UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
MUSEU DE ZOOLOGIA

Kamila Mayumi Duarte Kuabara

RELAÇÕES CO-FILOGENÉTICAS ENTRE MALÓFAGOS (INSECTA, PHTHIRAPTERA, ISCHNOCERA) E SEUS HOSPEDEIROS GALBULIFORMES (AVES)

Co-phylogenetic relationships between chewing lice (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera) and their galbuliform hosts (Aves)

São Paulo
2019

Kamila Mayumi Duarte Kuabara

RELAÇÕES CO-FILOGENÉTICAS ENTRE MALÓFAGOS (INSECTA, PHTHIRAPTERA, ISCHNOCERA) E SEUS HOSPEDEIROS GALBULIFORMES (AVES)

Co-phylogenetic relationships between chewing lice (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera) and their galbuliform hosts (Aves)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sistemática, Taxonomia e Biodiversidade do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Carlos José Einicker Lamas
Coorientador: Dr. Michel Paiva Valim

São Paulo
2019

“I do not authorize the reproduction and dissemination of this work in part or entirely by any electronic or conventional means.”

Catalogação na Publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo

Kuabara, Kamila Mayumi Duarte
Relações co-filogenéticas entre malófagos (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera) e seus hospedeiros Galbuliformes (Aves) = Co-phylogenetic relationships between chewing lice (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera) and their galbuliform hosts (Aves) - Kamila Mayumi Duarte Kuabara; orientador Carlos José Einicker Lamas e coorientador Michel Paiva Valim. São Paulo, 2019.
62p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Taxonomia e Biodiversidade, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2019.
Versão corrigida

1. Ischnocera. 2. Malófagos. I. Lamas, Carlos José Einicker, orient. II. Valim, Michel Paiva, coorient. III.Título.

CDU 595.751

CRB 8 /3805

"*Any worker attempting a natural classification of this difficult group is forced to formulate some conception of its evolution, without which the classification will become even further divorced from a natural representation of relationships than it is at the moment.*"

Clay (1949, p. 297*)*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi financiado em grande parte com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processos: 2017/23584-9 e 2017/02014-0), e também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - CAPES - Código de Financiamento 001.

Meus agradecimentos ao Dr. Carlos Lamas pela orientação, apoio e dedicação no desenvolvimento deste projeto e também pelas horas de conversa, incentivo e conselhos sobre a carreira acadêmica e também fora dela.

Agradeço ao Dr. Michel Valim, meu coorientador, amigo e colega de trabalho, que me apresentou e introduziu ao mundo ainda pouco desbravado dos piolhos. Por compartilhar suas ideias, pensamentos e muitas de suas metáforas. Também agradeço pela paciência, dedicação, orientação e acompanhamento durante todos esses anos de trabalho; e por disponibilizar muito do seu tempo para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), em nome de seus professores e todos os colegas, pelo apoio acadêmico e institucional durante todos os anos em que frequentei o museu durante a minha formação. Pelo auxílio na conferência dos dados das aves, agradeço ao Dr. Luis Fábio Silveira, Msc. Glaucia Del-Rio e à Dr. Natalia Luchetti. Agradeço à Dr. Jaqueline Battilana por todo o auxílio no laboratório de biologia molecular e também as funcionárias da Seção Acadêmica, Marta, Mariana e Sônia, por sempre estarem disponíveis a me receber, esclarecerem dúvidas e agirem em prontidão quando necessitei.

Por ter me recebido de forma tão amável durante meu estágio nos Estados Unidos, e pelas muitas horas conversando sobre piolhos, sou profundamente grata ao Dr. Jason Weckstein. Também agradeço aos Drs. Christopher Witt, Eberhard Mey, Andrew Sweet e Kevin Johnson, por compartilharem seus dados, espécimes e conhecimento em suas respectivas áreas de pesquisa, os quais tiveram grande importância nesse estudo. A Msc. Janice Dispoto por me ajudar em todos os momentos em que precisei, seja no laboratório de biologia molecular ou fora dele, e aos amigos que irão ler isso: Msc. Ana Ferreira, Dr. David Peet, John Hughes, Katie Smith, Moed Gerveni, Dr. Natan Rice, Suravi Ray e Dr. Therese Catanach, obrigada por serem as melhores companhias que eu poderia querer. [For receiving me so friendly during my internship abroad in USA, and for the many hours speaking about louse, my deepest thank you to Dr. Jason Weckstein. To Dr. Christopher Witt, Dr. Eberhard Mey, Dr. Andrew Sweet and Dr. Kevin Johnson, for sharing data, specimens and knowledge of their respective researches which had fundamental meaning on this study, here I express my deepest and sincere thank

you. I’m very grateful for having Msc. Janice Dispoto to help me in any moment I needed. To the friends who will read this: Msc. Ana Ferreira, Dr. David Peet, John Hughes, Katie Smith, Moed Gerveni, Dr. Natan Rice, Suravi Ray and Dr. Therese Catanach, thank you for being the best companies I could ever asked for].

A minha família, Tiago, mãe, Ju, Sr. Isaac e Mayumi, pois mesmo sem entenderem muito bem a minha pesquisa, nunca deixaram de me apoiar em várias etapas da minha formação profissional e pessoal.

Pelo compartilhamento de ideias e experiências, conversas e risadas agradeço aos meus amigos, Camila Conti, Carol Yamaguchi, Carol Garcia, Cris Apolinário, Fernanda Santos, Isabel Mösch, Jaime Jardim, Marcelo Félix, Marina Lima, Michelle Novais-Vicente, Natan Pedro, Antonio Neto, Renan Carrenho, Rosana Cunha e Virginia Guimarães.

Caso eu tenha esquecido de alguém, por favor, me desculpem. A todos, minha sincera gratidão.

RESUMO

Malófagos desempenham um importante papel na compreensão dos padrões e processos de evolução e em estudos de associação parasito-hospedeiro devido a sua alta especificidade. Foi reconstruída a história filogenética e co-filogenética das espécies dos gêneros *Mayriphilopterus* (31 espécimes, 9 espécies) e *Picicola* (38 espécimes, 7 espécies) e seus hospedeiros Galbuliformes (Aves, Bucconidae e Galbulidae), por meio de caracteres moleculares. Foi utilizado um total de 1.464 pares de base, pelo concatenamento do fragmento de um gene mitocondrial *COI-r* (citocromo oxidase subunidade I – right) e fragmentos de quatro genes nucleares, *EF-1α* (fator de elongamento 1 alpha), *BR-50*, *BR-62* e *BR-69* para os malófagos e 2.741 pb pelo concatenamento de fragmentos de três genes mitocondriais *ND2* (nicotinamida desidrogenase subunidade 2), *ND3* (nicotinamida desidrogenase subunidade 3) e *cytb* (citocromo b) e fragmentos de dois genes nucleares, *AK1* (adenilato quinase 1) e *BFib7* (beta fibrinogênio 7) para os hospedeiros. Foram feitas análises de máxima verossimilhança, inferência Bayesiana e co-filogenéticas baseada em distância e eventos. As análises filogenéticas recuperaram a monofilia dos hospedeiros e das espécies dos dois gêneros de malófagos. A estatística global da análise co-filogenética de distância foi significativa para os *Mayriphilopterus* e os Galbuliformes e não significativa para as *Picicola*. Na análise co-filogenética de eventos recuperou-se para ambos os gêneros, *Mayriphilopterus* e *Picicola*, eventos de co-evolução, duplicação e troca de hospedeiro, perdas e falhas em divergir, sendo o último evento o mais comum para os dois gêneros de malófagos. O teste exato de Fisher foi calculado e mostrou que *Mayriphilopterus* e *Picicola* não estão co-relacionados entre si, indicando que eles têm histórias evolutivas únicas e independentes em resposta à diversificação dos seus hospedeiros.

Palavras-chave: DNA, JANE, *Mayriphilopterus*, PARAFIT, *Picicola*

ABSTRACT

Chewing lice play an important role on the understanding of evolutionary patterns in parasite-host studies due to their high specificity. The phylogenetic and cophylogenetic history between *Mayriphilopterus* (31 specimens, 9 species), *Picicola* (38 specimens, 7 species) and their galbuliform hosts (Aves, Bucconidae and Galbulidae) was reconstructed, using molecular characters. A total of 1,464 base pairs were used for the concatenation of a fragment of one mitochondrial gene, *COI-r* (cithocrome oxidase subunit I - right) and fragments of four nuclear genes, *EF-1α* (elongation factor 1 alpha), *BR-50*, *BR-62* and *BR-69* for chewing lice, and a total of 2,741 bp for the concatenation of three fragments of mitochondrial genes *ND2*, (NADH dehydrogenase 2), *ND3* (NADH dehydrogenase 3) and *cytb* (cytochrome b) and two fragments of nuclear genes *AK1* (adenylate kinase 1) and *BFib7* (beta fibrinogen 7) for the hosts. We perfomed Maximum likelihood, Bayesian inference analyzes and the co-phylogenetic analyzes were inferred based on distance and events. The phylogenetic analyzes recovered the monophyly of the hosts and for both *Mayriphilopterus* and *Picicola*. The global statistics of cophilogenetic analysis based on distance were significant for *Mayriphilopterus* and Galbuliformes and not significant for *Picicola*. For cophylogenetic analysis based on events we recovered events of cospeciation, duplication and host switch, losses and failures to diverge. The failure to diverge was the most common event for both louse genera. Fisher's exact test have showed that *Mayriphilopterus* and *Picicola* are not corelated, indicating that they have unique and independent evolutionary histories in response to host diversification.

Keywords: DNA, JANE, *Mayriphilopterus*, PARAFIT, *Picicola*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
1.1. Os malófagos 10
1.2. Co-evolução 11
1.3. Malófagos de Galbuliformes 12
1.3.1. *Mayriphilopterus* Mey, 2004 12
1.3.2. *Picicola* Clay et Meinertzhagen, 1938 12
1.3.3. Outras espécies 13
2. OBJETIVOS 14
2.1. Objetivo geral 14
2.2. Objetivos específicos 14
3. MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1. Coleta dos dados 14
3.1.1. Galbuliformes 14
3.1.2. Malófagos 15
3.2. Preparo molecular 15
3.2.1. Extração de DNA 15
3.2.2. Amplificação 16
3.2.3. Sequenciamento 17
3.3. Identificação dos espécimes 17
3.3.1. Preparo permanente dos espécimes 17
3.3.2. Delimitação das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) 17
3.4. Análise filogenética 18
3.5. Análise co-filogenética 19
3.5.1. Método baseado em distâncias 19
3.5.2. Método baseado em eventos 20
3.5.3. Relações co-filogenéticas compartilhadas 20
4. RESULTADOS 21
4.1. Identificação dos espécimes 21
4.2. Análise filogenética 27
4.2.1. Galbuliformes 28
4.2.2. Malófagos 30
4.3. Análise co-filogenética 34
4.3.1. Método baseado em distâncias 34

4.3.2. Método baseado em eventos 38
4.3.3. Relações co-filogenéticas compartilhadas 42
5. DISCUSSÃO 42
6. CONCLUSÕES 49
7. REFERÊNCIAS 50
APÊNDICES 60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os malófagos

Os insetos conhecidos popularmente como piolhos, malófagos e anopluros (Insecta, Phthiraptera) são hemimetábolos, incluindo uma fase de ovo, três estágios ninfais e o adulto. São ectoparasitos obrigatórios de aves e mamíferos, vivendo permanentemente todo seu ciclo de vida associados a um único hospedeiro (JOHNSON e CLAYTON, 2003a; LINARDI, 2012). São ápteros, possuem pernas adaptadas para fixação no hospedeiro, com comprimento que varia entre 0,3 e 11 mm, seu corpo é esclerotizado, coberto de cerdas e achatado dorso-ventralmente (JOHNSON e CLAYTON, 2003a).

A ordem Phthiraptera ocorre em todo o mundo e atualmente conta com mais de 5.000 espécies distribuídas em 300 gêneros, estando divididas em quatro subordens: Amblycera, Ischnocera, Rhynchophthirina e Anoplura, sendo as duas últimas encontradas exclusivamente em mamíferos e as duas primeiras as únicas que parasitam aves, e onde encontra-se a maior parte da diversidade do grupo, cerca de 4.000 espécies (PRICE et al., 2003).

Muitos malófagos apresentam alto grau de especificidade, sendo encontrados apenas em grupos (e.g., gênero, família, ordem, etc) de hospedeiros específicos (BECKER, 1933; LAKSHMINARAYANA, 1977; JOHNSON e CLAYTON, 2003b; CLAYTON et al., 2015). Algumas espécies preferem ainda parasitar partes distintas do corpo de seus hospedeiros tais como cabeça, pescoço e/ou asas (CLAY, 1950), apresentando quatro morfotipos específicos desses micro-habitats: piolho de cabeça, piolho de asa, piolho do corpo e generalista (DUBININ, 1938; CLAY, 1949; JOHNSON et al., 2012).

Por viverem todo seu ciclo de vida ligado a um hospedeiro e não conseguirem sobreviver longe destes por muito tempo, pois suas habilidades de dispersão são limitadas, estes insetos são utilizados como um modelo para estudos de co-evolução e de relação parasito-hospedeiro (CLAY, 1949; JOHNSON et al., 2001a). Estes fatores associados a uma ampla distribuição em aves e mamíferos levou muitos autores à conclusão de que os malófagos têm uma longa história de associação e, por consequência, co-evoluem com seus hospedeiros (CLAY, 1949; HOPKINS, 1949; LYAL, 1986; MAUERSBERGER e MEY, 1993; PAGE et al., 1996; HAFNER et al., 2003; BANKS et al., 2006; CLAYTON et al., 2015).

1.2. Co-evolução

Quando duas linhagens interativas estão intimamente associadas durante grande parte ou toda sua diversificação, é possível assumir que a especiação de um grupo seja paralela a do outro. Esse modo de diversificação pode resultar em um padrão de história evolutiva compartilhada entre duas linhagens, conhecida como co-evolução (PATERSON et al., 2003; HUGHES et al., 2007; CLAYTON et al., 2015). Esse processo ocorre em todos os níveis biológicos, como genes atuando dentro de entidades biológicas (e.g. vírus), e mudanças fenotípicas entre duas populações ecologicamente relacionadas, tal como a relação de parasitos e hospedeiros (MARTÍNEZ-AQUINO, 2016).

Os estudos co-evolutivos têm suas origens dentro da parasitologia, pois um dos objetivos dessa disciplina é descrever a "causa e efeito" das interações ecológicas nos sistemas parasito-hospedeiro. A ideia de co-evolução originou-se em estudos parasitológicos de organismos selvagens no início do século XX (FAHRENHOLZ, 1913; KELLOG, 1913; de VIENNE et al., 2013). Esses estudos usavam as relações filogenéticas dos hospedeiros e parasitos e buscavam a congruência filogenética entre eles baseando-se em dois princípios: 1) onde a filogenia do parasito espelha a filogenia de seus hospedeiros, gerando filogenias completamente congruentes (regra de Fahrenholz); e que 2) hospedeiros primitivos albergam parasitos primitivos (regra de Szidat) (FAHRENHOLZ, 1913; SZIDAT, 1940; LYAL, 1986; RÓZSA, 1991; PAGE, 2003). Entretanto, estudos recentes afirmam que filogenias congruentes não são evidências para inferir a co-especiação, mas sim poderosas ferramentas para estudos de co-evolução (PAGE et al., 1998; JOHNSON et al., 2002a; CLAYTON e JOHNSON, 2003; HAFNER et al., 2003; JOHNSON e CLAYTON, 2003b; BANKS e PATERSON, 2004; BANKS et al., 2006; HUGHES et al., 2007; CLAYTON et al., 2015; SWEET et al., 2016; CATANACH et al., 2019).

Os pré-requisitos para a realização de estudos co-filogenéticos, segundo Page et al. (1996), que foram seguidos neste estudo são: (1) ter a taxonomia alpha bem resolvida tanto para os táxons representantes dos parasitos quanto aos táxons representantes dos hospedeiros, (2) ter filogenias bem resolvidas dos parasitos e dos hospedeiros, (3) ter filogenias preferencialmente baseadas em caracteres homólogos (moleculares) entretanto, isso não é um fator limitante, (4) ter um grande número de amostras e, por fim, (5) fazer uma comparação quantitativa das árvores de parasitos e hospedeiros por meio de testes estatísticos.

1.3. Malófagos de Galbuliformes

Os registros de malófagos parasitando as aves da ordem Galbuliformes (Bucconidae e Galbulidae) pertencem a três gêneros da subordem Ischnocera: *Mayriphilopterus* Mey, 2004, *Picicola* Clay et Meinertzhagen, 1938 (Apêndice A) e *Bobdalgleishia* Valim et Cicchino, 2015; e uma única espécie da subordem Amblycera, *Menacanthus caudatus* (Giebel, 1876).

1.3.1. *Mayriphilopterus* Mey, 2004

O gênero *Mayriphilopterus* (Ischnocera, Philopteridae) foi descrito por Mey (2004), quando o autor fez a revisão do complexo-*Philopterus*. Este gênero é encontrado exclusivamente em aves da ordem Galbuliformes. Quatro espécies foram descritas por Mey (2004) e outras duas já haviam sido descritas por Carriker (1963). Após a revisão publicada por Mey (2004) apenas um trabalho foi dedicado ao estudo deste gênero (VALIM e LINARDI, 2007). Atualmente são conhecidas seis espécies de *Mayriphilopterus* parasitando sete espécies de aves: *M. brevicephalus* Mey, 2004 ex *Jacamerops aureus isidori* Deville, 1849; *M. ernsti* Mey, 2004 ex *Monasa morphoeus* (Hahn et Küster, 1823); *M. galbulicus* Mey, 2004 ex *Galbula cyanescens* Deville, 1849; *M. nystalicus* Mey, 2004 ex *Nystalus chacuru* (Vieillot, 1816) e *N. maculatus* (Gmelin, 1788) (MEY, 2004; VALIM e LINARDI, 2007); *M. orinocensis* (Carriker, 1963) ex *Hypnellus bicinctus* Gould, 1837 e *M. spinosus* (Carriker, 1963) ex *Bucco capensis* Linnaeus, 1766 (CARRIKER, 1963).

Morfologicamente as espécies de *Mayriphilopterus* são caracterizadas por serem membros do complexo-*Philopterus* e apresentarem (1) ausência de conus funcional, (2) trabécula bem desenvolvida, (3) margem hialina do clípeo sem esclerotização marginal e (4) ter de 2-4 pares de cerdas espatuladas na margem hialina do clípeo (MEY, 2004).

1.3.2. *Picicola* Clay et Meinertzhagen, 1938

O gênero *Picicola* (Ischnocera, Philopteridae) foi descrito por Clay e Meinertzhagen (1938) e atualmente é composto por 37 espécies válidas. Diferente do gênero *Mayriphilopterus*, o gênero *Picicola* ocorre em outras ordens de aves, sendo elas Passeriformes (WILLIANS, 1979; CICCHINO, 1981; MEYER et al., 2008), Piciformes (DALGLEISH, 1969) e Galbuliformes (ONIKI e EMERSON, 1981; VALIM e LINARDI, 2006; PRICE e WECKSTEIN, 2006), e há um forte indicativo de que este gênero seja parafilético, com exceção

das espécies que parasitam as aves da ordem Galbuliformes (WECKSTEIN, 2004a). Atualmente oito espécies de *Picicola* são conhecidas por parasitar dezessete espécies de Galbuliformes: *P. faucetti* Price et Weckstein, 2006 ex *Chelidoptera tenebrosa* (Pallas, 1782); *P. galbulica* Valim et Linardi, 2006 ex *G. cyanescens*, *G. cyanicollis* Cassin, 1851, *G. ruficauda* Cuvier, 1816 e *G. tombacea* Spix, 1824; *P. naokii* Price et Weckstein, 2006 ex *B. capensis* e *B. macrodactylus* (Spix, 1824); *P. oneilli* Price et Weckstein, 2006 ex *Notharchus macrorhynchos* (Gmelin, 1788); *P. osheai* Price et Weckstein, 2006 ex *Malacoptila fusca* (Gmelin, 1788) e *M. semicincta* Todd, 1925; *P. serrafreirei* Valim et Linardi, 2006 ex *N. chacuru* e *N. maculatus*; *P. striata* Oniki et Emerson, 1981 ex *Malacoptila striata* (Spix, 1824), *M. fulvogularis* Sclater, 1854, *Hapaloptila castanea* (Verreaux, 1866) e *Monasa nigrifrons* (Spix, 1824) e *P. valquii* Price et Weckstein, 2006 ex *Nothriscus tectus* (Boddaert, 1783) (ONIKI e EMERSON, 1981; PRICE et al., 2003; VALIM e LINARDI, 2006; PRICE e WECKSTEIN, 2006).

Morfologicamente as espécies de *Picicola* são caracterizadas por serem membros do complexo-*Degeeriella* e por apresentarem (1) margem anterior da cabeça de forma arredondada ou achatada, (2) carena marginal completa, (3) sutura pré-antenal completa e (4) cônus estreito e alongado (ONIKI e EMERSON, 1981; VALIM e LINARDI, 2006; PRICE e WECKSTEIN, 2006).

1.3.3. Outras espécies

O gênero monotípico *Bobdalgleishia stephanophallus* (Ischnocera, Philopteridae) foi descrito por Valim e Cicchino (2015), e pertence ao complexo-*Brueelia*. Esta é a única espécie deste complexo conhecida por parasitar aves da ordem Galbuliformes. Seu hospedeiro tipo é *Jacamerops aureus ridgwayi* Todd, 1943 (Galbulidae). Morfologicamente essa espécie é caracterizada por apresentar (1) as cerdas *os*, *mts1-3* longas na margem da têmpora, (2) cerda *pos* curta e alocada na lente ocular, (3) um par de cerdas na porção anterior do tergito II e (4) esternitos II-VI com mais de um par de cerdas e sem placas esclerotizadas.

A espécie *Menacanthus caudatus* (Amblycera, Menoponidae) foi descrita por Giebel (1876), como *Menopon caudatus* em *Galbula ruficauda*, e é membro do complexo-*Menacanthus* Neumann, 1912. Esta é a única espécie de Amblycera conhecida por parasitar Galbuliformes. A *checklist* de Hopkins e Clay (1952) e a revisão do gênero *Menacanthus* de Piciformes de Price e Emerson (1975) classificam esta espécie como *nomina dubia* por apresentar grande dúvida quanto a sua validade morfológica uma vez que o material tipo está

perdido, a descrição original é incompleta e a falta de recoleta dessa espécie em *G. ruficauda* na natureza.

Devido à falta de material disponível para extração de DNA de *B. stephanophallus* e *M. caudatus*, essas espécies não foram incluídas neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Reconstruir a história co-filogenética compartilhada entre as espécies de dois gêneros de malófagos (*Mayriphilopterus* e *Picicola*) que parasitam as aves da ordem Galbuliformes (Bucconidae e Galbulidae), endêmicas da região Neotropical.

2.2. Objetivos específicos

Reconstruir a filogenia molecular das espécies do gênero *Mayriphilopterus*.

Reconstruir a filogenia molecular das espécies do gênero *Picicola* que parasitam aves da ordem Galbuliformes (Bucconidae e Galbulidae).

Recontruir a filogenia molecular das espécies de aves da ordem Galbuliformes que são hospedeiros das espécies de ambos os gêneros *Mayriphilopterus* e *Picicola.*

Reconstruir a história co-filogenética entre os dois gêneros de malófagos (*Mayriphilopterus* e *Picicola*) e os Galbuliformes.

Verificar os padrões co-filogenéticos compartilhados entre *Mayriphilopterus* e *Picicola*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos dados

3.1.1. Galbuliformes

Das 29 sequências gênicas utilizadas para os Galbuliformes, apenas uma foi obtida no Genbank (Apêndice B). As demais 28 amostras provêm do banco de dados obtido por Witt

(2004), sendo este composto por fragmentos de três genes mitocondrias, *ND2* (nicotinamida desidrogenase subunidade 2, 441 pb - pares de base), *ND3* (nicotinamida desidrogenase subunidade 3, 346 pb) e *cytb* (citocromo b, 1.047 pb) e fragmentos de dois genes nucleares, *AK1* (adenilato-quinase, 1.604 pb) e *BFib7* (beta fibrinogênio 7, 303 pb), totalilizando 2.741 pb. O alinhamento dos dados das aves para este estudo é composto apenas pelas amostras das espécies de hospedeiros que obtivemos sucesso em colecionar seus malófagos (Apêndice B).

3.1.2. Malófagos

Os malófagos disponíveis para este estudo foram coletados dos hospedeiros seguindo a metodologia de câmara de fumigação com acetato de etila e catação manual (CLAYTON e WALTHER, 1997; ARZUA e VALIM, 2010), e se encontram depositados nas coleções do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo - MZUSP (São Paulo, São Paulo, Brasil), da Academy of Natural Sciences of Drexel University - ANSDU (Filadélfia, Pensilvânia, Estados Unidos) e do Illinois Natural History Survey - INHS (Champaign, Illinois, Estados Unidos).

Para a obtenção de material genético dos malófagos foram utilizadas 31 amostras do gênero *Mayriphilopterus*, e como grupo externo cinco táxons do complexo-*Philopterus*: *Philopterus* sp., *Tyranniphilopterus bruneri* (Carriker, 1903), e outras três amostras não identificadas de *Tyranniphilopterus*. Para a obtenção do material genético do gênero *Picicola* foram utilizadas 38 amostras, e como grupo externo quarto táxons do complexo-*Degeeriella*: *Degeeriella carruthi* Emerson, 1953, *Austrophilopterus andigenae* Carriker, 1950 e duas amostras de *Picicola snodgrassi* (Kellogg, 1896), espécie-tipo do gênero. Ambos os grupos externos foram escolhidos por serem os mais próximos filogeneticamente dos seus respectivos gêneros (JOHNSON et al., 2002b; MEY, 2004; PRICE e WECKSTEIN, 2006).

3.2. Preparo molecular

3.2.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA total, foi utilizada a musculatura do ectoparasito seguindo a metodologia de Johnson et al. (2001b), com a sugestão proposta por Valim e Weckstein (2011), de utilizar uma agulha esterilizada para fazer um corte entre a cabeça e o protórax do malófago, permitindo assim preservar o exoesqueleto (voucher) daquele extrato de DNA para posteriores estudos morfológicos e atestar a identificação correta do DNA.

O kit utilizado para a extração foi o DNeasy Blood and Tissue Kit® da Qiagen®. O acesso ao material genético da musculatura foi alcançado a partir da imersão do inseto em solução tampão e proteinase K por 48 horas sob agitação em banho-maria à 45ºC para os espécimes da coleção do MZUSP e em agitador à 45ºC para os espécimes trabalhados nas coleções ANSDU e INHS. Após esta etapa a extração segue como recomendado pelo fabricante do kit comercial. O volume final da extração foi de 100µL e o DNA suspendido foi armazenado em freezer à -26ºC no MZUSP e à -80ºC na ANSDU. Em todos os conjuntos de extrações uma amostra em branco (sem DNA) foi mantida como controle negativo.

3.2.2. Amplificação

A amplificação dos fragmentos dos genes se deu mediante a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction,* PCR). Para todas as reações um volume final de 25µL foi amplificado para cada região gênica usando kit comercial Qiagen® seguindo as instruções do fabricante. As PCRs eram compostas por 16,3µL de ddH_2O, 1µL de dNTPs, 2,5µL de tampão 10x, 1µL de $MgCl_2$, 1µL de cada primer à 10µM, 0,2µL de enzima Taq Platinum® DNA Polymerases (da Thermo Fisher Scientific) e 2,0µL de DNA para os fragmentos dos genes mitocondriais *COI-r* (citocromo oxidase subunidade I - right) e *COI-l* (citocromo oxidase subunidade I - left), primers L6625/H7005 (379 pb) e LCO1490/HCO2198 (546 pb) repectivamente (HAFNER et al., 1994; FOLMER et al., 1994). Para os fragmentos dos genes nucleares foi incorporado à PCR 2µL do aditivo BSA e diminuido o volume de água deslilada para 13,8µL; os demais componentes permaneceram com o mesmo volume. Os primers utilizados foram EF1-For3/EF1-Cho10 (347 pb) para o fragmento do gene *EF-1α* (fator de alongamento 1 alpha) (DANFORTH e JI, 1998); BR50-181L/BR50-621R (390 pb) para o gene locus HYP; BR62-295L/BR62-429R (133 pb) para o locus DIPP e BR69-190F/BR69-432R (215 pb) para o locus TMEDE6 (SWEET et al., 2014). Em todas as PCRs dois brancos foram mantidos, um oriundo da extração e o outro da própria PCR.

Os ciclos programados para cada gene encontram-se listados na Tabela 1. O produto final da PCR foi armazenado em freezer à -26ºC. A amplificação de cada primer foi verificada através de eletroforese em gel de agarose à 1% e quantificado por espectrofotometria.

Tabela 1. Ciclos programados nos termocicladores das reações de PCR para os genes mitocondriais e nuclareares.

Primers	Ciclo programado
COI-r	94°C(10min)→94°C(30s)→46°C(30s)→65°C(30s)x35→65°C(7min)→4°Csoak
COI-l	94°C(10min)→94°C(30s)→50°C(30s)→65°C(30s)x35→65°C(7min)→4°Csoak
EF-1α	94°C(10min)→94°C(30s)→50°C(30s)→72°C(30s)x35→72°C(7min)→4°Csoak
BR-50, BR-62, BR-69	94°C(10min)→94°C(30s)→46°C(30s)→72°C(30s)x35→72°C(7min)→4°Csoak

3.2.3. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado apenas para as amostras que obtivemos sucesso na amplificação (Apêndice C), e seguiu o protocolo ABI Prism BigDye Terminator Cycle empregado no ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer.

O material amplificado no Brasil foi enviado à Macrogen (Coréia do Sul) e para a genômica da Universidade de São Paulo (Brasil). As amostras amplificadas na ANSDU e no INHM foram enviadas à Biofuncitions (Estados Unidos) e ao Field Museum (Estados Unidos), respectivamente.

3.3. Identificação dos espécimes

3.3.1. Preparo permanente dos espécimes

Após a extração, os espécimes de malófagos foram preservados em lâmina e lamínula de forma permanente como proposto por Palma (1978), seguindo as etapas de maceração em hidróxido de potássio (KOH) 10%; neutralização em água destilada e ácido acético durante 30 minutos para cada reagente; desidratação em série alcoólica de 70%, 80%, 96% e 100% durante 30, 20, 10 e 5 minutos, respectivamente; diafanização em óleo de cravo por no mínimo 24 horas; montagem entre lâmina e lamínula de vidro com duas gotas de bálsamo do Canadá; e secagem em estufa durante 7-14 dias. Após secas, as lâminas foram rotuladas com os dados de coleta, número do testemundo de DNA e identificação do espécime.

3.3.2. Delimitação das unidades taxonômicas operacionais (UTOs)

Definir as unidades taxonômicas dos parasitos e hospedeiros é um passo crítico para as análises co-filogenéticas (PAGE et al., 1996; SWEET et al., 2017). Como os malófagos

costumam abrigar espécies crípticas (MALENKE et al., 2009; ESCALANTE et al., 2016), foi necessário avaliar acuradamente o número de UTOs no conjunto de dados estudado. Para tal avaliação foi utilizado o método de descoberta automática de barcode (*Automatic Barcode Gap Discovery*, ABGD), na versão online do seu software (disponível em http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html), utilizando o alinhamento do único gene mitocondrial (COI) como dado de entrada, empregando os parâmetros padrões do software, com exceção da largura relativa do gap (*relative gap width*) que foi ajustado para 1.0. A análise foi testada sob ambos modelos Jukes-Cantor (JC) e Kimura80 (K80) (PUILLANDRE et al., 2012). Além disso, o valor da estimativa de distância genética das amostras (distância-*p*) foi calculado no programa MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016), juntamente com a identificação morfológica dos espécimes (ONIKI e EMERSON, 1981; MEY, 2004; PRICE e WECKSTEIN, 2006; VALIM e LINARDI, 2006, 2007) para delimitar os UTOs.

Foi reconstruída a rede de haplótipos para as espécies de *Mayriphilopterus* e *Picicola* para todos os genes individualmente com auxílio do programa PopArt (LEIGH e BRYANT, 2015), sob o algoritmo de TCS (CLEMENT et al., 2002), a fim de verificar a delimitação genética das amostras estudadas, e não para a análise de genética de populações.

3.4. Análise filogenética

As sequências individuais e concatenadas foram reconciliadas e editadas no software Geneious® v.8.0.5 (KEARSE et al., 2012). O eletroferograma de cada fita foi verificado para atestar a qualidade do sequenciamento e posteriormente as sequências foram alinhadas utilizando o plugin MUSCLE para fazer os *contigs*, novamente verificadas e ajustadas. Além disso, uma comparação com o banco de dados do GenBank foi feito utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), a fim de verificar a proximidade gênica das amostras primárias com àquelas da plataforma e eliminar a possibilidade de contaminações.

Todas as análises filogenéticas foram realizadas utilizando o banco de dados completo dos genes concatenados nos softwares disponíveis na plataforma CIPRES Scientific Gateway v.3.3 (disponível em: https://www.phylo.org) (MILLER et al., 2010).

A busca pelos modelos de substituição particionados foi feito por meio do programa PartitionFinder v.2.1 (LANFEAR et al., 2016), configurando os possíveis esquemas de partição por genes sob o critério de informação akaike corrigido (AICc) no modo *linked branches* (SUGIURA, 1978).

As árvores filogenéticas foram obtidas por meio dos testes probabilísticos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB), executadas nos softwares RAxML v.8.2 (STAMATAKIS, 2014) e MrBayes v.3.2 (RONQUIST et al., 2012), respectivamente.

Nas análises realizadas no software RAxML, foram utilizados os parâmetros de busca pela árvore de melhor *score*, 1.000 réplicas *bootstrap*, critério de *bootstrap* auto MRE e modelo GTR *gamma*. Este modelo de substituição foi utilizado pois o programa não permite a implementação de modelos específicos para diferentes partições de dados de uma mesma matriz.

No MrBayes foram aplicadas corridas com 50.000.000 de gerações, 4 cadeias, 2 corridas simultâneas, *burn-in*, 'sump' e 'sumt' de 25% e topologias amostradas a cada 1.000 gerações. A fase estacionária obtida pela IB foi avaliada mediante ao tamanho de amostra eficaz (*effective sample size*, ESS, >200), além da análise visual do traço, ambas realizadas no programa Tracer v.1.5 (RAMBAUT e DRUMMOND, 2009). As árvores obtidas tanto na MV quanto na IB foram visualizadas e editadas no programa FigTree (RAMBAUT, 2007).

3.5. Análise co-filogenética

Diferente da análise filogenética, a análise co-filogenética requer uma única UTO, sendo este o representante de sua espécie. Os demais táxons e os grupos externos foram removidos com auxílio do programa Dendroscope v.3 (HUSON e SCORNAVACCA, 2012), e as análises co-filogenéticas foram conduzidas baseadas em dois métodos, um de eventos e o outro de distâncias (DOYON et al., 2011, FILIPIAK et al., 2016, de VIENNE et al., 2013). Para a escolha dos representantes das espécies foi utilizado o seguinte critério, quando possível: (1) possuir todos os primers amplificados, (2) ser da localidade tipo e (3) ser proveniente do hospedeiro tipo.

3.5.1. Método baseado em distâncias

Foi utilizado um script R (disponível em: https://github.com/adsweet/cophylogenetic_analyses), para executar a análise do PARAFIT (LEGENDRE et al., 2002), dentro da plataforma R (R CORE TEAM, 2018). O PARAFIT utiliza ambas filogenias, tanto do parasito quanto do hospedeiro, e uma matriz de associação entre elas (ligação H-P, hospedeiro-parasito) como dados de entrada. O programa realiza um teste global de co-especiação (ParafitGlobal), usando randomizações entre esses dados de entrada sob a hipótese nula de que parasitos e hospedeiros

tiveram histórias evolutivas independentes. O programa também calcula a contribuição das associações individuais (H-P) por meio de outros dois testes estatísticos, o ParaFitLink1 (F1) e ParaFitLink2 (F2). As hipóteses nulas destes testes são de que as associações individuais acontecem de forma aleatórias ou ao acaso.

As árvores de MV escolhidas foram convertidas para matrizes de distância patrística usando o pacote ape (*analyses of phylogenetics and evolution*) (PARADIS et al., 2004), com os parâmetros de 999 permutações aleatórias usando os métodos de correção *lingoes* para autovalores negativos. A correção das falsas taxas de descobertas de múltiplos testes se deu através do controle de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995). Essas correções foram conduzidas no R, por meio da função pré definida da plataforma.

3.5.2. Método baseado em eventos

Foi utilizado o programa JANE v.4.01 (CONOW et al., 2010) que fundamenta-se na análise de reconciliação e avalia quais eventos (e.g., co-especiação, duplicação, duplicação e troca de hospedeiro, perdas e falhas em divergir) ocorreram entre as filogenias do parasito e do hospedeiro (de VIENNE et al., 2013).

As árvores utilizadas no JANE foram as aquelas obtidas na análise de MV, com os parâmetros de 150 gerações, tamanho de população 300 e o valor dos custos dos eventos no modo padrão do software (0 para co-especiação, 1 para duplicação, 1 para perda, 1 para falha em divergir e 2 para duplicação e troca de hospedeiro) (SWEET et al., 2016). Duas análises foram feitas no JANE, uma com o número de solução no modo padrão (99.999) e outra com apenas uma solução possível.

3.5.3. Relações co-filogenéticas compartilhadas

Foi realizado o teste exato de Fisher (FISHER, 1925), no programa R, para determinar se os padrões co-evolutivos entre *Mayriphilopterus* e *Picicola* com seus hospedeiros poderiam estar co-relacionados. Foi utilizada uma tabela de contingência com os resultados dos testes de associações individuais (F1 e F2) corrigidos pelo controle Benjamini-Hochberg. A tabela de contigência é uma matriz 2x2, cada célula da matriz indica se um determinado hospedeiro tem uma ligação significativa com suas espécies de parasitos, representando a contribuição da associação para a similaridade topológica entre as árvores. A hipótese nula deste teste é que os dois gêneros de malófagos apresentam padrões co-filogenéticos distintos.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação dos espécimes

Mayriphilopterus

A partir da comparação entre as distancias-*p*, a análise do ABGD, da rede de haplótipos (Figuras 1-2) e das comparações morfológicas dos espécimes estudados, foi possivel delimitar nove UTOs: *M. ernsti*, *M. galbulicus* (= *M. brevicephalus*)[1], *M. nystalicus*, *M. spinosus*, *Mayriphilopterus* sp.nov.1, *Mayriphilopterus* sp.nov.2, *Mayriphilopterus* sp.nov.3, *Mayriphilopterus* sp.nov.4 e *Mayriphilopterus* sp.nov.5.

[1]A análise dos tipos, de material fresco dos seus hospedeiros tipo e de DNA, mostrou que *Mayriphilopterus brevicephalus* Mey, 2004:172 é sinônimo júnior de *Mayriphilopterus galbulicus* Mey, 2004:171. A partir de agora no texto será considerado apenas o nome *M. galbulicus*.

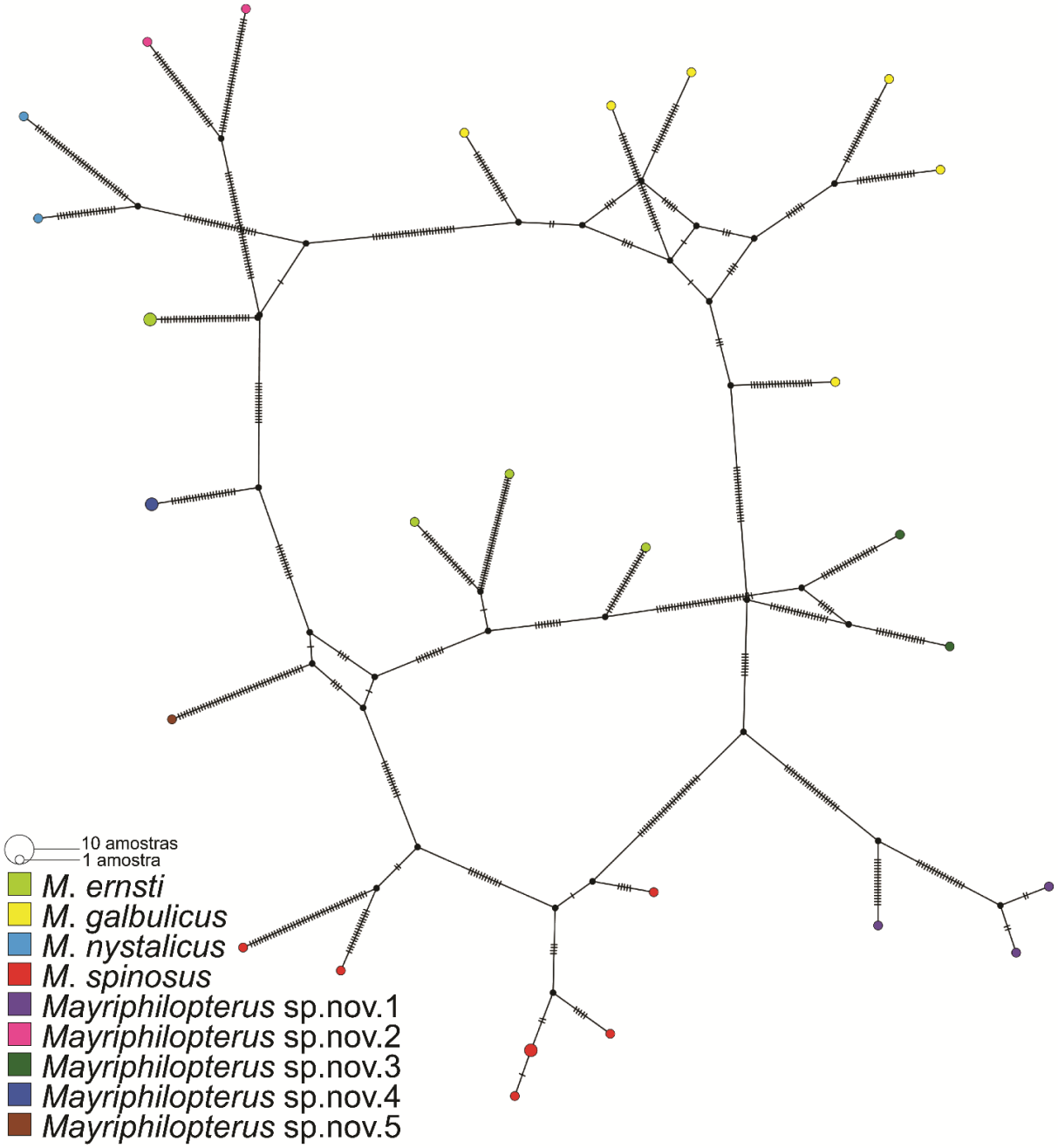


Figura 1. Rede de haplótipos do gene mitocondrial *COI-r* das espécies de *Mayriphilopterus*. Cada passo mutacional é representado por uma barra horizontal.

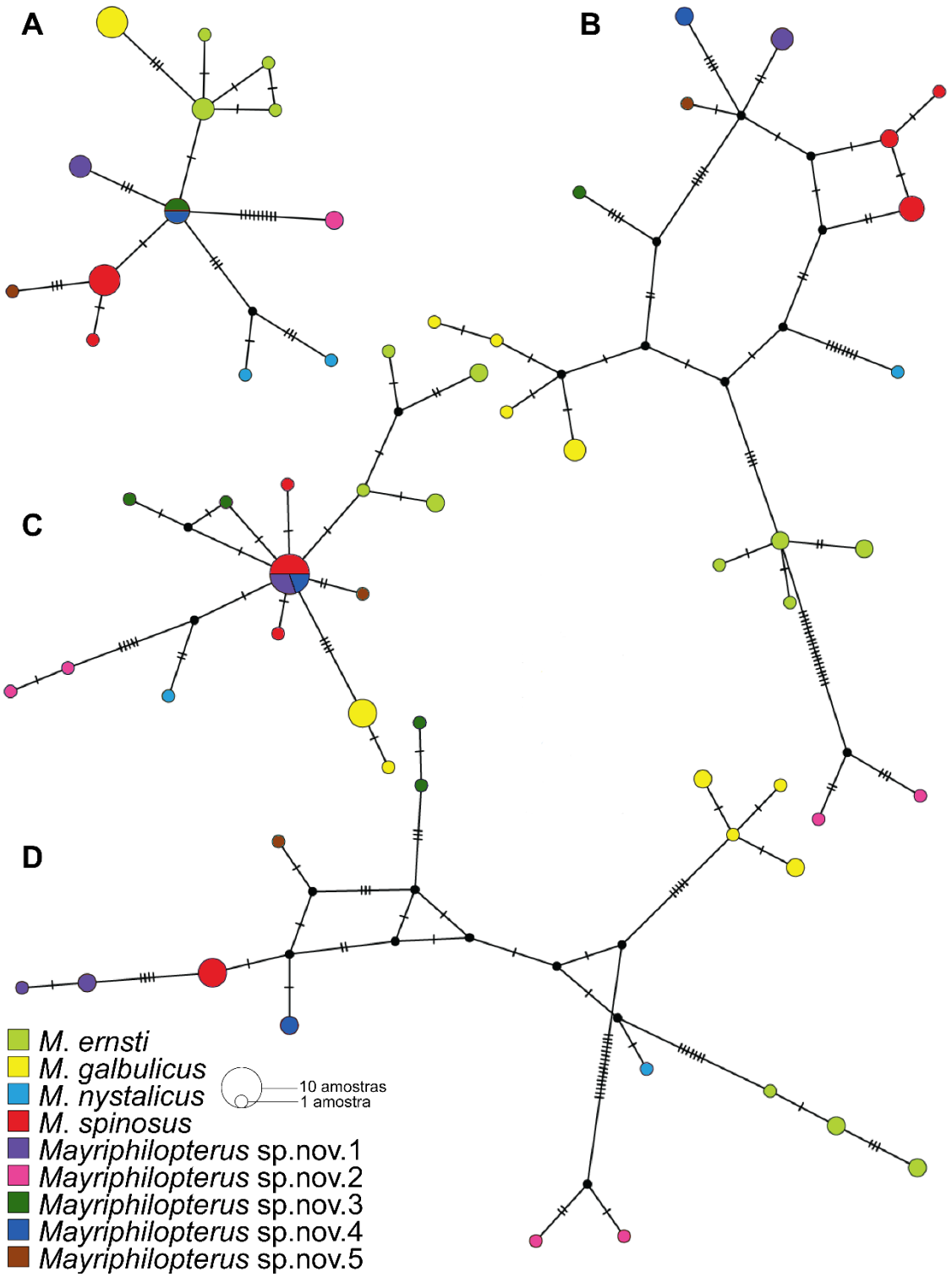


Figura 2. Rede de haplótipos para os genes nucleares das espécies de *Mayriphilopterus* (A, *EF-1α*; B, *BR-50*; C, *BR-69* e D, *BR-62*). Cada passo mutacional é representado por uma barra preta horizontal.

As distâncias-*p* entre as espécies do gênero *Mayriphilopterus* indicou uma variação interespecífica de 17-31% (Tabela 2).

Tabela 2. Distância-*p* calculada do gene mitocondrial *COI-r* dos nove UTOs de *Mayriphilopterus*, em porcentagem.

	M. galbulicus	***M. ernsti***	***M. nystalicus***	***M. spinosus***	***Mayriphilopterus* sp.nov.1**	***Mayriphilopterus* sp.nov.2**	***Mayriphilopterus* sp.nov.3**	***Mayriphilopterus* sp.nov.4**	***Mayriphilopterus* sp.nov.5**
M. galbulicus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. ernsti	20-25	-	-	-	-	-	-	-	-
M. nystalicus	23-28	20-25	-	-	-	-	-	-	-
M. spinosus	22-26	17-25	23-25	-	-	-	-	-	-
***Mayriphilopterus* sp.nov.1**	22-26	22-26	23-24	19-22	-	-	-	-	-
***Mayriphilopterus* sp.nov.2**	28-31	26-31	26-30	27-30	26-29	-	-	-	-
***Mayriphilopterus* sp.nov.3**	20-23	20-25	21-25	21-23	22-26	30-31	-	-	-
***Mayriphilopterus* sp.nov.4**	22-24	17-23	22-23	18-25	22-24	27-29	22-23	-	-
***Mayriphilopterus* sp.nov.5**	22-25	22-25	25	21-22	25-27	28-29	23-24	21	-

Foram determinados os intervalos de classe para a variação intraespecífica das espécies de *Mayriphilopterus*, que apresentou uma grande amplitude de variação dentro das espécies, desde 1%, como no caso de *Mayriphilopterus* sp.nov.1, chegando até 22%, como no caso de *M. ernsti* (Tabela 3).

Tabela 3. Variação intraespecífica dos nove UTOs de *Mayriphilopterus* baseado no alinhamento do gene mitocondrial *COI-r* recuperados pela distância-*p*, em porcentagem.

Espécies	**Distância-*p***	**Número de amostras**
M. ernsti	0-22	6
M. galbulicus	11-18	6
M. nystalicus	15	2
M. spinosus	0-17	7
Mayriphilopterus sp.nov.1	1-9	3
Mayriphilopterus sp.nov.2	18	2
Mayriphilopterus sp.nov.3	11	2
Mayriphilopterus sp.nov.4	0	2
Mayriphilopterus sp.nov.5	-	1

Picicola

Foram delimitados sete UTOs para as espécies de *Picicola*: *P. faucetti*, *P. oneilli*, *P. osheai*, *P. naokii*, *P. serrafreirei*, *P. striata* (= *P. galbulica*)[2] e *P. valquii* a partir dos valores das distâncias-*p*, aliados a análise do ABGD, da rede de haplótipos (Figuras 3-4) e das comparações morfológicas dos espécimes estudados.

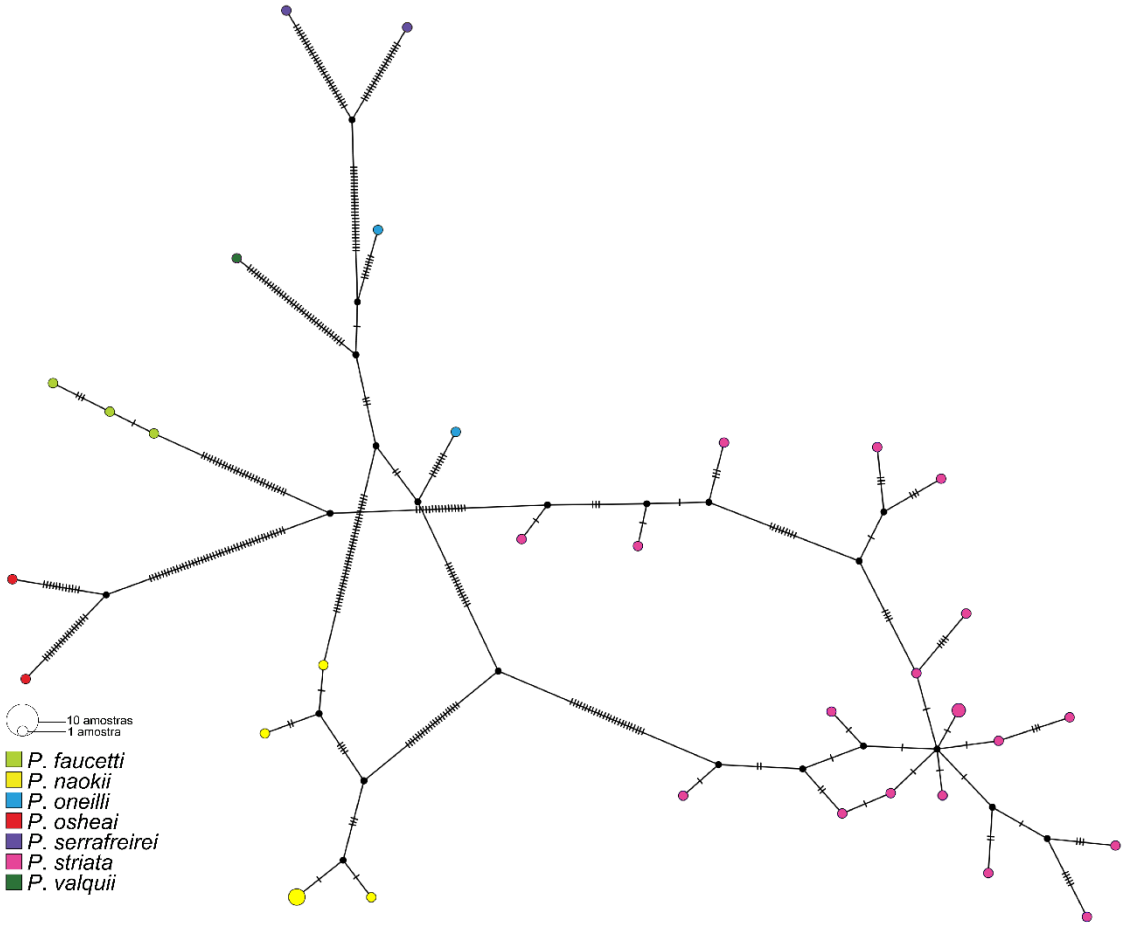


Figura 3. Rede de haplótipos para os gene mitocondrial *COI-r* para as espécies de *Picicola*. Cada passo mutacional é representado por uma barra preta horizontal.

[2]A análise dos tipos, de material fresco dos seus hospedeiros tipo e de DNA, mostrou que *Picicola galbulica* Valim et Linardi, 2006 é sinônimo júnior de *Picicola striata* Oniki et Emerson, 1981. A partir de agora no texto será considerada apenas a espécie *P. striata*.

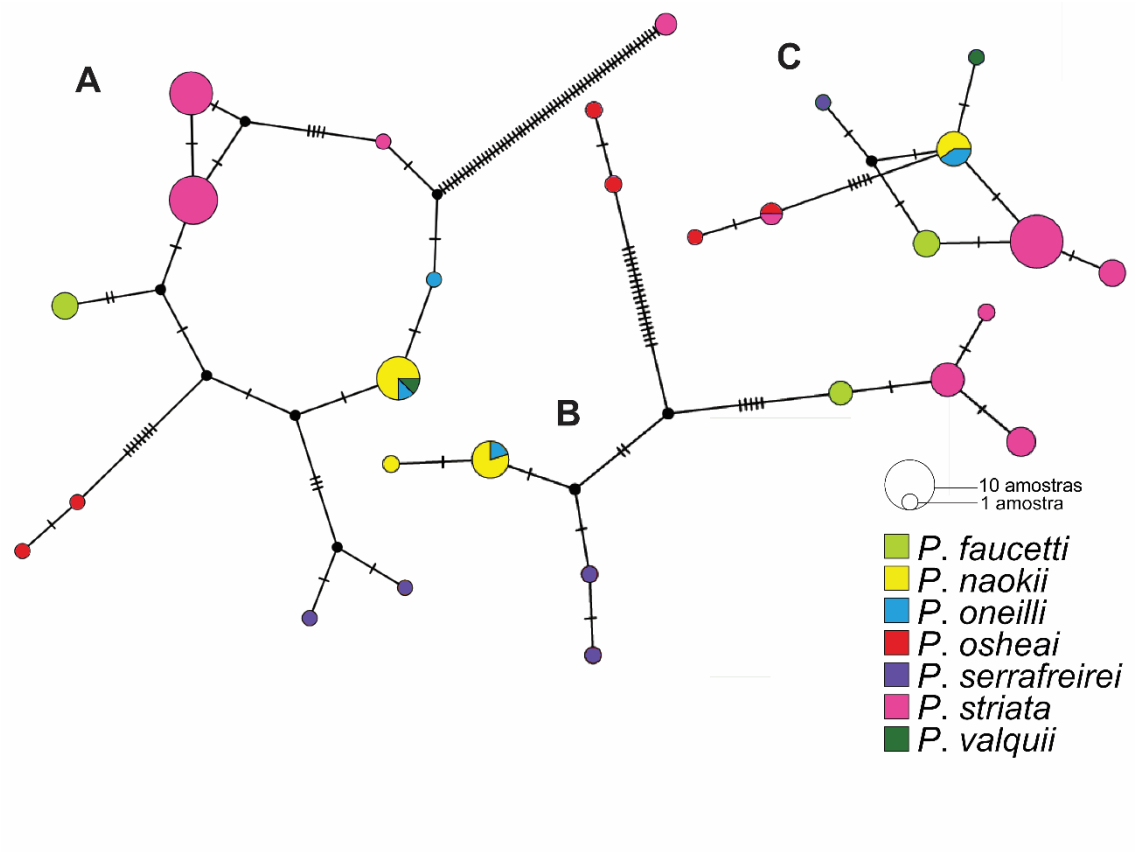


Figura 4. Rede de haplótipos para os genes nucleares das espécies de *Picicola* (A, *EF-1α*; B, *BR-50* e C, *BR-69*). Cada passo mutacional é representado por uma barra preta horizontal.

Para as espécies do gênero *Picicola*, foi encontrada uma variação interespecífica com amplitude de 11-23%, valores recuperados por meio das distâncias-*p*.

Tabela 4. Distância-*p* calculada do gene mitocondrial *COI-r* das sete UTOs de *Picicola*, em porcentagem.

	P. striata	***P. osheai***	***P. valquii***	***P. naokii***	***P. oneilli***	***P. serrafreirei***	***P. faucetti***
P. striata	-	-	-	-	-	-	-
P. osheai	19-22	-	-	-	-	-	-
P. valquii	14-15	22-23	-	-	-	-	-
P. naokii	12-15	21-23	13-14	-	-	-	-
P. oneilli	12-14	20-22	12-14	12-14	-	-	-
P. serrafreirei	15-17	19-21	17	18-19	14-17	-	-
P. faucetti	11-13	23	15-16	15-16	14	15-16	-

Foram determinados os intervalos de classe para a variação intraespecífica das espécies de *Picicola*. Nas espécies *P. faucetti*, *P. naokii*, *P. oneilli* e *P. striata* é onde encontramos os

menores valores dessa distância interespecífica (0-5%), já em *P. osheai* e *P. serrafreirei* a variação chegou até 12% (Tabela 5).

Tabela 5. Variação intraespecífica de sete UTOs de *Picicola* baseado no alinhamento do gene mitocondrial *COI-r* recuperados pela distância-*p*, em porcentagem.

Espécies	Distância-*p*	Número de amostras
P. faucetti	0,3-1	3
P. naokii	0-2	6
P. oneilli	4	2
P. osheai	8	2
P. serrafreirei	12	2
P. striata	0,2-5	22
P. valquii	-	1

4.2. Análise filogenética

Os genes *COI-l* para as espécies de ambos gêneros de malófagos e *BR-62* para as espécies de *Picicola* não amplificaram. O alinhamento concatenado para as espécies de *Mayriphilopterus* foi portanto, composto pelos genes *COI-r*, *EF-1α*, *BR-50*, *BR-62* e *BR-69* (1.464 pb), e para as espécies de *Picicola* foi composto pelos genes *COI-r*, *EF-1α*, *BR-50* e *BR-69* (1.331 pb).

Das 31 amostras de *Mayriphilopterus* trabalhadas, 26 amplificaram os cinco primers, duas não amplicaram o gene *BR-62*, uma amplificou apenas os genes *COI-r* e *EF-1α*, uma não amplificou o gene *BR-50* e uma não amplificou o gene *COI-r*. Das 38 amostras de *Picicola* trabalhadas, 14 amplificaram os quatro primers, 11 não amplificaram o gene *BR-50*, cinco não amplificaram o gene *BR-69*, quatro amplificaram apenas os genes *COI-r* e *EF-1α*, três amplificaram apenas os genes *EF-1α* e *BR-69* e uma amplificou apenas os genes *COI-r* e *BR-50* (Apêndice C). Todas as 69 amostras foram utilizadas no presente trabalho (Apêndice C).

O alinhamento concatenado final (2.741 pb) para as espécies dos Galbuliformes foi composto por três genes mitocondrias (*ND2*, *ND3* e *cytb*) e dois genes nucleares (*AK1* e *BFib7*).

Os modelos de substituição particionados selecionados para as espécies de *Mayriphilopterus* em cada gene foram GTR+I (*COI-r*), K80+I (*EF-1α*), TRN+I (*BR50*, *BR62*) e TRN+G (*BR69*). Para as espécies do gênero *Picicola* os modelos foram K81UF+I+G (*COI-r*), TRNEF+I (*EF-1α*), TVM (*BR50*) e TVM+I (*BR69*). E para as espécies de Galbuliformes os modelos recuperados foram GTR+I+G (*ND2*, *ND3*, *cytb*) e TIM+G (*AK1*, *BFib7*).

4.2.1. Galbuliformes

As árvores filogenéticas estimadas por meio dos testes probabilísticos (MV e IB) recuperaram a monofilia das famílias Bucconidae e Galbulidae. Observamos dois grandes clados, um abrigando os membros da família Bucconidae e outro contendo os membros da família Galbulidae, produzindo grupos externos recíprocos (Figura 5).

A família Bucconidae apresentou cinco clados menores (A-E), onde B-E são mais próximos. O clado A é formado pelas espécies dos gêneros *Nystalus* e *Bucco*. O clado B é composto pelas espécies do gênero *Monasa* e *Chelidoptera*. No clado C encontram-se as espécies do gênero *Malacoptila* e o clado D é onde estão as duas espécies de *Nonnula* estudadas. Por fim o clado E é onde encontramos as espécies do gênero *Notharchus*, *Nystactes*, *Nothriscus*, *Micromonacha* e *Hapaloptila*. O clado B é grupo-irmão de C+D, que por sua vez formam grupo-irmão com E (Figura 5).

A família Galbulidae compreende apenas um clado (clado F), que é composto pelas espécies do gênero *Galbula*, sendo que *G. albirostris* + *G. cyanicollis*, juntas formam grupo-irmão com as demais espécies de *Galbula* e *Jacamerops* (Figura 5).

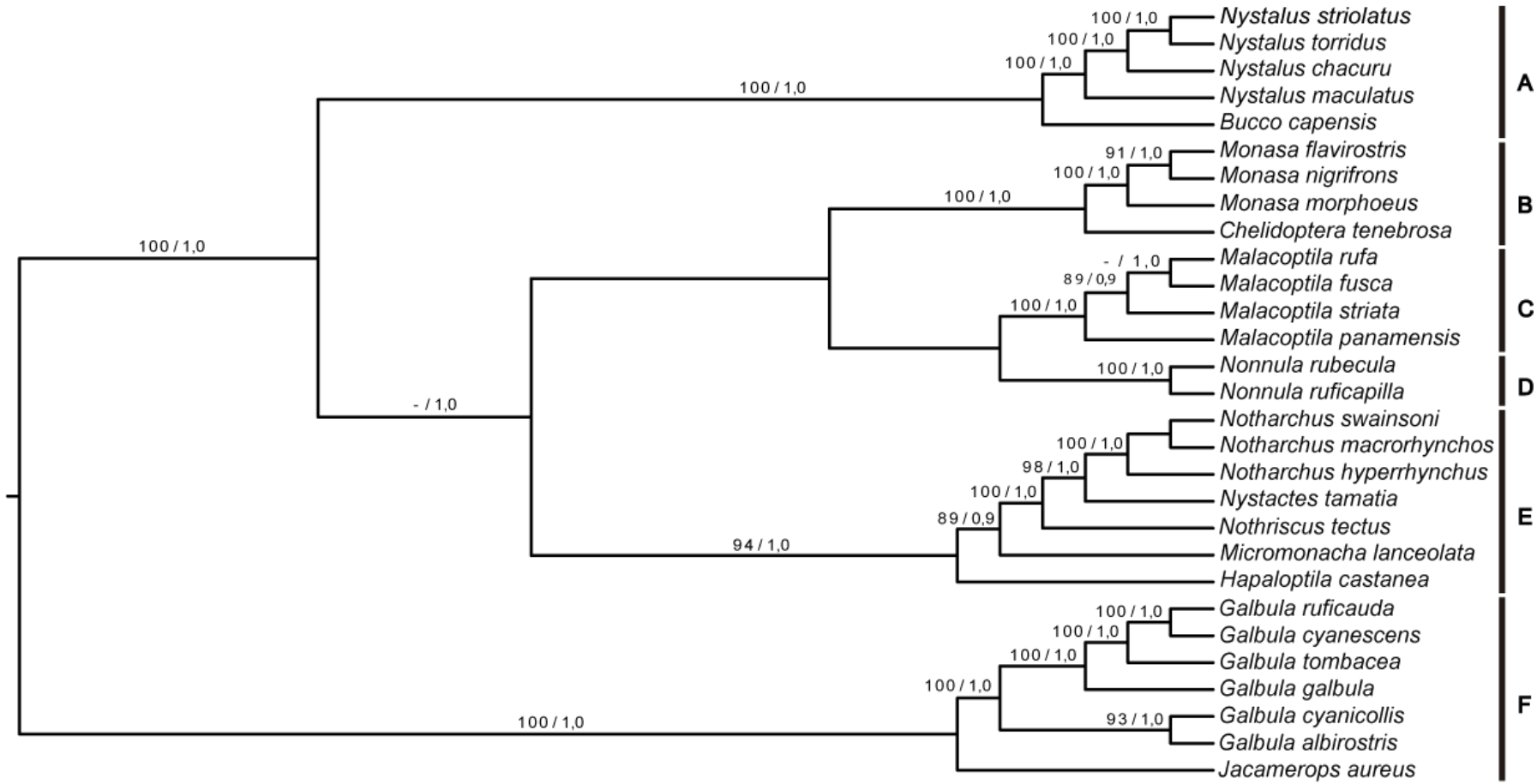


Figura 5. Filograma de máxima verossimilhança entre as espécies de Galbuliformes parasitados por malófagos. Os valores a esquerda dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* (> 85%) e probabilidade posterior (> 0,8), respectivamente. Os clados A-E representam as aves da família Bucconidae e F representa as aves da família Galbulidae.

4.2.2. Malófagos

Mayriphilopterus

As árvores filogenéticas estimadas por meio da análise de MV e IB apresentaram topologias muito semelhantes e ambas recuperaram o monofiletismo de *Mayriphilopterus* (Figura 6), sendo esta a primeira filogenia proposta para o gênero.

Foram encontrados oito clados. *Mayriphilopterus spinosus* e *Mayriphilopterus* sp.nov.5 as que compõem o clado A. Essas espécies são encontradas em uma mesma espécie de hospedeiro, *Chelidoptera tenebrosa*. Os clados B e C são irmãos e compostos por *Mayriphilopterus* sp.nov.4 e *Mayriphilopterus* sp.nov.1, respectivamente. O clado D, *Mayriphilopterus* sp.nov.3, forma grupo-irmão com B+C. Por sua vez, os clados B-D, formam grupo-irmão com o E, que é composto exclusivamente por *M. nystalicus*. Por fim, o clado H é onde estão os espécimes de *Mayriphilopterus* sp.nov.2, sendo este o clado mais externo da filogenia (Figura 6).

A topologia utilizada na discussão dos resultados é aquela recuperada pela IB por apresentar melhor resolução e suporte dos ramos em comparação com a recuperada pela MV.

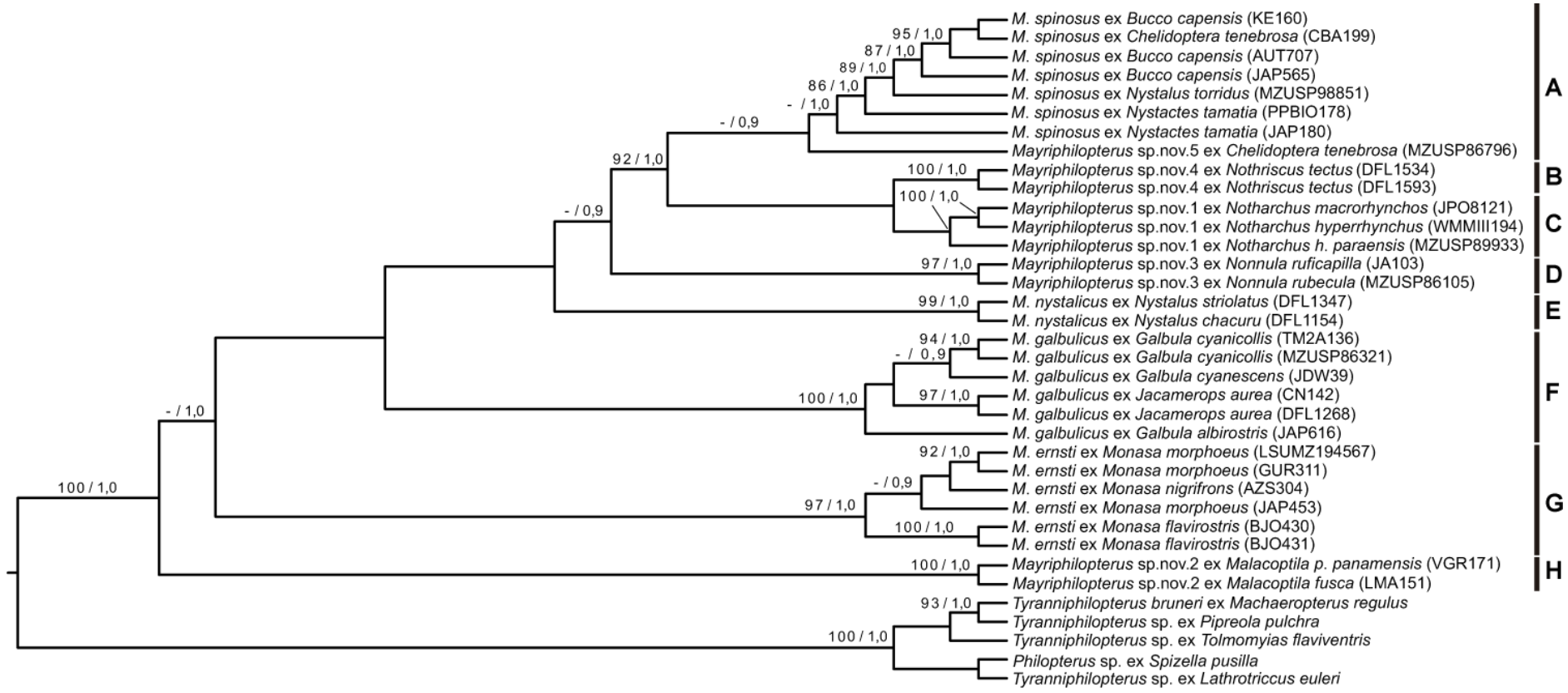


Figura 6. Filograma das espécies de *Mayriphilopterus* dos genes concatenados COI-r, EF-1α, BR50, BR62 e BR69 (1.627 pb). Os valores a esquerda dos nós correspondem aos valores de *bootstrap* (> 85%) e probabilidade posterior (> 0,8), respectivamente.

Picicola

As árvores filogenéticas estimadas por meio dos testes probabilísticos (MV e IB) apresentaram topologias muito semelhantes, divergindo nos clados que abrigam a espécie *Picicola striata*, onde na MV houve uma melhor resolução para os clados contendo as amostras desta espécie, enquanto na IB não houve nenhuma resolução. Optou-se por utilizar a topologia resultante da MV na discussão dos resultados. A árvore de IB foi a única a apresentar um valor alto de suporte (> 85) para o monofiletismo das espécies de *Picicola* parasitos de Galbuliformes (Figura 7).

As análises retornaram três grandes clados. O primeiro compreende os clados A e B, sendo um grupo-irmão do outro. No clado A é onde encontram-se os representantes de *P. strtiata* e no clado B é onde se encontra a espécie *P. faucetti*. O segundo clado é composto por C-F, onde C é a espécie *P. naokii*, D a espécie *P. valquii*, E a espécie *P. oneilli* e F a espécie *P. serrafreirei*. Por fim o terceiro clado, G, é onde encontra-se a espécie *P. oneilli*, sendo o único a recuperar o suporte máximo, tanto na MV como na IB (Figura 7). Todas espécies de *Picicola* apresentaram-se monofiléticas e as relações interespecíficas bem resolvidas. *Picicola striata* foi a única espécie a única registrada em ambas as famílias da ordem, todas as demais são parasitos exclusivos de Bucconidae (Figura 7).

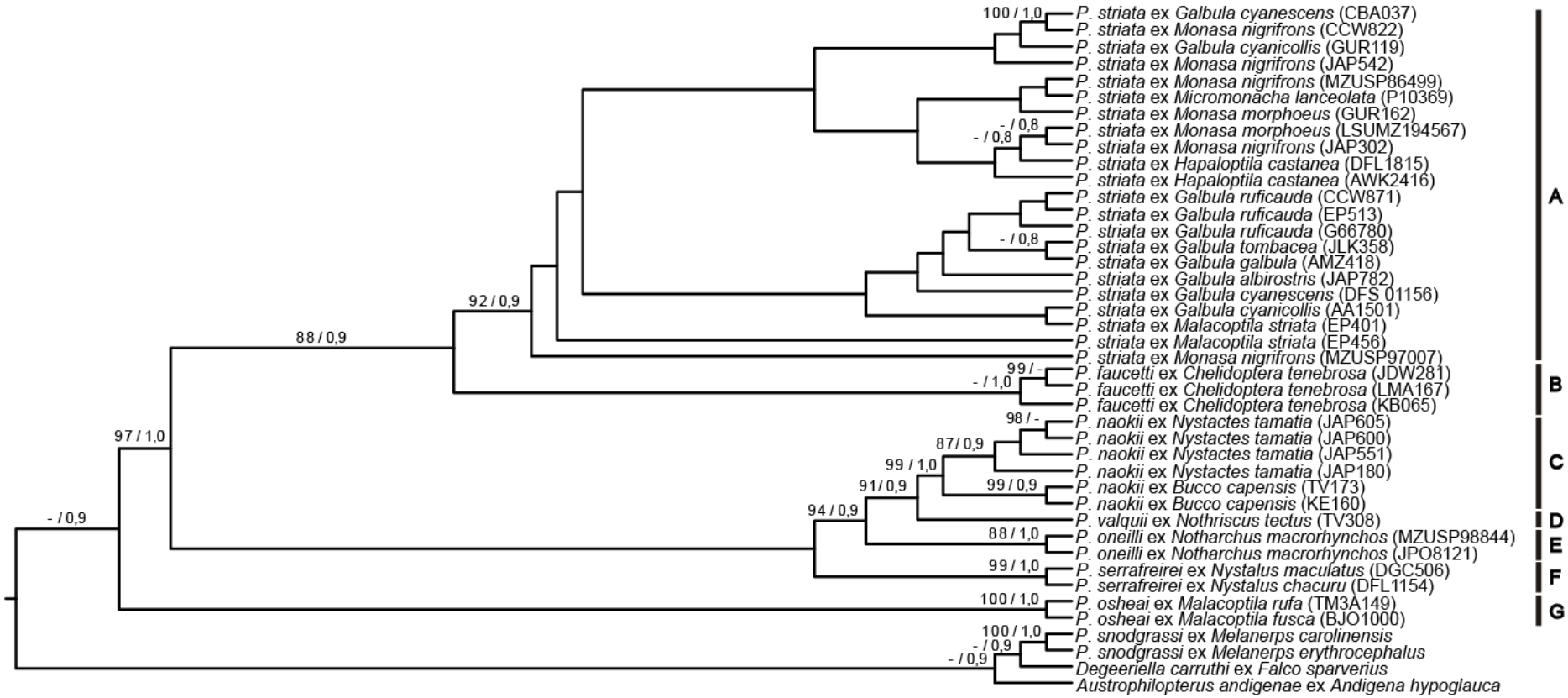


Figura 7. Filograma das espécies de *Picicola* dos genes concatenados COI-r, EF-1α, BR50 e BR69 (1.333 pb). Os valores a esquerda dos nós correspondem aos valores de bootstrap (> 85%) e probabilidade posterior (> 0,8), respectivamente.

4.3. Análise co-filogenética

4.3.1. Método baseado em distâncias

Mayriphilopterus

A estatística global do PARAFIT foi significativa (ParafitGlobal = 0,41; p = 0,02), indicando que as associações entre as espécies de *Mayriphilopterus* e seus hospedeiros não se deu forma aleatória, que parasito e hospedeiro co-evoluiram juntos. Ambas estatísticas para as ligações individuais, F1 e F2, resultaram em quatro ligações significativas após a correção para múltiplas comparações (Tabela 6, Figura 8). Quando ambos resultados do ParafitGlobal e das estatísticas F1 e F2 são significativos, significa que o PARAFIT detectou uma ligação H-P significativa ($\alpha = 0,05$). Já quando apenas o resultado do ParafitGlobal é significativo, entende-se que os dados não suportam a hipótese que essa ligação representa uma ligação co-evolutiva; uma vez que F1 e F2 tem menos poder do que o ParafitGlobal (LEGENDRE et al., 2002).

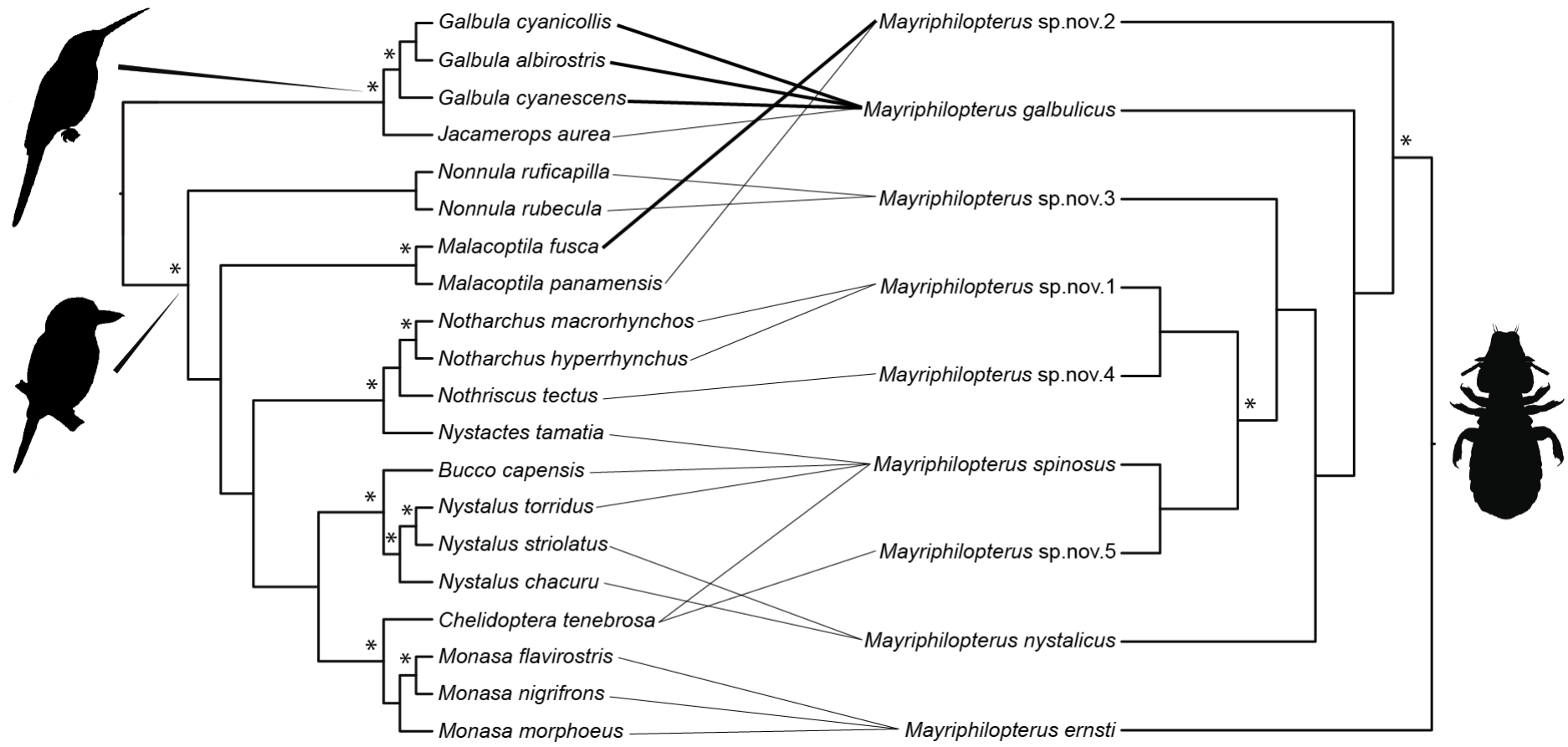


Figura 8. Tanglegrama baseado na análise de distância entre as espécies de Galbuliformes (lado esquerdo) e seus malófagos do gênero *Mayriphilopterus* (lado direito). As linhas espessas entre os parasitos e hospedeiros indicam uma associação significativa e os asteriscos indicam a propabilidade posterior (>85) recuperada pela máxima verossimilhança.

Tabela 6. Valores das ligações individuais das estatísticas ParaFitLink1 (F1) e ParaFitLink2 (F2) e seus *p*-valores das espécies de *Mayriphilopterus*.

Parasitos	Hospedeiros	F1 estatística	F1 *p*-valor	F2 estatística	F2 *p*-valor
M. ernsti	*Monasa flavirostris*	0,0063	0,3640	0,0154	0,2190
M. ernsti	*Monasa morphoeus*	0,0060	0,3640	0,0148	0,2190
M. ernsti	*Monasa nigrifrons*	0,0127	0,3640	0,0312	0,2190
M. galbulicus	*Galbula albirostris*	0,1110	0,0053*	0,2731	0,0053*
M. galbulicus	*Galbula cyanescens*	0,1162	0,0053*	0,2859	0,0053*
M. galbulicus	*Galbula cyanicollis*	0,1223	0,0053*	0,3008	0,0053*
M. galbulicus	*Jacamerops aureus*	0,0397	0,3640	0,0977	0,2190
M. nystalicus	*Nystalus chacuru*	0,0047	0,3640	0,0117	0,2190
M. nystalicus	*Nystalus striolatus*	0,0160	0,3640	0,0393	0,2190
M. spinosus	*Bucco capensis*	0,0068	0,3640	0,0168	0,2190
M. spinosus	*Chelidoptera tenebrosa*	0,0048	0,3640	0,0118	0,2190
M. spinosus	*Nystactes tamatia*	0,0047	0,3640	0,0116	0,2190
M. spinosus	*Nystalus torridus*	0,0051	0,3640	0,0126	0,2190
Mayriphilopterus sp.nov.1	*Notharchus hyperrhynchus*	0,0067	0,3640	0,0166	0,2190
Mayriphilopterus sp.nov.1	*Notharchus macrorhynchos*	0,0197	0,2100	0,0484	0,0588*
Mayriphilopterus sp.nov.2	*Malacoptila fusca*	0,1167	0,0053*	0,287	0,0053*
Mayriphilopterus sp.nov.2	*Malacoptila panamensis*	0,0069	0,3640	0,0169	0,219
Mayriphilopterus sp.nov.3	*Nonnula rubecula*	0,0090	0,3640	0,0222	0,219
Mayriphilopterus sp.nov.3	*Nonnula ruficapilla*	0,0415	0,3640	0,1021	0,219
Mayriphilopterus sp.nov.4	*Nothriscus tectus*	0,0092	0,3640	0,0226	0,219
Mayriphilopterus sp.nov.5	*Chelidoptera tenebrosa*	0,0048	0,3640	0,0117	0,219

*Significância estatística após a correção ($\alpha = 0,05$).

Picicola

A estatística global do PARAFIT foi não significativa (ParafitGlobal = 0,04; $p = 0,21$), indicando que as associações entre as espécies de *Picicola* e seus hospedeiros se deu de forma aleatória, não havendo evidências suficientes para afirmar que houve co-evolução entre eles. As estatísticas para ligações individuais encontraram apenas uma ligação significativa entre *Picicola striata* em *Galbula galbula* (Tabela 7, Figura 9). Quando o ParafitGlobal não é significativo mas do teste das ligações individuais sim, estamos lidando com uma estrutura mista, contendo uma estrutura co-evolutiva com algumas ligações aleatórias adicionadas. Quando nem o ParafitGlobal nem as estatísticas F1 e F2 resultam em ligações significativas, então é improvável que as ligações representem uma associação de co-evolução (LEGENDRE et al., 2002).

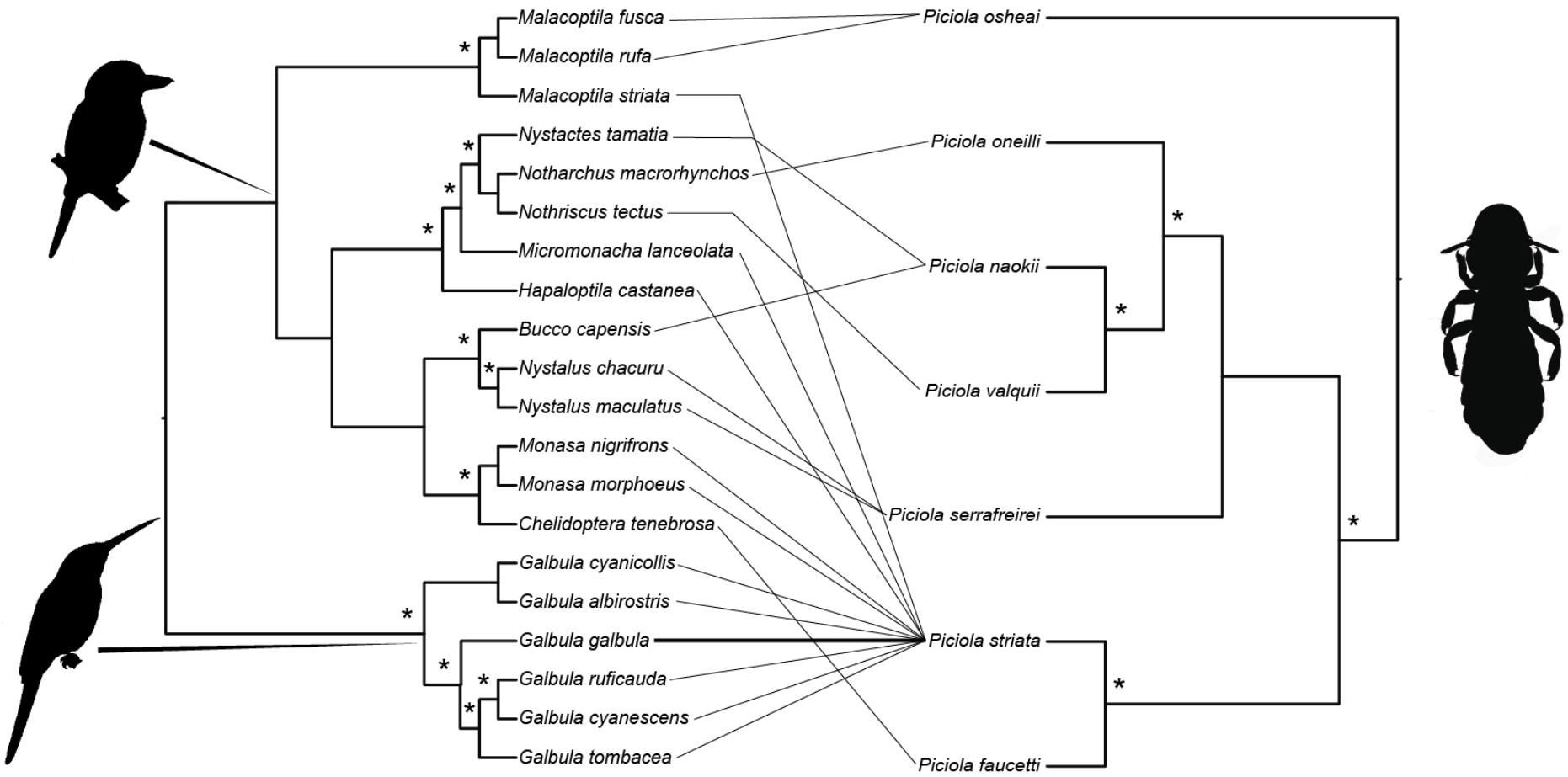


Figura 9. Tanglegrama baseado na análise de distância entre as espécies de Galbuliformes (lado esquerdo) e seus malófagos do gênero *Picicola* (lado direito). A linha espessa entre os parasitos e hospedeiros indicam uma associação significativa e os asteriscos indicam a propabilidade posterior (>85), recuperada pela máxima verossimilhança.

Tabela 7. Valores das ligações individuais das estatísticas ParaFitLink1 (F1) e ParaFitLink2 (F2) e seus *p*-valores para as espécies de *Picicola*.

Parasitos	Hospedeiros	F1 estatística	F1 *p*-valor	F2 estatística	F2 *p*-valor
P. faucetti	*Chelidoptera tenebrosa*	-0,0045	0,9730	-0,0031	0,9730
P. naokii	*Bucco capensis*	0,0011	0,6733	0,0007	0,6730
P. naokii	*Nystactes tamatia*	0,0014	0,6733	0,0009	0,6730
P. oneilli	*Notharchus macrorrhynchos*	0,0014	0,6733	0,0009	0,6730
P. osheai	*Malacoptila fusca*	0,0087	0,6733	0,0059	0,6730
P. osheai	*Malacoptila rufa*	0,0085	0,6733	0,0058	0,6730
P. serrafreirei	*Nystalus chacuru*	0,0018	0,6953	0,0012	0,6953
P. serrafreirei	*Nystalus maculatus*	0,0017	0,7014	0,0012	0,7014
P. striata	*Galbula albirostris*	0,0092	0,0750	0,0062	0,0800
P. striata	*Galbula cyanicollis*	-0,0065	0,9730	-0,0044	0,9730
P. striata	*Galbula cyanescens*	0,0084	0,0833	0,0057	0,0900
P. striata	*Galbula ruficauda*	0,0097	0,0750	0,0065	0,0800
P. striata	*Galbula tombacea*	0,0097	0,0750	0,0066	0,0800
P. striata	*Galbula galbula*	0,0250	0,0400*	0,0169	0,0400*
P. striata	*Hapaloptila castanea*	0,0083	0,0833	0,0056	0,0900
P. striata	*Malacoptila striata*	-0,0065	0,9730	-0,0044	0,9730
P. striata	*Monasa morphoeus*	-0,0054	0,9730	-0,0036	0,9730
P. striata	*Monasa nigrifrons*	-0,0053	0,9730	-0,0036	0,9730
P. striata	*Micromonacha l. lanceolata*	-0,0066	0,9730	-0,0045	0,9730
P. valquii	*Nothriscus tectus*	0,0014	0,6733	0,0009	0,6730

*Significância estatística após a correção ($\alpha = 0,05$).

4.3.2. Método baseado em eventos

Com base na definição dos táxons terminais, as árvore filogenéticas de MV foram cortadas, deixando apenas uma UTO como representante de cada espécie. Para o banco de dados das espécies de *Mayriphilopterus* foi utilizado nove terminais e 20 para seus hospedeiros, e para as *Picicola* foi utilizado sete terminais e 20 para seus hospedeiros.

Mayriphilopterus

O programa JANE recuperou em ambos os modos de solução (1 e 99.999), três eventos de co-especiação, nenhuma duplicação, cinco eventos de duplicação e troca de hospedeiro, quatro perdas e 13 falhas em divergir (Figura 10). O custo total dessas reconstruções foi de 27.

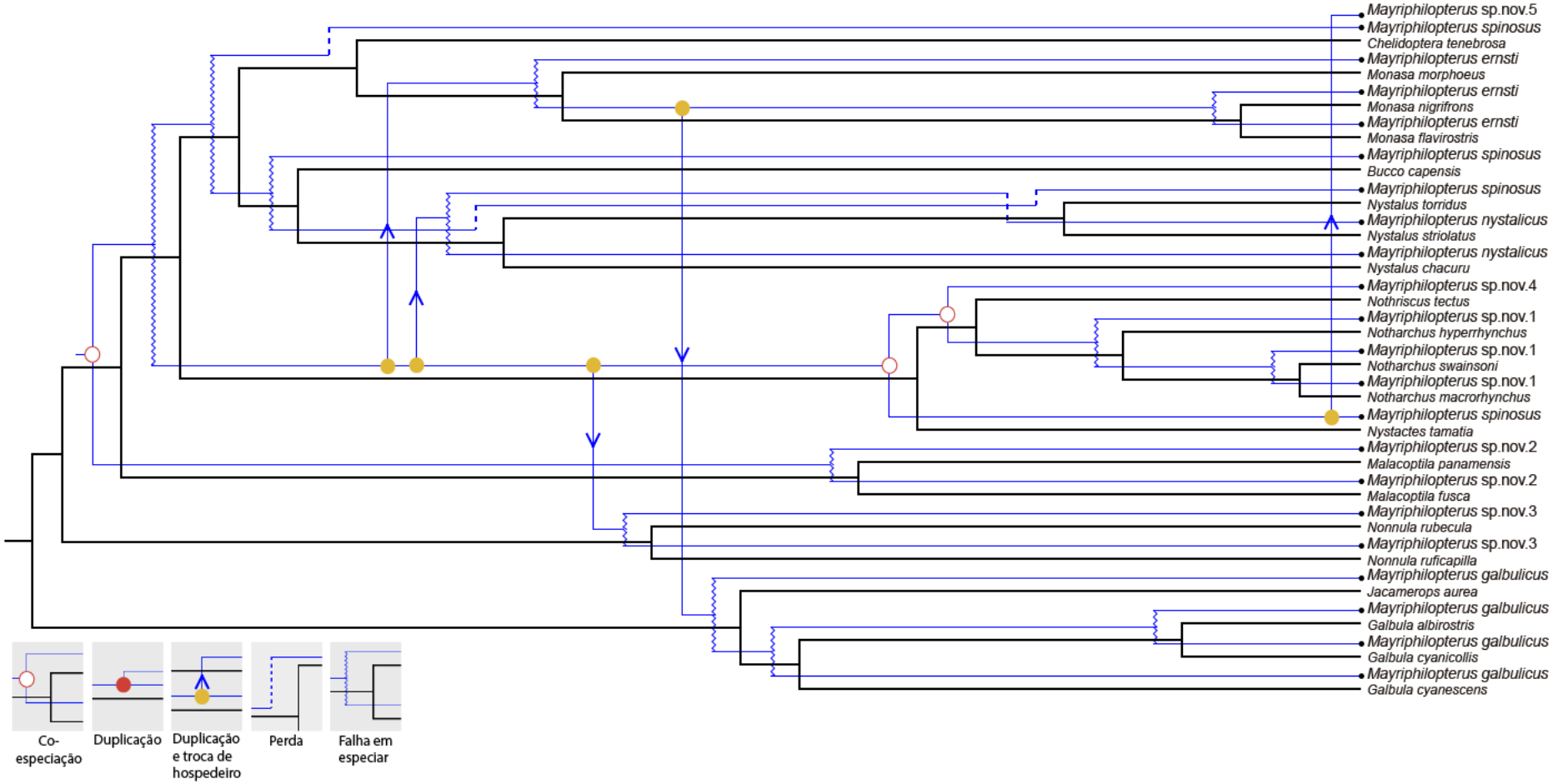


Figura 10. Tanglegrama baseado na análise de eventos entre as espécies de Galbuliformes e seus malófagos do gênero *Mayriphilopterus*. As linhas azuis representam a filogenia dos parasitos e as linhas pretas a dos hospedeiros.

O histograma recuperado pelo JANE mostra que na distribuição de dados de maneira aleatória os valores de média e mediana do custo foram 75,54 e 77 (desvio padrão = 7,81), respectivamente, que são pelo menos o dobro do encontrado. A linha tracejada representa o custo real da reconstrução da associação dos eventos (= 27) (Figura 11).

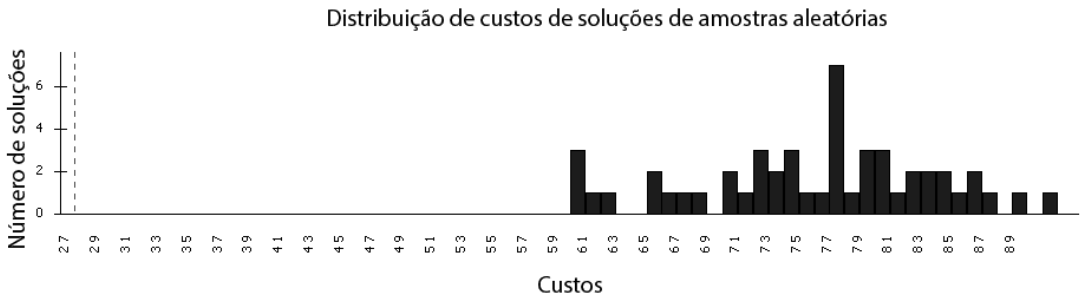


Figura 11. Histograma com a distribuição de custos para soluções de amostras aleatórias retornados pelo JANE para as espécies do gênero *Mayriphilopterus*.

Picicola

O programa JANE recuperou em ambos os modos de solução (1 e 99.999), dois eventos de co-especiação, nenhum evento de duplicação, quatro eventos de duplicação e troca de hospedeiro, oito perdas e 13 falhas em divergir (Figura 12). O custo total dessas reconstruções foi de 29.

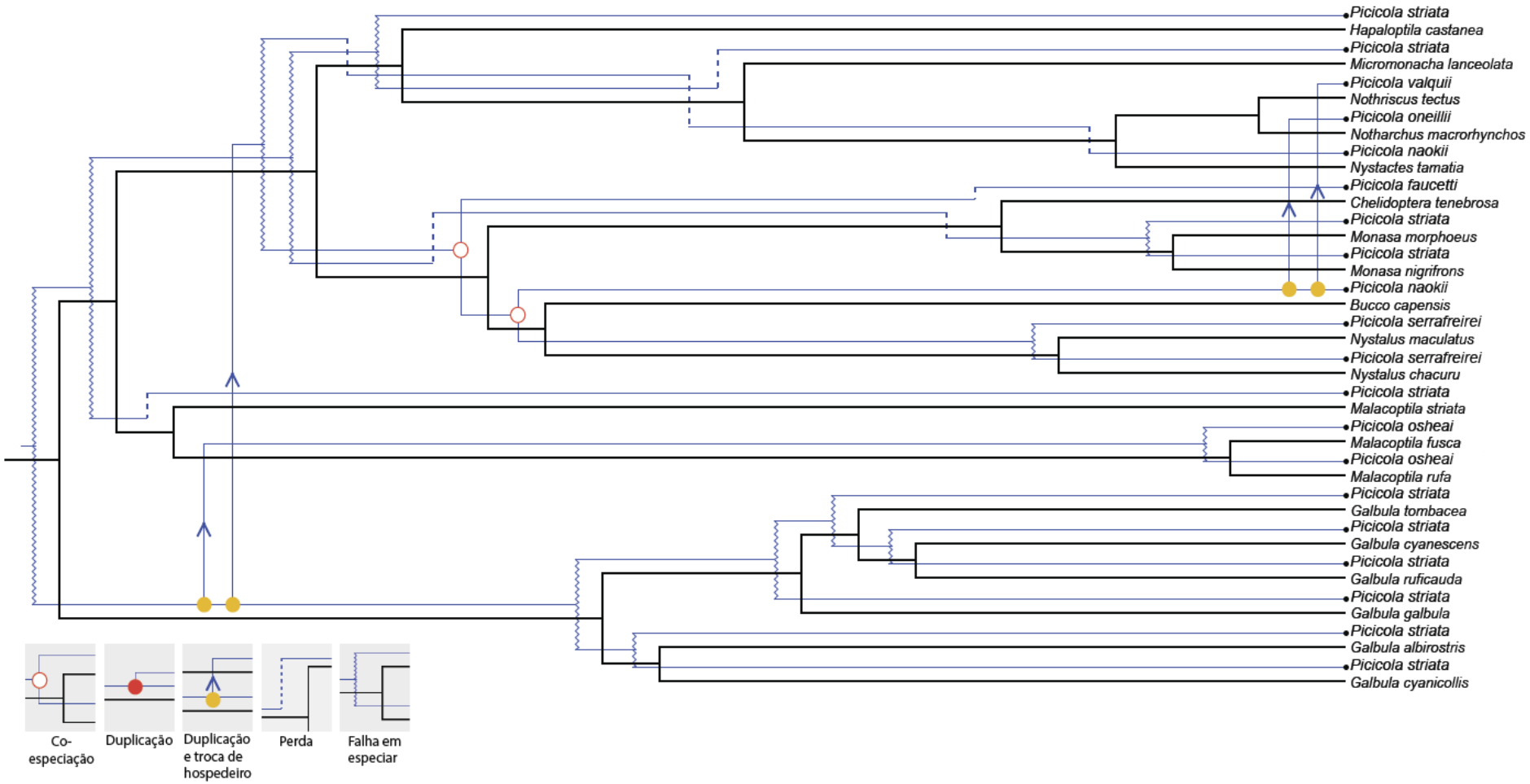


Figura 12. Tanglegrama baseado na análise de eventos entre as espécies de Galbuliformes e seus malófagos do gênero *Picicola*. As linhas azuis representam a filogenia dos parasitos e as linhas pretas a dos hospedeiros

O histograma recuperado pelo JANE mostra que na distribuição de dados de maneira aleatória os valores de média e mediana do custo foram 66,02 e 66 (desvio padrão 6,49), respectivamente, que que são pelo menos o dobro do encontrado. A linha tracejada representa o custo real da reconstrução da associação dos eventos (= 29) (Figura 13).

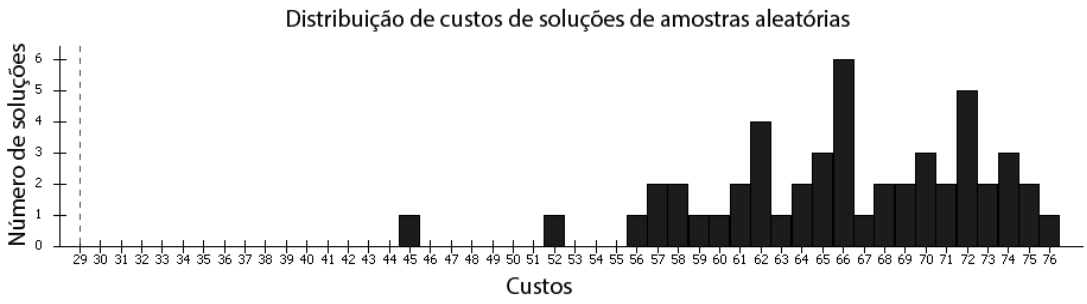


Figura 13. Histograma apresentando a distribuição de custos de soluções de amostras aleatórias retornados do programa JANE das espécies do gênero *Picicola*. A linha tracejada representa o custo real da reconstrução da associação dos eventos.

4.3.3. Relações co-filogenéticas compartilhadas

O teste exato de Fisher entre as ligações de ambos os gêneros, *Mayriphilopterus* e *Picicola*, com os seus hospedeiros Galbuliformes mostraram que eles não estavam significativamente associados entre si (p = 1,0).

5. DISCUSSÃO

Bucconidae e Galbulidae formam dois clados distintos para a ordem Galbuliformes, ambos monofiléticos. As árvores filogenéticas estimadas pela MV e IB concordam com os resultados obtidos completamente por Prum et al. (2015) e parcialmente por Ferreira (2018). Foi encontrado que as espécies de *Nonnula* formam um grupo-imão com as espécies de *Malacoptila* enquanto que para Ferreira (2018) esse clado é mais próximo de *Monasa* e *Chelidoptera tenebrosa*.

As duas famílias da ordem Galbuliformes atuam como grupo-externo da outra por serem filogeneticamente próximas (PRUM et al., 2015; FERREIRA, 2018), entretanto, esse padrão não é acompanhado pelos seus malófagos. *Mayriphilopterus galbulicus*, única espécie que

ocorre nos membros da família Galbulidae, não forma um grupo externo com as demais espécies que parasitam os membros da família Bucconidae. No caso das *Picicola*, *P. striata* é a única espécie que parasita os membros das duas famílias de hospedeiros, além de também não formar um clado externo as demais espécies desse gênero.

Como discutido por Price e Weckstein (2006), *Picicola galbulica* é morfologicamente similar à *Picicola striata*, sendo registrada apenas em aves da família Galbulidae (VALIM e LINARDI, 2006; PRICE e WECKSTEIN, 2006). Entretanto, os autores não fizeram maiores considerações por não possuirem material genético disponível de *P. striata* do hospedeiro tipo, *Malacoptila striata*. O nosso banco de dados contou com duas amostras de *P. striata* do hospedeiro tipo; e após a análise morfológica aliada aos resultados da distância-*p* (0,03-0,04% de divergência genética entre as *P. striata* e *P. galbulica*), é proposta a sinonímia de *Piciola striata* e *Picicola galbulica*, sendo aquela como sinônimo sênior. As demais espécies de *Picicola* descritas e definidas por Price e Weckstein (2006) também são geneticamente bem delimitadas (Tabela 4, Figuras 4-5). Baseados nos mesmos princípios moleculares, estatísticos e morfológicos, é proposta a sinonímia de *Mayriphilopterus galbulicus* e *Mayriphilopterus brevicephalus*, sendo aquela sinônimo sênior (MEY, 2004), além da descrição de cinco novas espécies, genética e morfologicamente distintas (CARRIKER, 1963; MEY, 2004).

Ambas filogenias de *Mayriphilopterus* e *Picicola* recuperaram o monofiletismo para os gêneros, provendo uma melhor compreensão da história evolucionária e taxonômica desses ectoparasitos (Figuras 6-7). Mey (2004) propõe três grupos de espécies para o gênero *Mayriphilopterus* (*galbulicus*, *nystalicus*, *spinosus*), sem dizer com exatidão quais as caracteristicas que os definem, nem prover uma posição filogenética entre eles. Entretanto, recuperamos os três grupos propostos pelo autor (Figura 6), além de propor mais dois, considerando que *Mayriphilopterus ernsti* não está inserido no grupo *spinosus*, como sugerido por Mey (2004). Price e Weckstein (2006) reconstruiram a filogenia das *Picicola* parasitos de Galbuliformes (baseados nos genes COI-r e EF-1α) e recuperaram agrupamentos dos quais apenas três deles foram recuperados da mesma forma neste estudo (Figura 7), sendo eles os clados com as espécies *P. naokii*, *P. oneilli* e *P. valquii*.

Embora muitas espécies de malófagos sejam hospedeiro-específicas, encontramos registros que corroborassem que a identificação dos malófagos não deve ser influenciada pela espécie do seu hospedeiro, uma vez que um mesmo malófago pode parasitar múltiplos hospedeiros e também que o mesmo hospedeiro pode albergar diferentes espécies desses parasitos (JOHNSON et al., 2002a, 2002b; JOHNSON e CLAYTON, 2003b). Alguns exemplos

que encontramos no nosso banco de dados foi de *Picicola striata* ocorrendo em onze espécies diferentes de aves, dos quais três são novos registros de hospedeiro. Assim como *Mayriphilopterus spinosus* foi registrada em quatro espécies de hospedeiros distintos. Também foi reportada a ocorrência de *Mayriphilopterus spinosus* e *Mayriphilopterus* sp.nov.5 em um único hospedeiro, *Chelidoptera tenebrosa* (Apêndice C), o que corrobora com os cinco eventos de troca de hospedeiros recuperado pelo JANE (Figura 12).

Padrões co-filogenéticos de diversificação

Filogenias de parasitos e hospedeiros totalmente congruentes são raras porque requerem repetidos eventos de co-especiação entre dois organismos específicos. Entretanto a especificidade com o hospedeiro não é equivalente a co-evolução, mas sim uma condição necessária (porém insuficiente) para congruência co-filogenética (CLAYTON et al., 2015).

Tanto os *Mayriphilopterus* como as *Picicola* apresentaram diferentes graus de co-evolução com seus hospedeiros, apresentando alguma congruência com os Galbuliformes, com 2-3 eventos de co-especiação e 4-5 eventos de duplicação e troca de hospedeiro (Figuras 8, 10), semelhante ao que já fora recuperada em outros grupos (HAFNER et al., 2003; HUGHES et al., 2007). Também foram recuperados eventos que acabam com essa congruência, como por exemplo a perda (4-8 eventos) e a falha em divergir (13 eventos) (Figuras 8, 10), como mostrado também nos estudos de Sweet et al. (2016) e Catanach et al. (2019).

Os eventos recuperados pelo JANE e as estatísticas do PARAFIT para os *Mayriphilopterus*, comparados com os eventos recuperados para o gênero *Picicola*, não estão co-relacionados. O PARAFIT apresentou significância apenas entre as espécies de *Mayriphilopterus* e seus hospedeiros, enquanto o JANE não mostrou um grande número de eventos de co-especiação para ambos os gêneros de malófagos. Além disso, o teste exato de Fisher falhou em rejeitar a hipótese nula de independência dos padrões co-filogenéticos entre eles (p = 1,0), não havendo evidências o suficiente para afirmar que os dois gêneros de malófagos tiveram histórias evolutivas semelhantes em resposta à diversificação do hospedeiro, como já mostrado em outros estudos (SWEET et al., 2016; CATANACH et al., 2019).

A descontinuidade na co-evolução dos *Mayriphilopterus* e *Picicola* com seus hospedeiros não é um fato comum, devido ao micro-habitat que esses organismos ocupam no corpo dos seus hospedeiros (DUBININ, 1938; CLAY, 1949; JOHNSON et al., 2012). Os *Mayriphilopterus* apresentam o morfotipo de organismos viventes na cabeça e pescoço do seu hospedeiro; possuem corpo arredondado, cabeça larga e mandíbulas fortes e largas (MEY,

2004). Esse hábitat está fora do alcance da ave quando ela faz o *preening* (mecanismo de retirada dos ectoparasitos com o bico e com o pé), por consequência a mobilidade desses malófagos é menor em comparação aos demais piolhos em outros micro-habitats (CLAY, 1949; MEY, 2004). Por estarem livre do *preening*, os malófagos que vivem neste micro-habitat estão propícios a terem relações co-evolutivas mais restritas com seus hospedeiros (BUSH et al., 2010; VALIM e WECKSTEIN, 2012; CLAYTON et al., 2015). Devido a essa restrição, supõe-se que esses organismos possuam populações menores (menor intensidade parasitária), em um único hospedeiro. Pequenas populações aumentam a probabilidade da ocorrência de eventos de perda e falha em divergir, corrompendo a congruência filogenética (JOHNSON et al., 2012; CLAYTON et al., 2015).

Essa distribuição no corpo do hospedeiro é equivalente a distribuição geográfica em animais de vida livre. Se as populações dos hospedeiros estiverem em contato contínuo (e.g. durante a cópula, brigas e nidificação), então o parasito pode se mover entre essas populações, mas se os hospedeiros forem divididos em populações isoladas ou semi-isoladas, então a população de malófagos também será dividida (CLAY, 1949; JOHNSON e CLAYTON, 2003b; CLAYTON et al., 2015). Os Galbuliformes têm distribuição endêmica para a região Neotropical (SICK, 2001), com espécies simpátricas (FERREIRA, 2018). Esse tipo de especiação tem um alto potencial para gerar eventos de duplicação e troca de hospedeiros nos malófagos (WECKSTEIN, 2004b; CLAYTON et al., 2015), o que explicaria, por exemplo, a ocorrência de *Picicola striata* em uma gama tão ampla de hospedeiros.

A troca de hospedeiros também pode ocorrer entre populações de espécies diferentes, como por exemplo entre presa e predador (CLAYTON e JOHNSON, 2003; SWEET et al., 2016; CATANACH et al., 2019) e nidificação no mesmo ninho (NORDBERG, 1936; CLAYTON, 1990; WECKSTEIN, 2004b). Sabe-se que os Galbuliformes nidificam em buracos (tanto no chão como em árvores) e que a competição por esses locais para fazer a nidificação pode ser extremamente intensa (MERILÄ e WIGGINS, 1995; SICK, 2001), favorecendo a ocorrência de eventos de troca de hospedeiros por parte dos malófagos.

Outro mecanismo que explica a troca de hospedeiros entre os malófagos, especialmente nos membros da subordem Ischnocera é a foresia (CLAY, 1949, KEIRANS, 1975; JOHNSON et al., 2002b). Essa associação permite que o malófago se prenda a uma mosca hipoboscídea (Diptera: Hippoboscidae) e vá para outro hospedeiro, uma vez que a mosca não apresenta elevado grau de especificidade parasitária. Em experimento, Harbison et al. (2008) testaram a habilidade de dispersão entre duas espécies diferentes de malófagos, *Columbicola columbae*

(Linnaeus, 1758) (piolho da asa) e *Campanulotes compar* (Burmeister, 1838) (piolho do corpo), ambos em *Columba livia* Gmelin, 1789 (pombo-doméstico). Os autores observaram que os piolhos que vivem na asa têm uma melhor capacidade de colonizar novos hospedeiros por meio de foresia, enquanto que o piolho do corpo não foi capaz de se prender às moscas. Há registros de membros do complexo-*Degeeriella* fazendo foresia (CLAY e MEINERTZHAGEN, 1943; KEIRANS, 1975), entretanto esse mecanismo é raro para os membros do complexo-*Philopterus* (CLAY e MEINERTZHAGEN, 1943). Essa diferença na habilidade de dispersão pode ser a razão da descontinuidade no processo co-evolutivo entre *Mayriphilopterus* e *Picicola* e seus hospedeiros Galbuliformes (JOHNSON et al., 2002c; WECKSTEIN, 2004b; BARTLOW et al., 2016).

Devido ao modo de vida tão especializado, o corpo dos malófagos apresentam diversas modificações. Na subordem Ischnocera os representantes mais primitivos possuem as carenas marginal e ventral da cabeça completa, enquanto os que possuem essas carenas medialmente rompidas são mais derivados (CLAY, 1951; MEY; 1994). As espécies do gênero *Picicola* apresentam as características mais primitivas enquanto os membros do gênero *Mayriphilopterus* dispõem das características secundárias (Apêndice A). Essa diferença morfológica pode estar relacionada a especifidade com o hospedeiro e por consequência produzir um número maior de eventos de co-especiação.

Os eventos mais influentes na evolução dos malófagos com seus hospedeiros é a co-especiação e a troca de hospedeiro. Entretanto vemos que os eventos *sorting* (perda e falha em divergir) também têm importância na topologia das filogenias desses organismos. Hughes et al. (2007) encontraram filogenias quase totalmente congruentes entre pelicanos (Aves: Pelicaniformes) e as espécies do gênero *Pectinopygus* Mjöberg, 1910 (Ischnocera, Philopteridae). Os eventos mais influentes na congruência desses organismos foram a co-especiação (dez) e a troca de hospedeiros (seis). Também foram recuperados três eventos *sorting* e nenhuma duplicação. O ParafitGlobal e 14 das 18 ligações foram significativas. O estudo de Hafner et al. (2003), entre os roedores *pocket gopher* (Rodentia: Geomyidae) e seus malófagos, dos gêneros *Geomydoecus* Ewing, 1929 e *Thomomydoecus* Price et Emerson, 1972 (Ischnocera, Trichodactidae), mostrou que o evento predominante entre esses organismos foi a co-especiação (12 em 15). Catanach et al. (2019) também observaram grande congruência no estudo entre os martim-pescadores (Aves: Alcedinidae: Alcedininae, Cerylinae, Halcyoninae) e seus malófagos dos gêneros *Alcedoffula* Clay et Meinertzhagen, 1939 e *Alcedoecus* Clay et Meinertzhagen, 1939 (Ischnocera, Philopteridae). Os eventos mais significativos naquele

estudo foram a co-especiação e a duplicação e troca de hospedeiro. Para os Alcedininae foram recuperados cinco eventos de co-especiação, enquanto para Cerylinae e Halcyoninae foram registrados quatro. Os valores para a duplicação e troca de hospedeiros para Alcedininae foi igual a quatro, dois para Cerylinae e apenas um para Halcyoninae. Os autores também encontraram duas perdas para os Alcedininae e uma para as duas outras subfamílias, apenas uma falha em divergir para Cerylinae e nenhuma perda para os martim-pescadores e seus malófagos. Banks et al. (2006), reconstruíram a história co-filogenética entre os pinguins (Aves: Spheniscidae) e seus malófagos dos gêneros *Austrogoniodes* Harrison, 1915 e *Nesiotimus* Kellogg, 1903 (Ischnocera, Philopteridae). Dentre as diferentes resoluções encontradas, o número de eventos foi o que mais variou, tendo no máximo quatro eventos de co-especiação e duas trocas de hospedeiro, além de apresentar o ParafitGlobal foi significativo. Outro caso de co-especiação positiva foi o encontrado por Hammer et al. (2010), que compararam as filogenias dos petréis (Aves, Procellariiformes) e as espécies de *Halipeurus* Thompson, 1936 (Ischnocera, Philopteridae). O resultado do ParafitGlobal foi significativo e, quando utilizado o banco de dados total, 16 das 32 ligações foram significativas.

A maioria dos estudos co-evolutivos dentro da ordem Phthiraptera estão voltados para a subordem Ischnocera, entretanto, alguns trabalhos têm sido feitos também para a subordem Amblycera, como o de Clayton et al. (2003), que analisou a relação dos andorinhões (Aves, Apodidae) e os malófagos do gênero *Dennyus* Neumann, 1906 (Amblycera, Menoponidae), a qual apresentou treze eventos de co-especiação. O estudo de Catanach et al. (2017), entre diversas ordens de aves (Accipitriformes, Anseriformes, Cariamiformes, Cuculiformes, Falconiformes, Galliformes, Passeriformes, Pelicaniformes, Phoenicopteriformes, Psittaciformes e Strigiformes, e os membros do complexo-*Colpocephalum* (Amblycera, Menoponidae), encontrou que a estatística do ParafitGlobal foi significativa e que os membros deste complexo não estão significativamente associados com os membros do complexo-*Degeeriella*, com os quais compartilham os mesmos hospedeiros.

Entretanto alguns estudos contam com um maior número de eventos que caracterizam essa descontinuidade filogenética como, por exemplo, o de Sweet et al. (2016) entre os pombos e rolinhas (Aves, Columbiformes) e seus dois gêneros de malófagos *Columbicola* Ewing, 1929 e *Physconelloides* Ewing, 1927 (Ischnocera, Philopteridae). Foram encontrados 15 eventos de co-especiação, quatro duplicações, 23 duplicações e trocas de hospedeiro, 22 perdas e 12 falhas em divergir entre as espécies de *Columbicola*; além disso 22 eventos de co-especiação, uma duplicação, 25 duplicações e troca de hospedeiros, 19 perdas e nove falhas em divergir nas

espécies de *Physconelloides*. Para esses dois gêneros de malófagos o ParafitGlobal foi significativo. Há casos onde não há congruência entre os parasitos e hospedeiros. Como na relação entre os tucanos (Aves: Piciformes) e as espécies de *Austrophilopterus* Ewing, 1929 (Ischnocera, Philopteridae), onde a biogeografia é o processo mais influente nas relações filogenéticas entre esses organismos (WECKSTEIN, 2004b). O autor encontrou apenas um evento de co-especiação e três duplicações e troca de hospedeiro, com muitos mais eventos *sorting* (de 17 a 22, dependendo da topologia usada).

Sabe-se que as aves começaram a divergir no início do Paleoceno (66 ma), depois da última grande extinção em massa (PRUM et al., 2015). Por outro lado, o estudo de de Moya et al. (em prep.) mostra que a diversificação dos malófagos se iniciou apenas no Oligoceno (34 ma). Ao contrário do que poderia se esperar sucessivos eventos de troca de hospedeiro contribuíram para a diversificação dos malófagos de aves mais do que a co-evolução propriamente dita. Apesar disso, os estudos publicados com malófagos (CLAYTON et al., 2003; HAFNER et al. 2003; WECKSTEIN, 2004b; BANKS et al., 2006; HUGHES et al., 2007; HAMMER et al., 2010; SWEET et al., 2016; CATANACH et al., 2017; CATANACH et al., 2019) mostram que vários eventos atuam de maneiras diferentes na visão micro-evolutiva, enquanto que todo esse grupo de parasitos pode apresentar um outro padrão sobre o ponto de vista macro-evolutivo (de MOYA et al., em prep.), tendo como influência direta relações ecológicas distintas que podem variar dependendo de acordo com o grupo de hospedeiros a ser estudado.

6. CONCLUSÕES

Foi recuperada a monofilia de todas as espécies de malófagos do gênero *Mayriphilopterus*.

Assim como os *Mayriphilopterus*, as espécies do gênero *Picicola* que parasitam aves da ordem Galbuliformes se mostraram monofiléticas.

As aves das famílias Bucconidae e Galbulidae, hospedeiros das espécies dos gêneros *Mayriphilopterus* e *Picicola*, apresentaram-se monofiléticas.

Foram recuperados mais eventos de co-especiação entre os *Mayriphilopterus* e seus hospedeiros do que entre as *Picicola* e os Galbuliformes, e a significância estatística foi positiva apenas entre os *Mayriphilopterus* e os Galbuliformes.

Baseado nos dois tipos de análises co-filogenéticas (eventos e distâncias), nenhum dos dois gêneros de malófagos apresentaram padrões perfeitos de co-evolução com seus hospedeiros. Fatores ecológicos (e.g. foresia e *preening*) podem estar delimitando os padrões de parasitismo observados.

7. REFERÊNCIAS

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology,** 215(3): 403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Arzua, M.; Valim, M.P. 2010. Bases para o estudo qualitativo e quantitativo de ectoparasitos de aves. *In*: Von Matter, S.; Straube, F.C.; Accordi, I.A.; Piacentini, V.Q.; Cândido Jr., J.F. (Eds.). **Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento**. Rio de Janeiro, Technical Books, Cap. 15, p. 1–17.

Banks, J.C.; Paterson, A.M. 2004. A penguin-chewing louse (Insecta: Phthiraptera) phylogeny derived from morphology. **Invertebrate Systematics,** 18: 89–100. doi: 10.1071/IS03022

Banks, J.C.; Palma, R.L.; Paterson, A.M. 2006. Cophylogenetic relationships between penguins and their chewing lice. **Journal of Evolutionary Biology,** 19: 156–166. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.00983.x

Bartlow, A.W.; Villa, S.M.; Thompson, M.W.; Bush, S.E. 2016. Walk or ride? Phoretic behaviour of amblyceran and ischnoceran lice. **International Journal for Parasitology,** 46(4): 221–227. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.01.003

Becker, E.R. 1933. Host-specificity and specifity of the animal parasites. **American Journal of Tropical Medicine,** 13: 505–523.

Benjamini, Y.; Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society,** 57: 289–300. doi: 10.2307/2346101

Bush, S.E.; Dukgun, K.; Reed, M.; Clayton, D.H. 2010. Evolution of cryptic coloration in Ectoparasites. **The American Naturalist,** 176(4): 529–535. doi: 10.1086/656269

Carriker Jr., M.A. 1963. New and little known Mallophaga from Venezuelan birds (Part II). **Memoria Sociedad de Ciencias Naturales La Salle,** 23(64): 5–42.

Catanach, T.A.; Valim, M.P.; Weckstein, J.D.; Johnson, K.P. 2017. Cophylogenetic analysis of lice in the *Colpocephalum* complex (Phthiraptera: Amblycera). **Zoologica Scripta,** 47: 72–83. doi: 10.1111/zsc.12262

Catanach, T.A.; Johnson, K.P.; Marks, B.D.; Moyle, R.G.; Valim. M.P.; Weckstein, J.D. 2019. Two lineages of kingfisher feather lice exhibit different degrees of cospeciation with their hosts. **Parasitology,** 1–13. doi: 10.1017/S0031182019000453

Cicchino, A.C. 1981. Contribución al conocimiento de los malófagos argentinos XI. Dos nuevas especies del subgénero *Picicola* (*Tyrannicola*) Carriker, 1956, parasitas de Furnariidae (Aves: Passeriformes). **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina,** 40: 279–283.

Clay, T.; Meinertzhagen, R. 1938. Two new genera of Mallophaga. **The Entomologist,** 71(899): 73–76.

Clay, T.; Meinertzhagen, R. 1943. The relationship between Mallophaga and hippoboscid flies. **Parasitology,** 35(1–2): 11–16.

Clay, T. 1949. Some problems in the evolution of a group of ectoparasites. **Evolution,** 3: 279–299.

Clay, T. 1950. A preliminary survey of the distribution of the Mallophaga ("feather lice") on the class Aves (birds). **Journal of the Bombay Natural History Society,** 49(3): 430–443.

Clay, T. 1951. An introduction to a classification of the avian Ischnocera (Mallophaga): Part I. **Transactions of the Royal Entomological Society of London,** 102: 171–195.

Clayton, D.H. 1990. Host specificity of *Strigiphilus* Owl lice (Ischnocera: Philopteridae), with the description of new species and host associations. **Journal of Medical Entomology,** 27(3): 257–265. doi:10.1093/jmedent/27.3.257

Clayton, D.H.; Price, R.D.; Page, R.D.M. 1996. Revision of *Dennyus* (*Collodennyus*) lice (Phthiraptera: Menoponidae) from swiftlets, with descriptions of new taxa and a comparison of host-parasite relationships. **Systematic Entomology,** 21: 179–204. doi: 10.1046/j.1365-3113.1996.d01-13.x

Clayton, D.H.; Walther, B.A. 1997. Collection and quantification of arthropod parasites of birds. *In* Clayton, D.H.; Moore, J. (Eds.). **Host-parasite evolution: general principles and avian models**. Oxford, Oxford University Press. p. 419–440.

Clayton, D.H.; Johnson, K.P. 2003. Linking coevolutionary history to ecological process: Doves and lice. **Evolution,** 57(10): 2335–2341.

Clayton, D.H.; Al-Tamimi, S.; Johnson, K.P. 2003. The ecological basis of coevolutionary history. *In*: Page, R.D.M. (Ed.). **Tangled trees: phylogeny, cospeciation and coevolution**. Chicago, The University of Chicago Press. p.195–220.

Clayton, D.H.; Bush, S.E.; Johnson, K.P. 2015. **Coevolution of life on hosts**. Chicago, The University of Chicago Press. 320p.

Clement, M.; Snell, Q.; Wwalke, P.; Posada, D.; Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. *In*: International Parallel Distributed Processing Symposium, 16º. **Proceeding** IEEE Computing Society. p. 184.

Conow, C.; Fielder, D.; Ovadia, Y.; Libeskind-Hadas, R. 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. **Algorithms for molecular biology,** 5(10): 1–10. doi: 10.1186/1748-7188-5–16

Dalgleish, R.C. 1969. The *Picicola* (Phthiraptera: Ischnocera) of the Picidae (Aves: Piciformes). **Proceedings of the Royal Entomological Society of London (Series B),** 38: 101–113.

Danfort, B.N.; Ji, S. 1998. Elongation factor-1α occurs as two copies in bees: implications for phylogenetic analysis of EF-1α sequences in insects. **Molecular biology and Evolution,** 15: 225–235.

de Moya, R.; Allen, J.M.; Sweet, A.D.; Walden, K.K.O.; Palma, R.L.; Smith, V.S..; Cameron, S.L.; Valim, M.P.; Galloway, T.D.; Weckstein, J.D.; Johnson, K.P. In prep. **The erlist codivergence in avian feather lice indicates extensive host-switching after the Cretaceous-Paleogene mass extinction event**.

de Vienne, D.M.; Refrégier, G.; López-Villavicencio, M.; Tellier, A.; Hood, M.E.; Giraud, T. 2013. Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. **New Phytologist,** 198(2): 347–385. doi: 10.1111/nph.12150

Doyon, J.P.; Ranwez, V.; Daubin, V.; Berry, V. 2011. Models, algorithms and programs for phylogeny reconciliation. **Briefings in Bioinformatics,** 12(5): 392–400. doi: 10.1093/bib/bbr045

Dubinin, D.B. 1938. Ismenenija parasitofauny karavajki (*Plegadis falcinellus*) vysyvajemyje vosrostorn i migracjej chosiaina. **Trudy Astrachanskogo Gosudarstvennogo Zapovednika,** 2: 114–212.

Escalante, G.C.; Sweet, A.D.; Mccracken, K.G.; Gustafsson, D.R.; Wilson, R.E.; Johnson, K.P. 2016. Patterns of cryptic host specificity in duck lice based on molecular data. **Medical and Veterinary Entomology,** 30(2): 200–208. doi: 10.1111/mve.12157

Fahrenholz, H. 1913. Ectoparasiten und abstammungslehre. **Zoologischer Anzeiger,** 41: 371–374.

Ferreira, M. 2018. **Filogenia e biogeografia de três famílias de aves do Neotrópico.** 115 f. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas.

Filipiak, A.; Zając, K.; Kübler, D.; Kramarz, P. 2016. Coevolution of host-parasite associations and methods for studying their cophylogeny. **Invertebrate Survival Journal,** 13: 56–65.

Fisher, R.A. 1925. **Statistical methods for research workers**. Edimburgh, Oliver & Boyd. 362p.

Folmer, O.; Black, M.; Hoew, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mithocondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology,** 3(5): 294–299.

Giebel, C.G.A. 1876. Zwei neue Epizoen (*Nirmus sulphureus* and *Menopon caudatum*) von *Trogon* und *Galbula ruficauda*. **Zeitschrift für die gesammten Naturwissenschaften,** 47: 528–529.

Hafner, M.S.; Sudman, P.D.; Villablance, F.X.; Spradling, T.A.; Demastes J.W.; Nadler, S.A. 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. **Science,** 365: 1087–1090.

Hafner, M.S.; Demastes, J.W.; Spradling, T.A.; Reed, D.L. 2003. Cophylogeny between pocket gophers and chewing lice. *In*: Page, R.D.M. (Ed.). **Tangled trees: phylogeny, cospeciation and coevolution**. Chicago, The University of Chicago Press. p.195–220.

Hammer, S.; Brown, R.; Bugoni, L.; Palma, R.; Hughes, J. 2010. On the origin of *Halipeurus heraldicus* on Round Island petrels: Cophylogenetic relationships between petrels and their chewing lice. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 55: 1111–1120. doi:10.1016/j.ympev.2010.01.013

Harbison, C.W.; Bush, S.E.; Malenke, J.R.; Clayton, D.H. 2008. Comparative transmission dynamics of competing parasites species. **Ecology,** 89(11): 3186–3194. https://doi.org/10.1890/07-1745.1

Hopkins, G.H.E. 1949. The host associations of the lice of mammals. **Proceedings of the Zoological Society of London,** 119: 387–604.

Hopkins, G.H.E.; Clay, T. 1952. **A check list of the genera & species of Mallophaga**. London, British Museum of Natural History. 362p.

Hughes, J.; Kennedy, M.; Johnson, K.P.; Palma, R.L.; Page, R.D.M. 2007. Multiple cophylogenetic analysis reveals frequent cospeciation between Pelicaniform birds and *Pectinopygus* lice. **Systematic Biology,** 56(2): 232–251.

Huson, D.H.; Scornavacca, C. 2012. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and network. **Systematic Biology,** 61(6): 1061–1067. doi: 10.1093/sysbio/sys062

Johnson, K.P.; Drown, D.M.; Clayton, D.H. 2001a. A data based parsimony method of cophylogenetic analysis. **Zoologica Scripta,** 30(2): 79–87. doi: 10.1046/j.1463-6409.2001.00057.x

Johnson, K.P.; Adams, R.J.; Clayton, D.H. 2001b. Molecular systematics of Goniodidae (Insecta: Phthiraptera). **Journal of Parasitology,** 87(4): 862–869.

Johnson, K.P.; Adams, R.J.; Clayton, D.H. 2002a. The phylogeny of the louse genus *Brueelia* does not reflect host phylogeny. **Biological Journal of the Linnean Society,** 77: 233–247. doi: 10.1046/j.1095-8312.2002.00107.x

Johnson, K.P.; Weckstein, J.D.; Witt, C.C.; Faucett, R.C.; Moyle, R.G. 2002b. The perils of using host relationships in parasite taxonomy: Phylogeny of the *Degeeriella* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 23: 150–157.

Johnson, K.P.; Williams, B.L.; Drown, D.M.; Adams, R.J.; Clayton, D.H.. 2002c. The population genetics of host specificity: genetic differentiation in dove lice (Insecta: Phthiraptera). **Molecular Ecology,** 11: 25–38.

Johnson, K.P.; Clayton, D.H. 2003a. The biology, ecology, and evolution of chewing lice. *In*: Price, R.D.; Hellental, R.A.; Palma, R.L.; Johnson, K.P.; Clayton, D.H. (Eds.). **The chewing lice: world checklist and biological overview**. Champaign, Natural History Survey. p. 449–476. (Special Publication)

Johnson, K.P.; Clayton, D.H. 2003b. Coevolutionary history of ecological replicates: comparing phylogenies of wing and body lice to Columbiform hosts. *In*: Page, R.D.M. (Ed.). **Tangled trees: phylogeny, cospeciation and coevolution**. Chicago, The University of Chicago Press. p. 262–286.

Johnson, K.P.; Shreve, S.M.; Smith, V.S. 2012. Repeated adaptive divergence of microhabitat specialization in avian feather lice. **BMC Biology,** 10(52): 1–11. doi: 10.1186/1741-7007-10-52

Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C. 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics,** 28: 1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199

Keirans, J.E. 1975. A review of the phoretic relationship between Mallophaga (Phthiraptera: Insecta) and Hippoboscidae (Diptera: Insecta). **Journal of Medical Entomology,** 12(1):

71–76.

Kellogg, V.L. 1913. Distribution and species-forming of ecto-parasites. **The American Naturalist,** 47:129–158.

Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution,** 33: 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054

Lakshminarayana, K.V. 1977. Factors involved in the host-specificity in Mallophaga sens. lat., (Phthiraptera: Insecta) infesting birds. *In*: Ananthakrishnan, T.N. (Ed.). **Insects and host-specificity:** Proceedings of the Symposium on Problems of Host-specificity in Insects. Madras, The Macmillan Company of India. p. 101–109.

Lanfear, R.; Frandsen, P.B.; Wright, A.M.; Senfeld, T.; Calcott, B. 2016. PartitionFinder2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular biology and evolution,** 34(3): 772–773. doi: 10.1093/molbev/msw260

Legendre, P.; Desdevises, Y.; Bazin, E. 2002. A statistical test for host-parasite coevolution. **Systematic Biology,** 51: 217–234.

Leigh, J.W.; Bryant, D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution,** 6(9): 1110–1116. doi: 10.1111/2041-210X.12410

Linardi, P.M. 2012. Phthiraptera. *In*: Rafael, J.A.; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B.; Casari, S.A.; Constantino, R. (Eds.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto, Ed. Holos. cap. 31, p. 439–451.

Lyal, C.H.C. 1986. Coevolutionary relationships of lice and their hosts: a test of Farenholz's Rule. *In*: Stone, A.R.; Hawksworth, D.L. (Eds.). **Coevolution and Systematics**. Oxford, Ed. Claredon Press, p. 77–91.

Malenke, J.R.; Johnson, K.P.; Clayton, D.H. 2009. Host specialization differentiates cryptic species of feather-feeding lice. **Evolution,** 63(6): 1427–1438. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00642.x.

Martínez-Aquino, A. 2016. Phylogenetic framework for coevolutionary studies: a compass for exploring jungles of tangled trees. **Current Zoology**, 62(4): 393–403. doi: 10.1093/cz/zow018

Mauersberger, G.; Mey, E. 1993. Mallophagen und Vogelsystem - Beitrag zur Diskussion der Parasitophyletik. **Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin**, 69(Suppl.): 3–30.

Merilä, J.; Wiggins, D. 1995. Interspecific competition for nest holes causes adult mortality in the Collared Flycatcher. **Condor,** 97(2): 445– 450.

Mey, E. 1994. Beziehungen zwischen Larvenmorphologie und Systematik der Adulti bei den Vogel-Ischnozeren (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera). **Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin,** 70(1): 3–84.

Mey, E. 2004. Zur taxonomie, verbreitung und parasitophyletischer evidenz des *Philopterus*-Komplexes (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera). **Ornithologischer Anzeiger,** 43: 149–203.

Meyer, M.J.; Price, R.D.; Johnson, K.P. 2008. A new species of *Picicola* Clay and Meinertzhagen, 1938 (Phthiraptera: Ischnocera) parasitic on the Rufous-sided Broadbill (Passeriformes: Eurylaimidae) in Ghana. **Zootaxa,** 1762: 63–68. doi: 10.5281/zenodo.181951

Miller, M.A.; Pfeiffer, W.; Schwartz T. 2010. **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees**. *In*: Proceedings Gateway Computing Enviroments Workshop (GCE). New Orleans. p. 1–8.

Nordberg, S. 1936. Biologisch-ökologische Untersuchungenüber die Vogelnidocolen. **Acta Zoologica Fennica,** 21: 1–168.

Oniki, Y.; Emerson, K.C. 1981. A new species of *Picicola* (Mallophaga: Philopteridae) from the crescent-chested puffbird *Malacoptila striata* (Spix) (Piciformes, Bucconidae). **Revista Brasileira de Biologia,** 41(3): 511–513.

Page, R.D.M. 2003. **Tangled trees: Phylogeny, Cospeciation and Coevolution**. Chicago, The University of Chicago Press, 350 p. doi: 10.1111/j.1439-0310.2004.00990.x

Page, R.D.M.; Clayton, D.H.; Paterson, A.M. 1996. Lice and cospeciation: a response to Barker. **International Journal for Parasitology,** 26(2): 213–218.

Page, R.D.M.; Lee, P.M.L.; Becher, S.A.; Griffiths, R.; Clayton, D.H. 1998. A different tempo of mitochondrial evolution in birds and their parasitic lice. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** 9(2): 276–293.

Palma, R.L. 1978. Slide-mounting of lice: a detailed description of the Canada balsam technique. **New Zealand Entomologist,** 6(4): 432–436.

Paradis, E.; Claude, J.; Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics,** 20. doi: 10.1093/ bioinformatics/btg412.

Paterson, A.M.; Palma, R.L.; Gray, R.D. 2003. Drowning on arrival, missing the boat and x-events: How likely are sorting events? *In*: Page, R.D.M. (Ed.). **Tangled Trees phylogeny, cospeciation and coevolution**. Chicago, The University of Chicago Press. p. 287–309.

Price, R.D.; Hellenthal, R.A.; Palma, R.L. 2003. World checklist of chewing lice with host associations and keys to families and genera. *In*: Price, R.D.; Hellental, R.A.; Palma, R.L.; Johnson, K.P.; Clayton, D.H. (Eds.). **The chewing lice: world checklist and biological overview**. Champaign, Illinois Natural History Survey. p. 1–448. (Special Publication)

Price, R.D.; Emerson, K.C. 1975. The *Menacanthus* (Mallophaga: Menoponidae) of the Piciformes (Aves). **Annals of the Entomological Society of America**, 68(5): 779–785.

Price, R.D.; Weckstein, J.D. 2006. *Picicola* Clay & Meinertzhagen (Phthiraptera: Philopteridae) from jacamars and puffbirds (Piciformes: Galbulidae, Bucconidae), with descriptions of five new species. **Zootaxa,** 1367: 37–50. doi: 10.5281/zenodo.174824

Prum, R.O.; Berv, J.S.; Dornburg, A.; Field, D.J.; Townsend, J.P.; Lemmon, E.M.; Lemmon, A.R. 2015. A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. **Nature,** 526: 569–573. doi:10.1038/nature15697

Puillandre, N.; Lambert, A.; Brouillet, S.; Achaz, G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology,** 21(6): 1864–1877. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05239

R Core Team. 2008. **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em: http://www.R-project.org.

Rambaut, A. 2007. **FigTree v1.4.0, a graphical viewer of phylogenetic trees**. Disponível em: http://bio.ed.ac.uk/software/figtree/.

Rambaut, A.; Drummond, A.J. 2009. **Tracer v.1.5**. Disponível em: https://github.com/evolvedmicrobe/beast-mcmc/tree/master/release_tracer/Windows /Tracer%20v1.5

Ronquist, F.; Teslenko, M.; Van Der Mark, P.; Ayres, D. L.; Darling, A.; Hohna, S. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology,** 61(3): 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys029

Rózsa, L. 1991. Flamingo lice contravene Fahrenholz. **International Journal for Parasitology,** 21(2): 151–152.

Sick, H. 2001. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro, Nova Fronteira. 912p.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post- analysis of large phylogenies. **Bioinformatics,** 30: 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033

Sugiura, N. 1978. Further analysis of the data by akaike' s information criterion and the finite corrections. **Communications in Statistics - Theory and Methods,** 7(1): 13–26. doi: 10.1080/03610927808827599

Sweet, A.D.; Allen, J.M.; Johnson, K.P. 2014. Novel Primers from informative nuclear loci for louse molecular phylogenetics (Insecta: Phthiraptera). **Journal of Medical Entomology,** 51(6): 1122–26. doi: 10.1603/ME13218.

Sweet, A.D.; Boyd, B.M.; Johnson, K.P. 2016. Cophylogenetic patterns are uncorrelated between two lineages of parasites on the same hosts. **Biological Journal of the Linnean Society,** 118: 813–828. doi: 10.1111/bij.12771

Sweet, A.D.; Boyd, B.M.; Allen, J.M.; Villa, S.M.; Valim, M.P.; Rivera-Parra, J.L.; Wilson, R.E.; Johnson, K.P. 2017. Integrating phylogenomic and population genomic patterns in avian lice provides a more complete picture of parasite evolution. **Evolution,** 72(1): 95–112. doi: 10.1111/evo.13386

Szidat, L. 1940. Beiträge zum Aubfau eines natürlichen Systems der Trematoden. I. Die Entwicklung von Echinocercaria choanophila U. Szidat zu *Cathaemasia hians* und die Ableitung der Fasciolidae von den Echinostomidae. **Zeitschrift für Parasitenkunde,** 11: 239–283.

Valim, M.P.; Linardi, M.P. 2006. Two new species of *Picicola* Clay & Meinertzhagen, 1938 (Phthiraptera: Philopteridae) from Piciformes (Bucconidae and Galbulidae) in Brazil. **Zootaxa,** 1172: 21–29. doi: 10.11646/zootaxa.1172.1.2

Valim, M.P.; Linardi, M.P. 2007. Description of the male of *Mayriphilopterus nystalicus* Mey, 2004 (Phthiraptera, Ischnocera, Philopteridae). **Zootaxa,** 1604: 47–51. doi: 10.11646/zootaxa.1604.1.4

Valim, M.P.; Weckstein, J.D. 2011. Two new species of *Brueelia* Kéler, 1936 (Ischnocera, Philopteridae) parasitic on Neotropical trogons (Aves, Trogoniformes). **Zookeys,** 128: 1–13. doi: 10.3897/zookeys.128.1583

Valim, M.P.; Weckstein, J.D. 2012. Two new species of *Cotingacola* Carriker, 1956 (Phthiraptera: Ischnocera: Philopteridae) from Amazonian Brazil, with comments on host-specificity. **Systematic Parasitology,** 81: 159–167. doi 10.1007/s11230-011-9334-7

Valim, M.P.; Cicchino, A.C. 2015. A remarkable new genus and a new species of chewing louse (Phthiraptera, Ischnocera, Philopteridae) from Brazil. **Zookeys,** 541: 57–70. doi: 10.3897/zookeys.541.6022

Weckstein, J.D. 2004a. **Systematics and cophylogenetics of toucans and their associated chewing lice**. 139 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Louisiana State University, Louisiana.

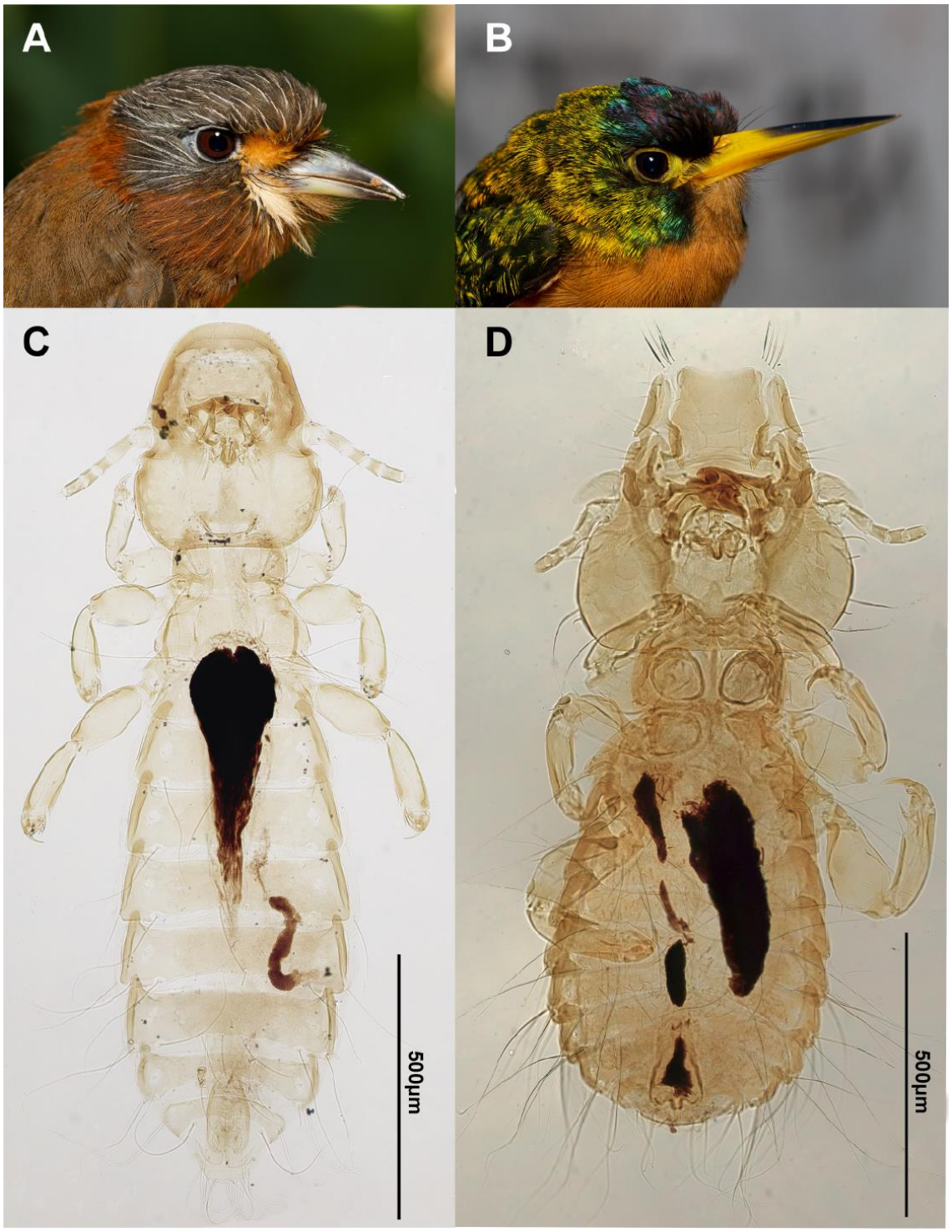
Weckstein, J.D. 2004b. Biogeography explains cophylogenetic patterns in toucan chewing lice. **Systematic Biology,** 53: 154–164. doi: 10.1080/10635150490265085

Willians, N.S. 1979. The *Picicola* (Mallophaga: Philopteridae) of the Passeriformes (Aves). **Journal of Kansas Entomological Society,** 52(4): 633–640.

Witt, C.C. 2004. **Rates of molecular evolution and their application to Neotropical avian biogeography**. 138 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Louisiana State University, Louisiana.

APÊNDICES

Apêndice A. Espécime de *Malacoptila rufa* (A); espécime de *Galbula ruficauda* (B); espécime macho de *Picicola striata* (C) e holótipo macho de *Mayriphilopterus ernsti* (D).



Apêndice B. Banco de dados dos hospedeiros Galbuliformes utilizados para as análises filogenética e co-filogenética.

Hospedeiros	Número de campo	Localidades	Cytb	ND2	ND3	AK1	Bfib7
[1]*Bucco capensis*	USNM#B04213	Guiana	x	x	x	-	x
[1]*Chelidoptera tenebrosa*	USNM#B07013	Brasil	x	x	x	x	x
[2]*Galbula albirostris*	LSUMZ#B20253	Brasil	x	x	x	x	x
Galbula cyanescens	LSUMZ#B10508	Peru	x	x	x	x	x
Galbula cyanicollis	LSUMZ#B4816	Peru	x	x	x	x	x
Galbula galbula	FMNH#389203	Brasil	x	x	x	x	x
Galbula ruficauda	LSUMZ#B37713	Bolívia	x	x	x	x	x
Galbula tombacea	ANSP#4779	Equador	x	x	x	-	x
[1]*Hapaloptila castanea*	LSUMZ#B12059	Equador	x	x	x	x	x
[2]*Jacamerops aurea*	ANSP#7543	Guiana	x	x	x	x	x
[1]*Malacoptila fusca*	LSUMZ#B20439	Brasil	x	x	x	x	x
Malacoptila panamensis	LSUMZ#B29998	Equador	x	x	x	x	x
Malacoptila rufa	USNM#B06987	Brasil	x	x	x	x	x
Malacoptila striata	LSUMZ#65147	Brasil	x	x	x	-	x
[1]*Micromonacha lanceolata*	LSUMZ#B11211	Peru	x	x	x	x	x
[1]*Monasa flavirostris*	LSUMZ#B27879	Peru	x	x	x	x	x
Monasa morphoeus	USNM#B06986	Brasil	x	x	x	x	x
Monasa nigrifrons	USNM#B07074	Brasil	x	x	x	x	x
[1]*Nonnula rubecula*	LSUMZ#B4253	Peru	x	x	x	x	x
Nonnula ruficapilla	LSUMZ#B103532	Peru	x	x	x	x	-
[1]*Notharchus hyperrhynchus*	LSUMZ#B10680	Peru	x	x	x	x	x
Notharcus macrorhynchos	USNM#B13147	Guiana	x	x	x	-	-
Notharcus swainsoni	LSUMZ #65145	Brasil	x	x	x	-	-
[1]*Nothriscus tectus*	LSUMZ#B26514	Panamá	x	x	x	x	x
[1]*Nystactes tamatia*	LSUMZ#B15320	Bolívia	x	x	x	x	x
[1]*Nystalus chacuru*	FMNH#391062	Bolívia	x	x	x	x	x
Nystalus maculatus	LSUMZ#B18721	Bolívia	x	x	x	x	x
Nystalus striolatus	LSUMZ#B10628	Peru	x	x	x	x	x
*Nystalus torridus**	MZUSP#92426	Brasil	x	-	-	-	-

[1] Representantes da família Bucconidae; [2] Representantes da família Galbulidae; *Amostra do Genbank (Número de acesso KC874911.1)

Apêndice C. Banco de dados de malófagos parasitos de Galbuliformes utilizados para extração de DNA e análises filogenética e co-filogenética.

Malófagos	Número de campo	Hospedeiros	Localidades	COI-r (379pb)			EF-1α (347pb)			BR-50 (390pb)			BR-62 (133pb)			BR69 (215pb)		
				Ext	Amp	Seq	Ext	Amp	Seq	Ext	Amp	Seq	Ext	Amp	Seq	Ext	Amp	Seq
Mayriphilopterus ernsti * +	BJO430	*Monasa flavirostris*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus ernsti * +	BJO431	*Monasa flavirostris*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus ernsti +	JAP453	*Monasa morphoeus*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Mayriphilopterus ernsti +	LSUMZ194567	*Monasa morphoeus*	Brasil	x	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
[1]*Mayriphilopterus ernsti* +	GUR311	*Monasa morphoeus*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus ernsti * +	AZS304	*Monasa nigrifrons*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus galbulicus * +	JAP616	*Galbula albirostris*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus galbulicus +	JWA39	*Galbula cyanescens*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus galbulicus * +	TM2A136	*Galbula cyanicollis*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus galbulicus * +	MZUSP86321	*Galbula cyanicollis*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
[1]*Mayriphilopterus galbulicus* +	CN142	*Jacamerops aureus*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Mayriphilopterus galbulicus +	DFL1268	*Jacamerops aureus*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus nystalicus	DFL1154	*Nystalus chacuru*	Bolívia	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	-	-	x	-	-
[1]*Mayriphilopterus nystalicus* * +	DFL1347	*Nystalus striolatus*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
[1]*Mayriphilopterus spinosus* +	JAP565	*Bucco capensis*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus spinosus +	AUT707	*Bucco capensis*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus spinosus +	KE160	*Bucco capensis*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	x	x
Mayriphilopterus spinosus * +	CBA199	*Chelidoptera tenebrosa*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus spinosus * +	JAP180	*Nystactes tamatia*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus spinosus * +	PPBIO178	*Nystactes tamatia*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus spinosus * +	MZUSP98851	*Nystalus torridus*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
[1]*Mayriphilopterus* sp.nov.1	MZUSP89933	*Notharchus macrorhynchos*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus sp.nov.1	JPO8121	*Notharchus macrorhynchos*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus sp.nov.1	WMMIII194	*Notharchus hyperrhynchus*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus sp.nov.1 °	939	*Notharchus swainsoni*	Brasil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[1]*Mayriphilopterus* sp.nov.2	LMA151	*Malacoptila fusca*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus sp.nov.2	VGR171	*Malacoptila panamensis*	Panamá	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
[1]*Mayriphilopterus* sp.nov.3	MZUSP86105	*Nonnula rubecula*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus sp.nov.3	JA103	*Nonnula ruficapilla*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	x	x	x	x	x
Mayriphilopterus sp.nov.4	DFL1534	*Nothriscus tectus*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
[1]*Mayriphilopterus* sp.nov.4	DFL1593	*Nothriscus tectus*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
[1]*Mayriphilopterus* sp.nov.5	MZUSP86796	*Chelidoptera tenebrosa*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Picicola faucetti	JDW281	*Chelidoptera tenebrosa*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
[1]*Picicola faucetti*	KB065	*Chelidoptera tenebrosa*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola faucetti +	LMA167	*Chelidoptera tenebrosa*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
[1]*Picicola naokii*	TV173	*Bucco capensis*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola naokii +	KE160	*Bucco capensis*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	-	-
Picicola naokii * +	JAP180	*Nystactes tamatia*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	-
Picicola naokii * +	JAP551	*Nystactes tamatia*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	-	-
Picicola naokii * +	JAP605	*Nystactes tamatia*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola naokii * +	JAP600	*Nystactes tamatia*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola oneilli +	MZUSP98844	*Notharchus macrorhynchos*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
[1]*Picicola oneilli*	JPO8121	*Notharchus macrorhynchos*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
[1]*Picicola osheai*	BJO1000	*Malacoptila fusca*	Suriname	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola osheai * +	TM3A149	*Malacoptila rufa*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
[1]*Picicola serrafreirei*	DFL1154	*Nystalus chacuru*	Bolívia	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola serrafreirei	DGC506	*Nystalus maculatus*	Bolívia	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	-	-
Picicola striata * +	JAP782	*Galbula albirostris*	Brasil	x	x	x	x	x	-	x	x	x	x	-	-	x	x	-
Picicola striata	CBA037	*Galbula cyanescens*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	-
Picicola striata +	DFS01156	*Galbula cyanescens*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	-
Picicola striata	CCW871	*Galbula cyanicollis*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata +	GUR119	*Galbula cyanicollis*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata	AA501	*Galbula cyanicollis*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata * +	AMZ418	*Galbula galbula*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	-
Picicola striata +	EP513	*Galbula ruficauda*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata +	G66780	*Galbula ruficauda*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola striata	JLK358	*Galbula tombacea*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	-	-	x	-	-
Picicola striata	DFL1815	*Hapaloptila castanea*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata	AWK2416	*Hapaloptila castanea*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola striata +	EP401	*Malacoptila striata*	Brasil	x	-	-	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
[1]*Picicola striata* +	EP456	*Malacoptila striata*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata * +	P10369	*Micromonacha lanceolata*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola striata * +	LSUMZ194567	*Monasa morphoeus*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata * +	GUR162	*Monasa morphoeus*	Brasil	x	x	-	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata +	MZUSP86499	*Monasa nigrifrons*	Brasil	x	-	-	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata +	JAP542	*Monasa nigrifrons*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola striata +	JAP302	*Monasa nigrifrons*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	x	x
Picicola striata +	MZUSP97007	*Monasa nigrifrons*	Brasil	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x
Picicola striata	CCW822	*Monasa nigrifrons*	Bolívia	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	-	-
[1]*Picicola valquii*	TV308	*Nothriscus tectus*	Peru	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	-	-	x	x	x

[1] Amostras escolhidas como representantes de suas respectivas espécie; * Novos registros de hospedeiro; + Novos registros de localidade; ° Espécime utilizado apenas na análise do JANE