados dados morfológicos e amostras biológicas e número de sequências obtidas de *S. atirostris*, *S. crassirostris* e *S. maximiliani*. As coletas e o sequenciamento foram realizados por Mesquita (2018).

Local de coleta	Cidade	<i>S. atirostris</i>			<i>S. crassirostris</i>			<i>S. maximiliani</i>	
		Morfologia	Amostras biológicas	Sequências	Morfologia	Amostras biológicas	Sequências	Morfologia	Amostras biológicas
L1	Belo Horizonte	-	-	-	4	4	2	16	24
L2	Uberlândia	4	4	-	-	-	-	7	7
L3	Uberlândia	1	1	-	-	-	-	18	18
L4	Uberlândia	-	-	-	-	-	-	15	15
L5	Patrocínio	3	2	2	-	-	-	18	11
L6	Patrocínio	7	7	1	-	-	-	13	13
L7	Nova Serrana	-	-	-	-	-	-	22	22
L8	Varginha	-	-	-	-	-	-	20	18
L9	Contagem	-	-	-	-	-	-	20	20
L10	Belo Horizonte	-	-	-	-	-	-	14	14
L11	Belo Horizonte	-	-	-	-	-	-	20	20
L12	Matias Barbosa	-	-	-	-	-	-	20	20
Total	-	15	14	3	4	4	2	203	202

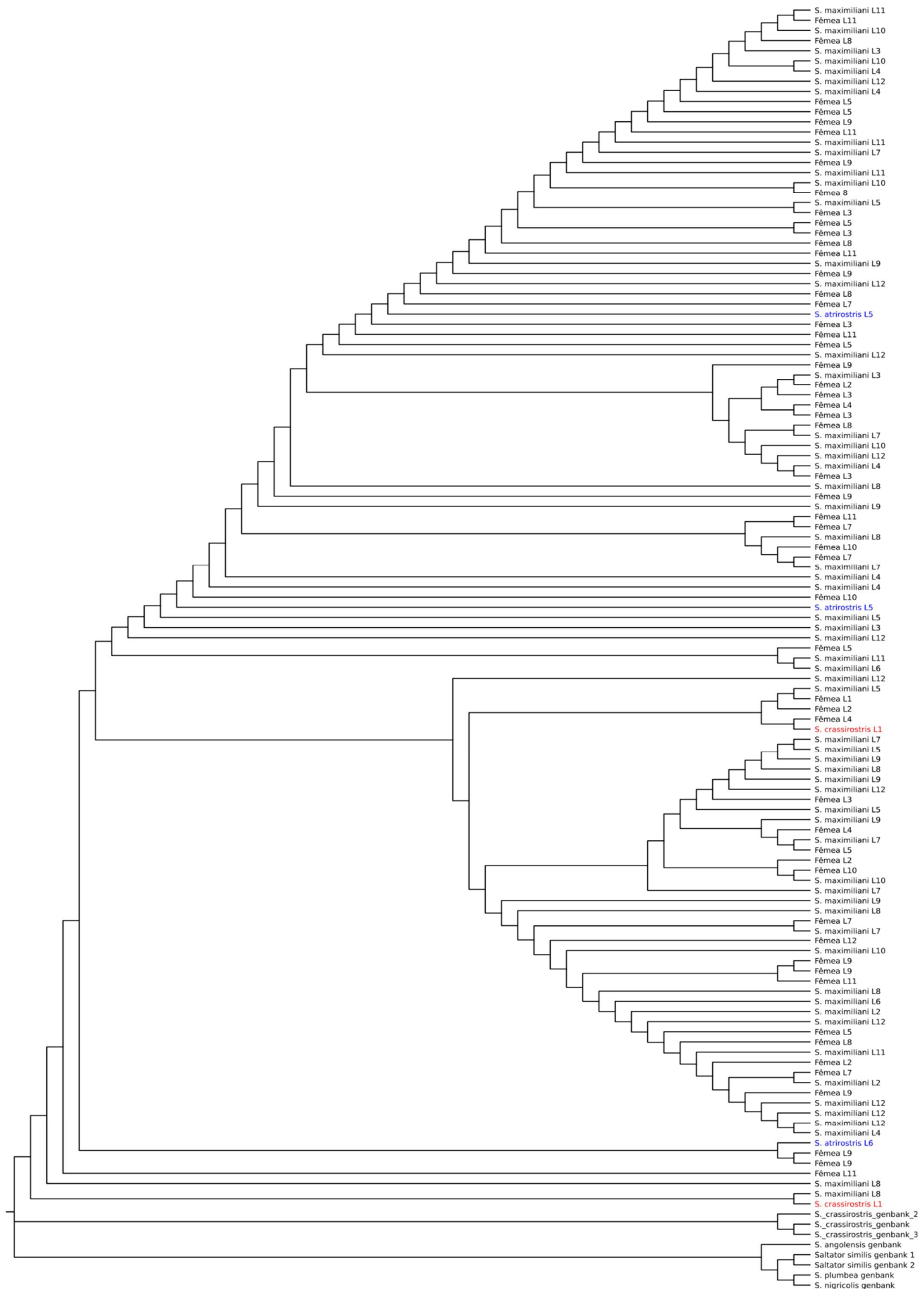


Figura 9: Árvore *Neighbour-Joining* com todas as sequências de COI deste estudo e as sequências adicionais disponíveis no GenBank. O sufixo "L" seguido de um número indica o local de coleta.

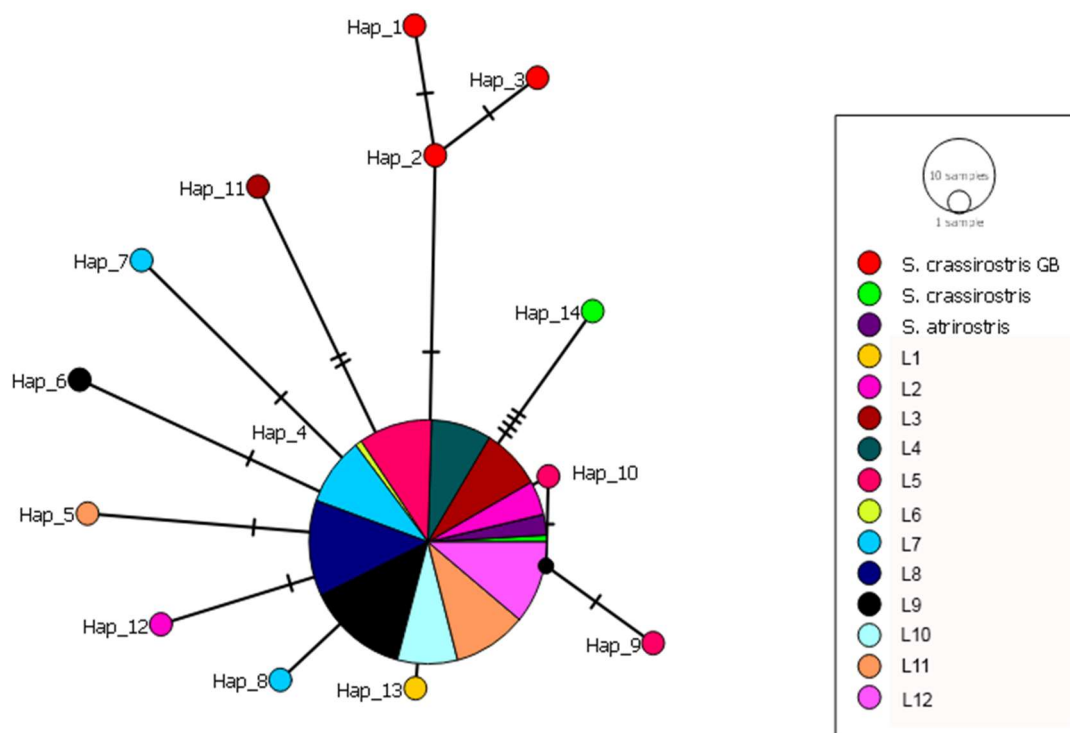


Figura 10: Rede de haplótipos do gene *COI*. As cores representando os criatórios representam os indivíduos identificados como somente como *S. maximiliani*; sendo as cores vermelho, verde e roxo representando *S. crassirostris* de Schindel et al. (2011), *S. crassirostris* e *S. atrirostris*, respectivamente.

O gene *COI* tem sido utilizado na identificação de espécies em diferentes grupos de animais, anfíbios (Hebert et al., 2003; Valentini et al., 2009; Bucklin et al., 2011; Ward et al. 2005, Vanhaecke et al., 2012; Smith et al., 2008). Um estudo com aves norte-americanas mostrou que 94% das espécies foram identificadas, porém não pôde distinguir espécies próximas entre si e com registros de híbridos na natureza (Hebert et al., 2004; Kerr et al., 2007). Campagna e colaboradores (2010) ao estudarem um grupo de espécies de *Sporophila* sulistas, que formam um grupo monofilético, observaram um compartilhamento dos haplótipos e falta de agrupamento nas árvores filogenéticas geradas, apesar dos machos apresentarem plumagens e cantos diferentes (Campagna et al., 2010). Esses resultados podem ser esperados em espécies que estão em um estágio inicial de divergência, não sendo observado o polimorfismo na região analisada (Funk & Omland, 2003; Omland et al., 2006).

A filogenia proposta por Mason e Burns (2013), utilizando os genes

mitocondriais nicotinamida desidrogenase (*ND1*) e citocromo b (*Cyt b*), mostra que os taxa *S. crassirostris* e *S. maximiliani* são bem diferenciados, além de serem separados por suas respectivas espécies irmãs, refletindo as divisões taxonômicas baseadas em diferenças no tamanho e na coloração do bico de *S. nuttingi*, *S. maximiliani*, *S. atirostris* e *S. crassirostris* (Sclater & Salvin 1878; Stiles, 1984; Mason & Burns, 2013).

Devido à dificuldade na identificação das fêmeas e o direcionamento na formação dos casais para obtenção de fenótipos de interesse, pode resultar em hibridização e sua recorrência gera um fluxo gênico excessivo entre as diferentes espécies dificultando a diferenciação (Funk & Omland, 2003). Com isso, as fêmeas analisadas neste trabalho foram consideradas como *S. maximiliani* por informações fornecidas pelos responsáveis do criatório, porém, existe a possibilidade de um erro de identificação ou essas fêmeas já serem híbridas. A separação das sequências adicionais de *S. crassirostris* da coleção da Smithsonian Institute, de animais de vida livre coletados na Guiana, reforçam essa possibilidade da hibridização. A avaliação em conjunto com outros marcadores moleculares e informações morfológicas podem contribuir para a identificação de híbridos (Medolado et al., 2020). Além da devida identificação das espécies e variabilidade genética para ser importante para a reintrodução da espécie; reintroduzir animais com características genéticas próximas ao da população é importante para evitar a depressão por exocruzamento, que resulta do cruzamento de populações que evoluíram de forma distinta e passaram a apresentar adaptação local, porém com a drástica redução da população natural, é difícil recuperar informações genéticas de toda a distribuição geográfica original (Ferreira & Morgante, 2017). Além dos fatores genéticos, essas adaptações também estão relacionadas a comportamentos da espécie, vocalização e outros. Com a intensa captura da espécie ao longo de décadas, e destinação dos animais apreendidos ao cativeiro sem o devido conhecimento do local de origem, provavelmente já ocorreram cruzamentos entre indivíduos de diferentes locais.

Felizmente, o encontro de uma pequena população de vida livre em Minas Gerais (2020) oferece uma nova oportunidade para estudos da espécie e se associado a espécimes de museu, podem resultar em informações importantes

para a definição de novos passos para que a reintrodução da espécie tenha um sucesso a longo prazo.

Na análise de AMOVA, foi realizada apenas *S. maximiliani* (Tabela 3), devido ao número baixo de sequências das outras duas espécies, a variação entre os criatórios variação entre os criatórios foi de -0.59 enquanto dentro dos criatórios a variação foi de 100.59, não sendo observada uma estruturação dentro dos criatórios ou grupos de criatórios. Essa falta de estruturação, provavelmente se deu pela falta de isolamento dos animais nestes locais, uma vez que o intercâmbio dos animais entre criatórios é permitido segundo a Instrução Normativa IBAMA nº 10 de 19/09/2011, gerando um fluxo gênico entre diferentes criatórios.

Tabela 3: AMOVA de *S. maximiliani* entre grupos de diferentes criatórios.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	8	0.435	-0.00034 Va	-0.59
Within populations	92	5.357	0.05823 Vb	100.59
Total	100	5.792	0.05788	
Fixation Index	FST :	-0.00591		

CONCLUSÃO

A padronização resultou em 13 microssatélites compatíveis com a tecnologia do NGS, prontos para análise de polimorfismo. A maior parte dos microssatélites padronizados se mostraram sensíveis a pequenas quantidades de DNA e pouco específicos, o que pode ser útil para futuros estudos onde os materiais biológicos podem ser escassos e/ou com outras espécies do gênero *Sporophila*.

Já nas análises com o marcador mitocondrial COI não foi possível diferenciar as espécies, como observado em outros estudos com espécies de aves próximas. Além da possível ineficiência do marcador, existe a possibilidade de a não identificação das espécies estar relacionada com a presença de híbridos, uma vez que a identificação das fêmeas é praticamente impossível. Sendo assim necessários, mais estudos com diferentes marcadores moleculares a fim de definir os melhores marcadores para definição das espécies e híbridos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allendorf, F.W., Hohenlohe, P.A., Luikart, G. (2010). **Genomics and the future of conservation genetics**. *Nature Review Genetics* 11:697–709.
- Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). **Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review**. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9-17.
- Avise, J. C. (2004). **Molecular markers, natural history and evolution**. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A. (1999). **Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies**. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbenálisev.a026036>.
- Barreira, A. S., Lijtmaer, D. A., & Tubaro, P. L. (2016). **The multiple applications of DNA barcodes in avian evolutionary studies**. *Genome*, 59(11), 899-911.
- Bhargava, A., and Fuentes, F. F. (2010). **Mutational dynamics of microsatellites**. *Molecular Biotechnology* 44, 250–266. doi: 10.1007/s12033-009-9230-4.
- BirdLife International (2017). ***Sporophila maximiliani***. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T22723537A118849676. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T22723537A118849676.en>>. Acesso em: 5 de agosto 2020.
- Bucklin, A., D. Steinke, and L. Blanco-Bercial. (2011). **DNA barcoding of marine metazoa**. *Annual Review of Marine Science* 3:471–508.
- Burns, K. J., S. J. Hackett, & N. K. Klein. (2002). **Phylogenetic relationships and morphological diversity in Darwin’s finches and their relatives**. *Evolution* 34: 360–370.
- Burns, K.J., Shultz, A.J., Title, P.O., Mason, N.A., Barker, F.K., Klicka, J., Lanyon, S.M., Lovette, I.J. (2014). **Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds**. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75: 41-77.

Buschiazzo, E., and Gemmell, N. J. (2006). **The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes.** *Bioessays* 28, 1040–1050. doi: 10.1002/bies.20470

Cabanis, J. (1851) **Museum Heineanum. Verzeichniss der ornithologischen Sammlung des Oberamtmann Ferdinand Heine, auf Gut St. Burchard vor Halberstadt. Pars I. Oscines.** In Commission bei R. Frantz, Halbertstadt, viii + 233 pp. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.112135>

Campagna, L., P. Benites, S. C. Loughheed, D. A. Lijtmaer, A. S. DiGiacomo, M. D. Eaton, and P. L. Tubaro. (2012). **Rapid phenotypic evolution during incipient speciation in a continental avian radiation.** *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 279:1847–1856.

Campagna, L., D. A. Lijtmaer, K. C. Kerr, A. S. Barreira, P. D. Hebert, S. C. Loughheed, and P. L. Tubaro. (2010). **DNA barcodes provide new evidence of a recent radiation in the genus *Sporophila* (Aves: Passeriformes).** *Molecular Ecology Resources* 10:449–458.

Chistiakov, D. A., Hellemans, B., and Volckaert, F. A. (2006). **Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics.** *Aquaculture* 255, 1–29. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.031

Costa, M. C., Oliveira Jr, P. R., Davanço, P. V., Camargo, C. D., Laganaro, N. M., Azeredo, R. A., Simpson, J., Silveira, L. F. & Francisco, M. R. (2017). **Recovering the genetic identity of an extinct-in-the-wild species: The puzzling case of the Alagoas Curassow.** *PloS one*, 12(1), e0169636.

de Melo, A. A., Kalapothakis, E., Ludwig, S., Baptista, L. A. M., Lara, M. P., Silva, L. C., & Telles, M. P. D. C. (2020). **New set of microsatellite markers for the Great-billed Seed-finch (*Sporophila maximiliani* Passeriformes: Thraupidae): tools for inspection and conservation.** *Molecular Biology Reports*, 1-6.

Estoup, A., & Angers, B. (1998). **Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations.** In G. R.

Carvalho (Ed.), *Advances in molecular ecology* (pp. 55–86). Washington, D.C.: IOS Press.

Faircloth, B. C. (2008). **Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design.** *Mol. Ecol. Resour.* 8:1. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01884.x.

Ferreira, J.M., Morgante, J.S. **Possibilidade de Inferência da Origem e Destino de Animais Silvestres por Meio da Biologia Molecular.** In: *Ciência Contra o Tráfico.* Joao Pessoa: IMPRELL, 2017, p. 109-140.

Field D and Wills C (1998) **Long polymorphic microsatellites in simple organisms.** *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 263:209-215.

Funk D.J., Omland, K.E. (2003). **Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34, 397–423.

IEF. (2020). **Ave rara é encontrada após 80 anos sem registros em Minas Gerais.** IEF MG. Disponível em: <<http://www.ief.mg.gov.br/noticias/2974-ave-rara-e-encontrada-apos-80-anos-sem-registros-em-minas-gerais#:~:text=O%20p%C3%A1ssaro%20popularmente%20conhecido%20com%20na%20natureza%20em%20todo%20pa%C3%As>>. Acesso em: 20 de fev. 2020.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., et al. (2011). **Current trends in microsatellite genotyping.** *Mol. Ecol. Resour.* 11, 591–611. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003). **Biological identifications through DNA barcodes.** *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321.

Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. (2004). **Identification of birds through DNA barcodes.** *Public Library of Science Biology*, 2, 1657 – 1663.

- Hellmayr, C. E. (1938). **Catalogue of birds of the Americas and the adjacent islands. Part 11.** Field Museum Natural History Publication Zoological Series 13.
- Jackson, H., Morgan, B. J., & Groombridge, J. J. (2013). **How closely do measures of mitochondrial DNA control region diversity reflect recent trajectories of population decline in birds?.** *Conservation genetics*, 14(6), 1291-1296.
- Jan, C., & Fumagalli, L. (2016). **Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae).** *PeerJ*, 4, e2416.
- Jaramillo, A. & Sharpe, C.J. (2017) **Great-billed Seed-finch (*Oryzoborus maximiliani*).** In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (Eds.), *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona.
- Jarne P and Lagoda P.J.L (1996) **Microsatellites, from molecules to populations and back.** *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429.
- Klee, E. W., Hoppman-Chaney, N. L., and Ferber, M. J. (2011). **Expanding DNA diagnostic panel testing: is more better?.** *Expert Review of Molecular Diagnostics* 11:7. doi:10.1586/erm.11.58.
- König, K., Peifer, M., Fassunke, J., Ihle, M. A., Künstlinger, H., Heydt, C., et al. (2015). **Implementation of amplicon parallel sequencing leads to improvement of diagnosis and therapy of lung cancer patients.** *J. Thorac. Oncol.* 10, 1049–1057. doi: 10.1097/JTO.0000000000000570
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms.** *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Lande, R., (1988). **Genetics and demography in biological conservation.** *Science*, 241:455–1460.
- Leigh, J.W., Bryant D. (2015). **PopART: Full-feature software for haplotype network construction.** *Methods Ecology Evolution* 6(9):1110–1116.
- Lima-Rezende, C.A., Dobkowski-Marinho, S., Fernandes, G.A. Rodrigues, F.P., Caparroz, R.(2019). **Polymorphic microsatellite loci and partial mitogenome for the Chestnut-bellied Seed-finch *Sporophila angolensis* (Aves,**

Passeriformes) using next generation sequencing. *Molecular Biology Reports* 46: 4617–4623. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04848-x>

Lijtmaer, D.A., Sharpe, N.M., Tubaro, P.L. & Loughheed, S.C. (2004) **Molecular phylogenetics and diversification of the genus *Sporophila* (Aves: Passeriformes).** *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 33, 562–579.

Ludwig, S., Martins, A. P. V., Queiroz, A. L. L., Carmo, A. O. D., Oliveira-Mendes, B. B. R., & Kalapothakis, E. (2017). **Complete mitochondrial genome of *Sporophila maximiliani* (Ave, Passeriformes).** *Mitochondrial DNA Part B*, 2(2), 417-418.

Machado, E. (2009) ***Sporophila maximiliani*.** In: Bressan, P.M., Kielruff, M.C.M. & Sugieda, A.M. (Eds.), *Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados*. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 645 pp

Machado, R. B., Silveira, L. F., da Silva, M. I. S. G., Ubaid, F. K., Medolago, C. A., Francisco, M. R., & Dianese, J. C. (2019). **Reintroduction of songbirds from captivity: the case of the Great-billed Seed-finch (*Sporophila maximiliani*) in Brazil.** *Biodiversity and Conservation*, 1-24.

Mason, N.A., Burns, K.J., (2013). **Molecular phylogenetics of the Neotropical seedeaters and seed-finches (*Sporophila*, *Oryzoborus*, *Dolospingus*).** *Ornitologia Neotropical* 24, 139–155.

Medolago, C. A., Ubaid, F. K., Francisco, M. R., & Silveira, L. F. (2016). **Description of the nest and eggs of the Great-billed Seed-Finch (*Sporophila maximiliani*).** *The Wilson Journal of Ornithology*, 128(3), 638-642.

Medolago, C. A., Costa, M. C., Ubaid, F. K., Glenn, T. C., Silveira, L. F., & Francisco, M. R. (2018). **Isolation and characterization of microsatellite markers for conservation management of the endangered Great-billed Seed-finch, *Sporophila maximiliani* (Aves, Passeriformes), and cross-amplification in other congeners.** *Molecular biology reports*, 45(6), 2815-2819.

MESQUITA, W. U. **Diversidade genética e morfológica de bichos *Sporophila maximiliani* (Aves, Thraupidae) mantidos em cativeiro no estado de Minas Gerais.** 2018. 54f. Dissertação (Mestrado em Ecologia).

Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

Meyer de Schauensee, R. (1952). **A review of the genus *Sporophila***. *Proceedings of Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 104: 153–196.

Meyer de Schauensee, R. (1970) **A review of the South American finch *Oryzoborus crassirostris***. *Notulae Naturae*, 428, 1–5

Narum, S. R., Buerkle, C. A., Davey, J. W., Miller, M. R., and Hohenlohe, P. A. (2013). **Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics**. *Mol. Ecol.* 22, 2841–2847. doi: 10.1111/mec.12350

Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. (2012) **Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit** . *Bioinformatics* 28: 1166-1167.

Omland, K.E., Baker, J.M., Peters, J.L. (2006). **Genetic signatures of intermediate divergence: population history of Old and New World Holarctic ravens (*Corvus corax*)**. *Molecular Ecology* 15,795–808.

Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). **Molecular markers in phylogenetic studies a review**. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*.

Peters, J.L. (1970) **Check-list of Birds of the World**. *Harvard University Press, Cambridge*, 582 pp.

Pimentel, J. S. M., Carmo, A. O., Rosse, I. C., Martins, A. P. V., Ludwig, S., Facchin, S., Pereira, A. H., Brandão-Dias, P. F. P., Kalapothakis, E. (2018). **High-Throughput Sequencing Strategy for Microsatellite Genotyping Using Neotropical Fish as a Model**. *Frontiers in genetics*, v.2(73).

Ridgely, R.S. & Tudor, G. (1989) **The Birds of South America**. Vol. 1. University Press, Oxford, 516 pp.

Ridgely, R.S. & Tudor, G. (1994) **The Birds of South America**. Vol. 2. University Press, Oxford, 814 pp.

Rising, J., Jaramillo, A., Copete, J.L., Madge, S. & Ryan, P. (2011) **Family Emberizidae (Buntings and New World Sparrows)**. In: del Hoyo, J., Elliott, A. & Christie, D.A. (Eds.), *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 16. Lynx Editions, Barcelona, pp. 428–683.

Robbins, M.B., Braun, M.J., Huddleston, C.J., Finch, D.W. & Milensky, C.M. (2005) **First Guyana records, natural history and systematics of the White-naped Seedeater *Dolospingus fringilloides***. *Ibis*, 147, 334–341.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**. *Quarterly Review of Biology*, 76(3), 348-349.

Sato, A., H. Tichy, C. O'hUigin, P. Grant, B. Grant, & J. Klein. (2001). **On the origin of Darwin's Finches**. *Molecular Biology and Evolution* 18: 299–311.

Scheible, M., Loreille, O., Just, R., and Irwin, J. (2011). **Short tandem repeat sequencing on the 454 platform**. *Forensic Sci. Int.* 3, e357–e358. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.04.010

Schindel DE, Stoeckle MY, Milensky C, Trizna M, Schmidt B, Gebhard C, Graves G (2011) **Project description: DNA barcodes of bird species in the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, USA**. *ZooKeys* 152: 87–92. doi: 10.3897/zookeys.152.2473

Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). **Quality control and preprocessing of metagenomic datasets**. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864..

Sick, H. 1997. **Introdução à ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro, Nova Fronteira.

Shokralla, S., Porter, T. M., Gibson, J. F., Dobosz, R., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Golding, G.B., Hajibabaei, M. (2015). **Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform**. *Scientific Reports* 5. doi:10.1038/srep09687.

Silveira, L. F. & F. C. Straube. 2008. **Aves ameaçadas de extinção no Brasil**. Pag. 379–666, in Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Volume 2 (A. B. M. Machado, G. M. Drummond, and A. P. Paglia, Editors). Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, Brasília, D.F., Brazil.

Srithawong, S., Muisuk, K., Srikumool, M., Mahasirikul, N., Triyarach, S., Sriprasert, K., & Kutanan, W. (2020). **Genetic structure of the ethnic Lao groups from mainland Southeast Asia revealed by forensic microsatellites**. *Annals of Human Genetics*.

Straube, F.C. & Urben-Filho, A. (2009) ***Sporophila maximiliani***. In: Machado, A.B.M., Drummond, G.M. & Paglia, A.P. (Eds.), Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Vol. 2. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 538–539.

Stiles, F. (1996). **When black plus white equals gray: the nature of variation in the variable seedeater complex (Emberizinae: *Sporophila*)**. *Ornitologia Neotropical* 7: 75–107.

Stoeckle, M. Y., & Thaler, D. S. (2014). **DNA barcoding works in practice but not in (neutral) theory**. *PLoS One*, 9(7), e100755.

Thompson, J. D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Tostes, A. P. (1997). **Criação de Curiós e Bicudos**. São Paulo. Editora e Gráfica scala.

Tóth G, Gáspari Z and Jurka J (2000) **Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis**. *Genome Research* 10:967-981.

Ubaid, F. K., Silveira, L. F., Medolago, C. A., Costa, T. V., Francisco, M. R., Barbosa, K. V., & Junior, A. D. (2018). **Taxonomy, natural history, and conservation of the Great-billed Seed-Finch *Sporophila maximiliani* (Cabanis, 1851) (Thraupidae, Sporophilinae)**. *Zootaxa*, 4442(4), 551-571.

Valentini, A., F. Pompanon, and P. Taberlet. (2009). **DNA barcoding for ecologists**. *Trends in Ecology & Evolution* 24:110–117.

Van Neste, C., Van Nieuwerburgh, F., Van Hoofstat, D., and Deforce, D. (2012). **Forensic STR analysis using massive parallel sequencing**. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6, 810–818. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.03.004

Vanhaecke, D., Leaniz, C.G., Gajardo, G., Young, K., Sanzana, J., Orellana, G., Fowler, D., Howes, P., Monzon-Arguello, C., Consuegra, S. (2012). **DNA Barcoding and Microsatellites Help Species Delimitation and Hybrid Identification in Endangered Galaxiid Fishes**. *Plos One* 7(3): 1-10.

Vartia, S., Villanueva-Cañas, J. L., Finarelli, J., Farrell, E. D., Collins, P. C., Hughes, G. M., FitzGerald, R. D. (2015). **A novel method of microsatellite genotyping-by-sequencing using individual combinatorial barcoding.** Royal Society Open Science 3:1. doi: 10.1098/rsos.150565.

Yazbeck, G. M., and Kalapothakis, E. (2007). **Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes).** Genet. Mol. Res. 5, 1026–1034.