

Caracterização da variabilidade genética em indivíduos cativos de *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae) mediante o uso de RAPD como marcador molecular

Vincent Louis Viala^{1,2}, Edislane Barreiros de Souza¹, Leandro Fagundes da Silva Tarosso¹ e Fábila Prates de Oliveira¹

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Molecular de Animais Silvestres, FCL – UNESP, Avenida Dom Antônio nº 2100, Jd. Universitário, 19800-000, Assis, SP, Brasil. E-mail: vviala@ibb.unesp.br

² Autor para correspondência

Recebido em 26 de agosto de 2005; aceito em 28 de janeiro de 2006

ABSTRACT. Genetic variability of captive individuals of *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae) using RAPD molecular markers. Molecular markers are very useful for biodiversity management. However, standardized markers are not available for most Neotropical birds. In this study a set of RAPD markers were evaluated for their potential use in *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae). Furthermore, a PCR reaction was developed to sex type the studied individuals. Nine RAPD primers were selected and the genetic variability of 16 captive individuals was examined. Five females and 11 males had their sexes successfully identified. The SIMPLE MATCHING index values of genetic differentiation varied from 12% to 51.5%, with an average of 33.6% (SD = 9.3). Compared to other bird species analyzed under similar methods, such as *Amazona vinacea* and *Triclaria malachitacea*, *R. toco* presented relatively high levels of genetic variability. The RAPD markers here presented proved to be potentially useful for future conservation and management plans.

KEY WORDS: *Ramphastos toco*, RAPD, sex typing, DNA extraction, feathers.

RESUMO. As técnicas de genética molecular podem contribuir consideravelmente para a conservação da biodiversidade. No presente trabalho foram estudados 16 indivíduos cativos de *Ramphastos toco* (Piciformes: Ramphastidae), com os objetivos de (1) padronizar marcadores de RAPD capazes de gerar informações sobre a variabilidade genética e (2) identificar o sexo dos indivíduos estudados por meio da técnica de PCR. O DNA genômico foi extraído da polpa de penas jovens e de raque de penas desenvolvidas. O sexo de todos os indivíduos foi identificado, totalizando cinco fêmeas e 11 machos. Os valores de diferenciação genética do índice SIMPLE MATCHING, obtidos com nove primers de RAPD, variaram de 12% a 51,5%, e uma diferenciação genética média de 33,6% (DP = 9,3) foi encontrada. Estudos prévios, realizados com metodologias similares, nas espécies *Amazona vinacea* e *Triclaria malachitacea*, apontam que a variabilidade genética apresentada pelos indivíduos de *R. toco* analisados é relativamente alta. Além disso, os marcadores de RAPD aqui padronizados poderão ser utilizados em estudos futuros de populações naturais da espécie, contribuindo para programas de conservação e manejo.

PALAVRAS-CHAVE: *Ramphastos toco*, RAPD, sexagem, extração de DNA, penas.

A destruição dos habitats naturais é a principal causa da extinção de espécies. A preservação *in situ* tem sido a melhor estratégia para proteção da biodiversidade em longo prazo, pois busca manter as comunidades e populações nos seus ambientes originais. Para o manejo adequado dos recursos naturais é necessário entender como a variação genética é distribuída e quais as características do meio ambiente, ou das espécies, que influenciam na sua distribuição (Foose 1983). Os esforços de conservação *ex situ* também podem ser parte importante de uma estratégia de conservação integrada (Primack e Rodrigues 2001). Os zoológicos e criadouros conservacionistas têm um papel significativo na conservação de animais silvestres, pois frequentemente detêm exemplares de espécies que se encontram em perigo de extinção. Por isto, a legislação do IBAMA (Portaria IBDF nº 130-p de 06/04/1978 e nº 132-p de 05/05/1988) forçou uma mudança de postura por parte destas instituições mantenedoras com relação ao manejo e exposição de fauna silvestre, ampliando suas atividades. Estas mudanças incluem o incremento e o estudo da variabilidade genética, bem como a formação de casais visando a reprodução para a manutenção das coleções e reintrodução de espécimes na natureza. As análises de DNA oferecem a oportunidade de acesso direto à variabilidade genética, permitindo refinar

ou corrigir “pedigrees” de populações selvagens ou cativas (Mace *et al.* 1996).

Contudo, um problema para a implementação de programas que visam acessar a variabilidade genética de certas populações cativas é a ausência de marcadores moleculares padronizados para as aves brasileiras. Um outro agravante seria a dificuldade na formação dos casais, dado que muitas espécies não apresentam dimorfismo sexual aparente.

A técnica de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) baseia-se na amplificação *in vitro* (por PCR; Reação em Cadeia da Polimerase) de fragmentos de DNA de tamanhos variados, e tem a vantagem de permitir a detecção de polimorfismos genéticos nas espécies em estudo sem necessidade do conhecimento prévio de seqüências do genoma (Williams *et al.* 1990, Fritsch e Rieseberg 1996, Ferreira e Grattapaglia 1998). Técnicas de sexagem também baseadas em PCR são mais rápidas e seguras, quando comparadas com a identificação cromossômica ou a endoscopia cirúrgica.

O Tucano-toco, ou Tucanuçu (*Ramphastos toco*) não está ameaçado de extinção segundo a Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, publicada pelo IBAMA (Instrução Normativa nº 3 de 27/05/2003, publicada no Diário Oficial da União nº 101 de 28/05/2003, Seção 1,

p. 88-97), mas já está se tornando raro em algumas regiões (Chiarello 2000). Habitam matas de galeria, cerrado e capões, sendo os únicos ranfastídeos brasileiros que não vivem exclusivamente em áreas florestadas (Sick 1997, Peña e Rumboll 1998). Eles podem ser observados aos pares ou em grupos familiares, e têm uma ampla distribuição no interior do Brasil, da Amazônia ao Paraguai, Bolívia e Argentina. Também podem ser encontrados do litoral do Amapá às Guianas e médio rio Branco, porém não atingem o litoral oriental brasileiro (Sick 1997).

O presente trabalho teve como objetivos: (1) padronizar uma série de marcadores de RAPD para *R. toco*, que permitirão a realização de análises de variabilidade genética nesta espécie em cativeiro ou na natureza, bem como aconselhamentos genéticos para a formação de casais em cativeiro, (2) padronizar o método de sexagem molecular para a espécie em estudo, utilizando-se os *primers* apresentados por (Griffiths *et al.* 1998). Além disso, a variabilidade genética de um grupo de indivíduos encontrados em cativeiro foi avaliada.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se amostras de penas de 16 exemplares cativos de *Ramphastos toco*. As amostras foram provenientes de zoológicos brasileiros e criadouros conservacionistas dos Estados de São Paulo, Paraná e Distrito Federal, e foram armazenadas em etanol absoluto a temperatura ambiente até o momento da extração do DNA. O DNA genômico foi extraído de um a dois bulbos de penas jovens (14 indivíduos) e de raque e cálamo de penas desenvolvidas (dois indivíduos), seguindo-se Bruford *et al.* (1992).

Análises de RAPD. Para as análises de variabilidade genética, 42 *primers* de RAPD (Tabela 1) foram testados utilizando-se três amostras de DNA escolhidas ao acaso. As reações de PCR seguiram basicamente o protocolo desenvolvido por Williams *et al.* (1990). Foram adicionados 30 ng de DNA genômico, 1 µl de tampão de PCR 10X, 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 8 pmol de *primer* e água pura (todos os reagentes da Invitrogen), completando um volume final de 10 µl. O termociclador (Biometra - Uniscience) foi programado com: três ciclos iniciais a 95°C por 30 s, 30°C por 2 min e 72°C por 1 min; e 31 ciclos a 95°C por 30 s, 40°C por 2 min e 72°C por 1 min. Após estes ciclos, foi realizado um passo final de extensão de 5 min a 72°C. Com o objetivo de se verificar se os resultados apresentaram reprodutibilidade, foi escolhida uma amostra para teste. O padrão eletroforético apresentado por esta amostra foi comparado, para todos os *primers* analisados, com o padrão eletroforético de sua réplica. Uma amostra controle (sem DNA) foi também utilizada para cada *primer*, evitando assim que eventuais artefatos fossem considerados como bandas de RAPD. Nos casos em que a amplificação das bandas de RAPD não foi bem sucedida, novos testes foram realizados utilizando-se 2,5 mM de MgCl₂ nas reações (Sambrook e Russel 2001).

Tabela 1. Número e seqüência dos *primers* de RAPD (Invitrogen) testados e selecionados (B10, D01, D02, D05, F04, 01, OPC05, OPM02 e OPP05) para a análise de variabilidade genética entre 16 indivíduos cativos de *Ramphastos toco*.

Table 1. Number and sequence of the RAPD primers (Invitrogen) tested and selected (B10, D01, D02, D05, F04, 01, OPC05, OPM02 and OPP05) for the genetic variability analysis of 16 *Ramphastos toco* captive individuals.

Primer	Seqüência (5' → 3')
B03	TCC ACT GGC A
B04	TGG TCC CCG T
B05	GGA GGA GTA G
B10	AGC GGC GTT T
C12	CAC TAG CGT C
D01	CCA CTG CGT C
D02	AGG TGA CCG T
D03	GTT GCG ATC C
D04	TTC CCC CGC T
D05	GAA CCT GCC G
D07	CTC CTG CCA A
D08	AGG CCC GAT G
D09	ACA GGT GCT G
D11	TCT CCC TCA G
D12	TCC ACT GGC A
E02	AAG GGG GCG A
E04	ACG GGC AGC A
E05	GAG GAC GGT T
E12a	CAC TAG CGT C
E12b	AGA GGG AGT C
F04	CAC GTT GCA C
F08	GTC CCC ACC T
01	GGA CCC TTA C
02	CAC CTT TCC C
OPC-05	GAT GAA CCG CC
OPC-07	GTC CCG ACG A
OPC-17	TTC CCC CCA G
OPM-02	ACA ACG CCT C
OPM-07	CCG TGA CTC A
OPP-05	CCC CGC TAA C
OPP-09	GTG GTC GCG CA
OPP-17	TGA CCC GCC T
OPW-02	ACC CCG CCA A
PRIMER1	CCA CTG CGT C
PRIMER2	CAC GGA TTG G
PRIMER3	ACC GGG AGT G
PRIMER4	GAC TGC AGT G
PRIMER5	CAA AGC GAG G
PRIMER6	ACG GCT CGA C
PRIMER7	TGT CCA CGA C
PRIMER8	AGA GGG AGT C
PRIMER9	AGC GGC GTT T

Os resultados das ampliações de cada *primer* foram visualizados em géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, após uma corrida de 140 V por duas horas, e fotodocumentados (KODAK POLAROID 667) sob luz ultravioleta.

Análises estatísticas. As bandas de RAPD foram analisadas visualmente e ordenadas em uma matriz binária de dados, caracterizada pela presença (1) e ausência (0) de bandas. Esta matriz binária foi analisada no programa TREECON FOR WINDOWS (versão 1.3b) (Van de Peer e de Wachter 1994), produzindo uma matriz de diferenciação genética entre os pares de indivíduos utilizando-se do coeficiente SIMPLE MATCHING, segundo a fórmula:

$$GD_{xy} = \left(1 - \frac{N_{AB}}{NT}\right) \times 100,$$

onde N_{AB} é o número de bandas compartilhadas pelos indivíduos A e B, e NT é o número total de bandas.

A matriz de diferenciação genética obtida foi agrupada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*) (Michener e Sokal 1957) para a construção de um dendrograma.

Sexagem por PCR. A técnica de sexagem descrita por Griffiths *et al.* (1998) é baseada na amplificação, por PCR, de um *intron* do gene CHD (Cromo-helicase-DNA), localizado nos cromossomos sexuais (Z e W) de todas as aves, com possível

exceção nos Struthioniformes. O par de *primers* P2 (5' - TC-TGCATCGCTAAATCCTTT - 3') e P8 (5' - CTCCCAAG-GATGAGRAAYTG - 3') utilizados para a sexagem se anela a duas regiões exônicas externas ao *intron* do gene CHD. Devido ao tamanho variável do *intron* existente entre os dois genes CHD-Z (localizado no cromossomo Z) e CHD-W (localizado no cromossomo W), é possível visualizar a presença de duas bandas em indivíduos fêmeas (ZW) e uma banda em machos (ZZ) em géis de agarose ou poliacrilamida. Para cada reação de PCR foram adicionados 1 µl de DNA genômico (50 a 250 ng/µl), 0,5 U de Taq DNA polimerase, 1 µl de dNTPs (2,5 mM de cada), 1 µl de tampão de PCR 10X (contendo 2 mM de MgCl₂), 0,9 µl de cada *primer* (1 nmol/µl) e 5,1 µl de água pura (Todos os reagentes da Invitrogen), totalizando 10 µl. A amplificação no termociclador (Biometra - Uniscience) foi realizada com um ciclo a 94°C por 1 min e 30 s e 29 ciclos a 48°C por 45 s, 72°C por 45 s e 94°C por 30 s, seguidos por uma extensão final de 50°C por 1 min e 72°C por 5 min. Os resultados foram visualizados em géis de agarose 3% corados com brometo de etídio após a separação dos fragmentos por eletroforese.

RESULTADOS

O protocolo de extração de DNA utilizado permitiu a obtenção de materiais de qualidade satisfatória tanto com as amostras de bulbo de penas jovens como com as de penas desenvolvidas. Onze machos (indivíduos SP1, SP2, SP4, C2,

Tabela 2. Matriz das porcentagens de diferenciação genética entre pares de indivíduos gerada pelo índice SIMPLE MATCHING pelo programa computacional TREECON FOR WINDOWS (v.1.3.b).

Table 2. Matrix of genetic differentiation percentage among pairs of individuals generated by the SIMPLE MATCHING index, using the TREECON FOR WINDOWS (v. 1.3b) computer program.

Ba1	0																		
Ba2	50,00	0																	
C1	42,42	34,84	0																
C2	36,36	25,75	27,27	0															
Le	36,36	40,90	18,18	36,36	0														
Br1	28,78	51,51	37,87	43,93	34,84	0													
Br2	30,30	40,90	33,33	39,39	24,24	13,63	0												
Br3	42,42	34,84	27,27	33,33	18,18	28,78	18,18	0											
Br4	34,84	42,42	40,90	46,97	31,81	24,24	22,72	28,78	0										
SP1	45,45	37,87	36,36	45,45	30,30	22,72	15,15	27,27	22,72	0									
SP2	37,87	45,45	28,78	40,90	25,75	24,24	16,66	25,75	24,24	19,69	0								
SP3	39,39	43,93	33,3	39,39	24,24	31,81	18,18	27,27	25,75	21,21	16,66	0							
SP4	43,93	33,33	22,72	28,78	22,72	33,33	25,75	28,78	33,33	28,78	21,21	19,69	0						
Itu	27,27	43,93	45,45	42,42	42,42	37,87	39,39	45,45	37,87	51,51	43,93	51,51	46,97	0					
PR	27,27	43,93	36,36	33,33	36,36	37,87	39,39	30,30	37,87	48,48	40,90	45,45	37,87	24,24	0				
Foz	24,24	50,00	33,33	33,33	36,36	34,84	36,36	36,36	37,87	48,48	31,81	39,39	37,87	24,24	12,12	0			
Ba1	Ba2	C1	C2	Le	Br1	Br2	Br3	Br4	SP1	SP2	SP3	SP4	Itu	PR	Foz				

Br1, Br2, Br4, Ba1, Ba2, Itu e PR) e cinco fêmeas (indivíduos SP3, Le, Foz, C1 e Br3) foram identificados com sucesso.

Dos 42 *primers* de RAPD testados, nove foram selecionados (Tabela 1) segundo os seguintes critérios: padrão de amplificação nítido, ausência de bandas na reação controle (reação sem amostra de DNA) e, resultado positivo no teste de reprodutibilidade.

De acordo com o índice SIMPLE MATCHING, os indivíduos PR e Foz (Tabela 2) apresentaram a menor porcentagem de diferenciação genética (aproximadamente 12%). Os pares de indivíduos que apresentaram as maiores porcentagens de diferenciação genética foram SP3-Itu, SP1-Itu e Br1-Ba2 (Tabela 2), com aproximadamente 51,5%. A diferenciação genética média foi de 33,6% (DP = 9,3).

DISCUSSÃO

Obtenção de DNA a partir de penas. Um dos objetivos do presente trabalho foi a utilização de material biológico de fácil acesso, como as penas desenvolvidas, para a obtenção de DNA. Vários tipos de tecidos podem ser utilizados para esta finalidade, como músculos (e.g. Payne e Sorenson 2003), vísceras ou tecido adiposo subcutâneo (Houde e Braun 1998) e sangue (e.g. Haig et al. 1997, Paterson e Snyder 1999, Bouzat 2001). No entanto, o uso de penas já desenvolvidas pode facilitar os estudos genéticos de populações naturais, uma vez que podem ser encontradas nos ninhos, ou até mesmo no chão. Além disso, seu transporte e armazenamento podem ser feitos em envelopes de papel, à temperatura ambiente. Assim, os resultados aqui obtidos indicam que uma maneira de se viabilizar as pesquisas genéticas com populações de aves, principalmente daquelas mais difíceis de serem capturadas, pode ser a coleta sistemática de penas no ambiente.

Níveis de variação genética. Por muito tempo o enfoque da genética da conservação limitou-se à preservação de variabilidade genética, porém, nem sempre baixos níveis de variabilidade genética refletem uma ameaça à sobrevivência das populações, podendo ser uma característica natural da própria espécie (Avisé 1994). Embora muitos estudos tenham dado ênfase a *taxa* raros, as espécies não ameaçadas também podem fornecer informações relevantes para a conservação, permitindo a realização de análises comparativas. Os valores de diferenciação genética observados entre os indivíduos de *R. toco* aqui estudados são superiores aos encontrados em outras espécies de aves em pesquisas desenvolvidas sob as mesmas condições metodológicas. Num estudo de variabilidade genética de 31 indivíduos cativos de *Amazona vinacea* (Psittaciformes), utilizando-se seis *primers* de RAPD, Oliveira (2003) observou, pelo índice de diferenciação SIMPLE MATCHING, valores que variaram de 6,3% a 40,8%, e um valor médio de 25,4%. Matos (2001), ao analisar 20 indivíduos cativos de *Trichloria malachitacea* (Psittaciformes) utilizando nove *primers* de RAPD, observou uma variação genética situada entre 10% e 40% (o valor médio não foi calculado).

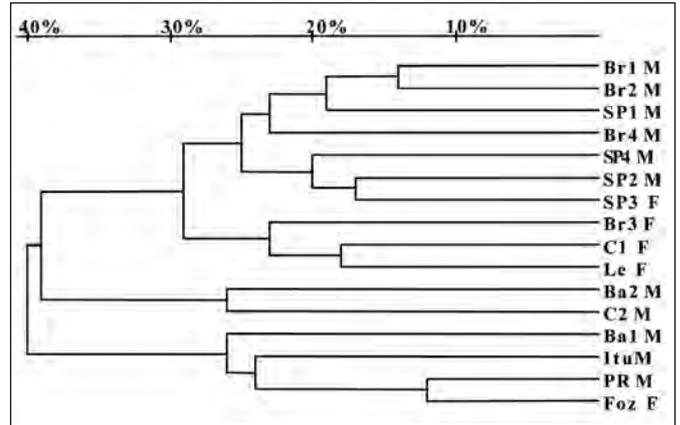


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA a partir dos valores da matriz de distâncias genéticas do índice SIMPLE MATCHING. Os valores da escala representam a porcentagem de diferenciação genética. M = machos e F = fêmeas.

Figure 1. Dendrogram obtained by the UPGMA grouping method using the genetic distance matrix values of the SIMPLE MATCHING index. The scale values represent the genetic differentiation percentage. M = males and F = females.

Dado que o indivíduo PR tem procedência conhecida (Estado do Paraná), o dendrograma gerado pela análise de agrupamento indica o Estado do Paraná como sendo a provável origem também do indivíduo Foz, o qual originalmente não apresentava procedência definida. Isso porque (1) os indivíduos Foz e PR apresentaram o mais baixo valor de diferenciação genética entre si ($GD_{xy} \cong 12\%$) (Tabela 2) e (2) os indivíduos PR e Foz estão agrupados em um ramo distinto do dendrograma (Figura 1).

Implicações para a conservação. Alguns acasalamentos podem ser sugeridos a partir dos resultados dos estudos de distância genética e de sexagem. Se o objetivo de um programa de reprodução for manter altos níveis de variabilidade, cruzamentos entre indivíduos mais distanciados geneticamente, como por exemplo a fêmea SP3 e o macho Itu ($GD_{xy} = 51,5\%$), ou entre a fêmea Foz e o macho Ba2 ($GD_{xy} = 50\%$) ou SP1 ($GD_{xy} \cong 48,5\%$), seriam preferíveis. Seria também de grande importância o cruzamento entre o macho PR e a fêmea Foz, com o objetivo de se manter a variabilidade local do estado do Paraná.

Além de auxiliar na reprodução em cativeiro, os marcadores genéticos aqui padronizados poderão ser utilizados em estudos de populações naturais, contribuindo para programas de conservação e manejo. Finalmente, os valores de variabilidade genética obtidos poderão servir como parâmetros de comparação em estudos futuros de populações naturais ou cativas desta ou de outras espécies de aves.

AGRADECIMENTOS

Nós gostaríamos de agradecer: ao Dr. Edmundo José de Lucca, ao Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior e ao Dr.

Carlos Camargo Alberts pelas suas valiosas sugestões; a Dra. Mônica Rosa Bertão e ao Dr. João Tadeu Ribeiro Paes por disponibilizarem os seus laboratórios para o desenvolvimento de parte desta pesquisa; ao Departamento de Ciências Biológicas da UNESP/Assis, ao Departamento de Genética e ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, pela sua colaboração; aos zoológicos Fundação Parque Zoológico de São Paulo/SP, Parque Ecológico Mourão - Leme/SP; Parque das Aves Foz de Iguaçu/PR; Passeio Público de Curitiba/PR, Jardim Zoológico de Brasília/DF, Parque Zoológico de Bauru/SP e aos criadouros conservacionistas Sítio Arco Íris - Itu/SP e Albino Dybas - Cascavel/PR que participaram deste trabalho fornecendo gentilmente as amostras e as informações sobre os tucanos estudados; André Luis Dorini de Oliveira pelo apoio técnico no laboratório; e, finalmente, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Avise, J. C. (1994) *Molecular markers, natural history and evolutions*. New York: Chapman & Hall.
- Bouzat, J. L. (2001) The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea Americana*) in an agricultural landscape. *Biol. Conserv.* 99:277-284.
- Bruford, M. W., O. Hanotte, J. F. Y. Brookfield e T. Burke (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting, p. 225-269. Em: Hoezel, A. R. (ed) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. New York: Oxford University Press.
- Chiarello, A. G. (2000) Conservation value of a native forest fragment in a region of extensive agriculture. *Braz. J. Biol.* 60:237-247.
- Ferreira, M. E. e D. Grattapaglia (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, 3ª ed. Brasília: Embrapa.
- Foose, T. J. (1983) The relevance of captive populations to the conservation of biotic diversity, p. 104-185. Em: C. M. Schonewald-Cox. (ed.) *Genetics and conservation*. Menlo Park: Benjamin/Cummings.
- Fritsch, P. e L. H. Rieseberg (1996) The Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Conservation Genetics, p. 55-69. Em: T. B. Smith e R. K. Wayne (Eds.) *Molecular genetic approaches in conservation*. New York: Oxford University Press.
- Griffiths, R., M. Double, K. C. Y. Orr e R. J. G. Dawson (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7:1071-1075.
- Haig, S. M., C. L. Gratto-Trevor, T. D. Mullins e M. A. Colwell (1997) Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. *Mol. Ecol.* 6:413-427.
- Houde, P. e M. J. Braun (1998) Museum collections as source of DNA for studies of avian phylogeny. *Auk* 105:773-776.
- Mace, G. M., T. B. Smith, M. W. Bruford e R. K. Wayne (1996) An overview of the issues, p.3-21. Em: Smith, T. B. e R. K. Wayne (eds.) *Molecular genetic approaches in conservation*. New York: Oxford University Press.
- Matos, R. S. (2001) *Estudo da variabilidade genética em *Triclaria malachitacea* (Psittaciforme, Aves) através do uso do RAPD - random amplified polymorphic DNA*. Relatório de Iniciação Científica. UNESP/Assis: Faculdade de Ciências e Letras de Assis.
- Michener, C. D. e R. R. Sokal (1957) A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11:130-162.
- Oliveira, F. P. (2003) *Estudo da variabilidade genética em *Amazona brasiliensis*, *Amazona pretrei*, *Amazona vinacea*, *Amazona rhodocorytha*, *Triclaria malachitacea* e *Deroyptus accipitrinus* (Psittaciformes - Aves) mediante o uso de RAPD como marcador molecular*. Dissertação de mestrado. Botucatu: Universidade Estadual Paulista.
- Paterson, I. G. e M. Snyder (1999) Molecular genetic (RAPD) analysis of Leach's storm-petrels. *Auk* 116:338-344.
- Payne, R. B. e M. D. Sorenson (2003) Museum collections as sources of genetic data. *Bonn. Zool. Beitr.* 51:97-104.
- Peña, M. R. de la e M. Rumboll (1998) *Birds of southern South America and Antarctica*. New Jersey: Princeton University Press.
- Primack, R. B. e E. Rodrigues (2001) *Biologia da conservação*, 1ª ed. Londrina: Midiograf.
- Sambrook, J. e D. W. Russel (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. New York: CSHL Press.
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira.
- Smith, T. B., P. P. Marra, M. S. Webster, I. Lovette, H. L. Gibbs, R. T. Holmes, K. A. Hobson e S. Rohwer (2003) A call for feather sampling. *Auk* 120:218-221.
- Van de Peer, Y e R. de Wachter (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10:569-570.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, L. A. Rafaski e S. V. Fingery (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.