Tiago da Silva Ribeiro

Filogeografia de *Chiroxiphia caudata* (Pipridae, AVES)
e de *Hemitriccus diops* (Rynchocyclidae, AVES):
estrutura populacional e história demográfica de
passeriformes da Mata Atlântica

Phylogeography of *Chiroxiphia caudata* (Pipridae,
AVES) and *Hemitriccus diops* (Rynchocyclidae,
AVES): population structure and demographic history
of Atlantic Forest passerine birds

São Paulo

2013

Tiago da Silva Ribeiro

Filogeografia de *Chiroxiphia caudata* (Pipridae, AVES)
e de *Hemitriccus diops* (Rynchocyclidae, AVES):
estrutura populacional e história demográfica de
passeriformes da Mata Atlântica

Phylogeography of *Chiroxiphia caudata* (Pipridae,
AVES) and *Hemitriccus diops* (Rynchocyclidae,
AVES): population structure and demographic history
of Atlantic Forest passerine birds

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Biologia, na Área de Genética.

Orientador(a): Cristina Yumi Miyaki

Ribeiro, Tiago da Silva

Filogeografia de *Chiroxiphia caudata* (Pipridae, AVES) e de *Hemitriccus diops* (Rynchocyclidae, AVES): estrutura populacional e história demográfica de passeriformes da Mata Atlântica

Número de páginas: 96

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

1. Filogeografia 2. Mata Atlântica 3. Pleistoceno 4. Modelagem Ecológica de Nicho I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Cristina Yumi Miyaki

Orientador(a)

Ao meu pai e à minha mãe, ao meu
irmão e à minha irmã.
Por me ensinarem a andar.

“... [Vanzolini sobre biogeografia] não se pode negar que o caráter de vanguarda interdisciplinar, tão evidente na angústia por informação colateral nova, está entre os maiores encantos desta nossa empresa.”

Paulo Emílio Vanzolini, 1986.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Cristina Yumi Miyaki**, por me receber e ajudar desde a graduação. Pelo comprometimento, atenção, finais de semana cedidos e confiança. E principalmente por me permitir um grande aprendizado e por ser um grande exemplo.

Ao **Henrique Batalha Filho**, por me ajudar em todos os aspectos deste trabalho, pelas incontáveis aulas, conhecimento e visão da filogeografia.

Ao **Marcos Maldonado Coelho**, pela sugestão de trabalho com *Hemitriccus diops* e tantas contribuições, pelas indagações que me fizeram perder algumas noites em busca de respostas, pela energia e empolgação com a ciência.

À **Adriana Ribeiro Oliveira-Marques**, por toda ajuda com biologia molecular, pela paciência em me introduzir ao funcionamento do laboratório e por me mostrar as araras.

À **Ana Cristina Fazza**, pelas discussões, pragmatismo e constante apoio do primeiro passarinho na rede até o último ponto deste texto. Não posso deixar de agradecer, também, às suas intromissões sempre honestas e todo o companheirismo.

Ao **Ricardo Fernandes Campos Júnior**, sempre disposto a discutir genética de populações, estatísticas e R, mesmo quando as minhas questões eram postas em horários inoportunos.

Ao **Fábio Sarubbi Raposo do Amaral**, por sempre me ouvir e apontar bons caminhos.

Ao **Fernando Mendonça d'Horta**, pelo auxílio com o início do trabalho com *Chiroxiphia caudata* e filogeografia.

Aos demais membros do LGEMA, **Ana Beatriz, Ana Carolina, André, Bruno, Carolina, Cibele, Claydson, Danilo, Fernanda, Flávia, Gregory, Gustavo, Henrique, Maria, Priscila e Rafaella**, pela amizade, risadas e descontrações que tornaram o laboratório um lugar muito confortável. Pelas discussões, opiniões, novidades e ideias, que tornaram a vida no laboratório um aprendizado constante.

Aos colaboradores do LGEMA, pelas amostras depositadas. À **Maria da Conceição Andrade**, pelo auxílio técnico no laboratório. À **Tatiana C. Silva Corrêa** pelo auxílio com o sequenciamento. À **Lucilene Silva** e à **Deisy Santos de Moraes**, pelo auxílio com a burocracia da universidade.

Ao **Luciano Lima** pelo auxílio em campo, e pelo aprendizado sobre a ornitologia.

À **Tereza Cristina Giannini** e ao **André Luis Acosta**, por toda ajuda com as modelagens ecológicas de nicho e discussões.

Aos professores, alunos e funcionários do Instituto de Biociências da USP, por me ajudarem a aprender biologia.

A todos os amigos que conheci antes de se tornarem biólogos (e aos que estão quase lá), pela Gnatobase, pelas intermináveis discussões acaloradas, caronas, decisões erradas, viagens, risadas, cervejas, masmorras e dragões. Por estarem por perto todos esses anos. À **Mica** e ao **SV**, também, pelas diversas críticas a este texto, exame de qualificação ou apresentação em congresso.

A todos os amigos que não são biólogos, por suas visões de mundo e por me ajudarem a não me perder.

À minha família, por sempre estarem na casa dos meus pais aos finais de semana, quando eu retornava para casa.

Aos meus sobrinhos, **Vitória** e **Max**, pelo carinho e maneira simples com que me fazem lembrar as coisas realmente importantes e querer estar por perto. Por tornarem as minhas decisões mais difíceis.

Ao meu irmão e à minha irmã, **Washington** e **Andrea**, por todo o apoio e tudo que me ensinam, por seus erros e acertos, por toda a inspiração.

Ao meu pai e à minha mãe, **Alfredo** e **Silvina**, por todo o apoio e tudo que me ensinam, pelo caminho trilhado e toda a inspiração, por mais do que sou capaz de expressar, mas principalmente por confiarem nas minhas decisões.

A todas as coleções e curadores que cederam amostras para está dissertação: **Carla Fontana** (PUC-RS), **Fabício Santos** (LBEM UFMG), **Luis Fabio Silveira** (MZ USP), **Marcelo Ferreira de Vasconcelos** (MCNA PUC-Minas), **Marcos Raposo** (MNRJ) e **Rômulo Ribon** (MZ UFV).

À equipe da Fazenda Duas Barras, no município de Santa Maria do Salto, MG, e à equipe da Estação Biológica de Boracéia, no município de Salesópolis, SP. Por nos receberem e oferecerem auxílio ao trabalho de campo.

Ao ICMBio e ao IBAMA, por licenças e permissões concedidos.

À FAPESP e ao CNPq, pelas bolsas de mestrado a mim concedidas. À FAPESP, CNPq, CAPES e BioComp pelo auxílio financeiro para a execução e divulgação deste trabalho, desenvolvido no âmbito do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Computação da Universidade de São Paulo (BioComp), com apoio da Pró-Reitoria de Pesquisa da USP.

A todos aqueles que contribuíram para a este projeto e que porventura eu tenha omitido neste texto.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
Biogeografia	3
Filogeografia	4
DNA Mitocondrial e Estocasticidade	5
Descrição Geográfica da Diversidade Genética e Padrões Filogeográficos	7
Demografia Histórica	7
Filogeografia Comparada	10
Filogeografia da Mata Atlântica	11
Objetivos	14
CAPÍTULO 1: FILOGEOGRAFIA DE <i>CHIROXIPHIA CAUDATA</i>	15
Abstract	17
Resumo	17
Introdução	18
Materiais e Métodos	20
Resultados	34
Discussão	39
CAPÍTULO 2 – FILOGEOGRAFIA DE <i>HEMITRICCUS DIOPS</i>	45
Abstract	47
Resumo	47
Introdução	48
Materiais e Métodos	50
Resultados	57
Discussão	67
DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
RESUMO	75
ABSTRACT	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

Biogeografia

A documentação dos padrões espaciais de biodiversidade e a sua compreensão são as áreas de interesse da biogeografia, ciência que estuda a distribuição passada e presente dos seres vivos. Além de possuir sua própria base teórica e experimental a biogeografia se apresenta como uma ciência de síntese e utiliza informações de diversas outras ciências, como a ecologia, a genética, a sistemática, a paleontologia, entre outras. Dessa forma, a sua história é marcada por evoluções em tais áreas e em desenvolvimentos tecnológicos. Por exemplo, a consolidação da teoria de tectônica de placas na geologia, que fortaleceu as teorias que propunham eventos vicariantes para explicar padrões disjuntos de distribuição de taxa relacionados entre continentes atualmente distantes (Lomolino *et al.* 2010).

A distribuição dos seres vivos no globo intrigou grandes naturalistas do século XVIII, como Buffon, que notou que áreas ecologicamente similares, mas isoladas, eram compostas por espécies de animais diferentes. Posteriormente, Johann R. Forster notou que essa observação também se aplicava às plantas, e ao longo de suas viagens também notou a tendência de diminuição da diversidade de plantas do Equador para os polos (Lomolino *et al.* 2010). Tal gradiente latitudinal de diversidade ainda é alvo de pesquisa de muitos biogeógrafos (e.g. d'Horta *et al.* 2011, Smith *et al.* 2012). Desde então, a distribuição não aleatória dos seres vivos tem sido bem documentada. A partir da descrição de padrões gerais distintas áreas biogeográficas foram definidas, assim como distintos gradientes ecológicos de distribuição de diversidade.

Diversos fatores podem contribuir para o entendimento dos processos que culminam nesses padrões de distribuição espacial de biodiversidade. Mas apesar do caráter sintético da biogeografia, existe uma subdivisão da área de modo que os padrões de distribuição costumam ser estudados sob um de dois enfoques: histórico ou ecológico. Tal subdivisão foi notada primeiramente por Agustin P. de Candolle, no início do século XIX, que definiu a primeira como baseada em causas que existiram por longos períodos de tempo no passado e a segunda baseada em causas agindo por curtos períodos de tempo até o presente (Crisci *et al.* 2003).

As diferenças entre a biogeografia histórica e a biogeografia ecológica podem ser vistas como diferenças em escalas temporais, espaciais e taxonômicas. A primeira lidaria com uma escala de períodos longos e antigos, com níveis taxonômicos normalmente acima do nível de espécie e com grandes áreas geográficas. A segunda com escalas pequenas e recentes, no nível taxonômico de espécie e numa escala local. Os limites entre as duas

subdisciplinas não são claros, e o estudo dos efeitos dos ciclos glaciais no Pleistoceno podem ser colocados entre as duas áreas (Myers & Giller 1988).

A filogeografia pode ser vista como uma importante subárea da biogeografia que normalmente lida com eventos na escala de tempo do Pleistoceno. E, respaldando a ideia de que os estudos biogeográficos do Pleistoceno se encontram entre a biogeografia histórica e ecológica, John Avise (2000) introduz a filogeografia em seu livro como uma ciência que permite a ampliação, numa escala temporal, de questões ecogeográficas, como o papel de pressões ecológicas temporárias sobre a distribuição da biodiversidade (biogeografia ecológica). Enquanto Mark Lomolino e colaboradores (2010) introduzem a filogeografia como uma força dominante na biogeografia histórica de períodos recentes.

Filogeografia

A filogeografia é uma ciência que objetiva entender os princípios e processos que governam a distribuição espacial de linhagens, intraespecíficas ou de espécies proximalmente relacionadas (Avise 1998). Sendo as linhagens a unidade de trabalho da filogeografia, a sua determinação é fundamental.

Linhagens podem ser definidas como uma sequência de ancestrais-descendentes (Ridley 2006). As linhagens de indivíduos de populações naturais são muito difíceis de serem determinadas diretamente. Entretanto, as mesmas podem ser inferidas a partir da relação entre marcadores que são transmitidos dos ancestrais para os descendentes, como o DNA. Cópias de determinada sequência não-recombinante de DNA que podem ser diferenciadas entre si, chamadas de haplótipos, podem ser utilizadas com esse fim. Os haplótipos podem ser organizados em árvores ou redes para melhor visualização de suas relações.

Em um nível de estudo intraespecífico as relações entre haplótipos normalmente são marcadas por: menor diversidade do que em níveis taxonômicos mais elevados, existência de haplótipos ancestrais (sequência de bases inalterada desde populações ancestrais) e derivados (sequência de bases alterada por mutações) em um mesmo ponto no tempo e ocorrência de múltiplos haplótipos derivados oriundos de um mesmo haplótipo ainda existente (Posada & Crandall 2001a). Tais eventos normalmente podem ser melhor visualizados em redes de haplótipos, e embora não haja impedimentos à utilização de árvores (Mardulyn 2012), os pontos levantados ferem pressupostos das metodologias de reconstrução filogenética comumente utilizadas.

Podemos inferir linhagens potenciais com base na relação entre haplótipos de populações naturais, assumindo que indivíduos de um grupo de haplótipos relacionados formam um grupo de ancestrais-descendentes distinto de outros indivíduos. Entretanto,

marcadores moleculares independentes podem revelar relações ancestrais-descendentes devido a processos estocásticos, dificultando o paralelo entre a linhagem de haplótipos e a linhagem de indivíduos.

DNA Mitocondrial e Estocasticidade

Os estudos filogeográficos utilizam ferramentas da sistemática e da genética de populações para detectar e tentar compreender a distribuição de linhagens. No trabalho que dá origem à área John Avise (1987) diz que consideraria sua revisão bem sucedida se a mesma possibilitasse futuras discussões entre essas duas áreas da ciência que vinham se desenvolvendo de maneira independente, e propõe assim que a filogeografia seja uma disciplina integradora entre processos micro (genética de populações) e macroevolutivos (sistemática).

Com esse fim John Avise (1987) destaca características do DNA mitocondrial (mtDNA) que o elegeriam como importante marcador molecular nesse processo. E não por acaso esta se manteve como a principal molécula utilizada nos estudos filogeográficos com animais ao longo do tempo, e mesmo em face do advento dos estudos filogeográficos com múltiplos marcadores nucleares ainda é bastante utilizada.

O mtDNA é uma molécula circular de dupla-hélice de DNA que, por seu mecanismo de herança materna e estrutura simples se tornou o marcador molecular mais utilizado na filogeografia. A galinha (*Gallus gallus domesticus*) foi a primeira espécie de ave a ter seu mtDNA completamente sequenciado (Desjardins & Morais 1990). O genoma mitocondrial da galinha apresenta 16.775 pares de base e o mesmo conjunto de genes de outros vertebrados (13 proteínas, 2 RNA ribossômicos e 22 RNA transportadores). Entretanto, a ordem dos genes é diferente da encontrada em outros vertebrados, foi notada também a ausência de uma região similar à origem de replicação da cadeia leve do genoma mitocondrial. Essa organização dos genes é conservada entre os Galliformes, e arranjos diferentes foram encontrados em outros grupos de aves, incluindo os Passeriformes suboscines (Mindell *et al.* 1998). Tais alterações podem ter sido causadas por transposição de um elemento do mtDNA, e juntamente com estruturas encontradas no mtDNA de invertebrados e de lagartos compõem indícios de que elementos transponíveis podem ter sido ativos na história do mtDNA animal.

Acredita-se que tal atividade de elementos móveis não ocorra mais no presente no mtDNA animal e, como um todo, as diferenças do mtDNA das aves não alteram as propriedades gerais que tornaram o mtDNA animal a molécula mais utilizada na filogeografia, são elas: i) uma estrutura simples se comparado com o DNA nuclear (nuDNA),

sem a presença de elementos transponíveis ativos, íntrons ou grandes espaçamentos entre os genes, ii) herança materna, facilitando a determinação de linhagens e iii) não alterado por eventos de recombinação, facilitando o uso do marcador em análises filogenéticas. Entretanto, todos os genes mitocondriais resultam em uma única história, impedindo que se obtenham réplicas independentes de um processo de natureza estocástica como a história dos indivíduos de uma espécie.

O mtDNA possui tamanho populacional efetivo menor do que o de um gene nuclear de cópia única devido à sua ploidia; enquanto existem duas cópias de cada gene no genoma nuclear (nuDNA), existe apenas uma no mtDNA. E em decorrência do sistema de herança, apenas as cópias encontradas nas fêmeas são transmitidas de uma geração para a outra. Dessa forma, seu tamanho efetivo é quatro vezes menor do que o de marcadores nucleares em espécies com razão sexual 1:1, ou seja, para cada molécula de mtDNA passada de uma geração para outra existem quatro moléculas de nuDNA sendo transmitidas (mtDNA revisado em Moore 1995, Ballard & Whitlock 2004). Assim, com um tamanho efetivo menor, eventos de deriva genética são quatro vezes mais intensos sobre o mtDNA, o que, quando visto sob um contexto coalescente (ver abaixo), significa que os eventos coalescentes ocorrem mais frequentemente, de maneira que o sorteamento de linhagens ocorre mais rapidamente no mtDNA (Moore 1995).

Em conjunto com uma taxa de mutação mais elevada do que a taxa de mutação média do nuDNA (Ellegren 2007, Weir & Schluter 2008), o menor tamanho efetivo contribui para que o mtDNA tenha se tornado um importante marcador para detecção de divergências em uma escala de tempo recente (Zink & Barrowclough 2008).

Como citado anteriormente, eventos estocásticos na história de cada marcador podem resultar em genealogias distintas para cada um deles por mais que os mesmos tenham evoluído sob uma mesma história demográfica. Além disso, um problema específico do mtDNA reside no fato de que ele representa apenas a história das fêmeas, e diferenças na capacidade de dispersão entre machos e fêmeas, por exemplo, podem resultar em histórias diferentes entre machos e fêmeas.

Tendo em mente a diferença entre a história do gene e a história da espécie é preciso ter cautela ao interpretar dados de um único marcador e suas estimativas demográficas. O uso de marcadores independentes é ideal para diminuir o erro associado às estimativas de parâmetros demográficos que podem ser obtidas com marcadores moleculares, como o tempo de divergência, o fluxo gênico e o tamanho efetivo (Edwards & Beerli 2000, Nichols 2001). Como visto acima, o mtDNA não oferece a possibilidade de amostragem de marcadores

independentes, de maneira que estudos multilocos dependem do uso de marcadores nucleares não ligados entre si.

Descrição Geográfica da Diversidade Genética e Padrões Filogeográficos

Estudos filogeográficos se iniciam com a análise da distribuição geográfica de linhagens. A sobreposição de árvores e redes a um mapa auxilia a visualização da relação entre as linhagens e a sua distribuição. Este método tem sido empregado desde o nascimento da filogeografia, de maneira que diferentes possibilidades de relações entre linhagens e sua distribuição espacial foram apresentadas (Avice 1987).

Avice (1987) propõe cinco categorias filogeográficas distintas para organizar a diversidade genética e sua distribuição geográfica: a diversidade genética pode estar organizada de forma descontínua com linhagens bastante diferenciadas, e essas linhagens podem estar geograficamente separadas (categoria 1) ou não (categoria 2). Ou a diversidade genética pode se apresentar como uma variação contínua, com diferentes alelos ocorrendo em regiões distintas (categoria 3), todos nas mesmas regiões (categoria 4) ou em situações intermediárias (categoria 5). Entretanto, a distinção entre variação contínua e descontínua, como proposta, pode ser complicada ao se considerar cenários com divergências recentes.

A estrutura genética pode ser inferida com a construção de árvores ou redes com marcadores mitocondriais e/ou nucleares. É esperado que em casos de divergências antigas a estrutura seja recuperada com ambos os marcadores, em casos de divergências muito recentes com nenhum deles e casos de divergências intermediárias predominantemente pelo marcador mitocondrial, por causa das propriedades discutidas acima. Zink & Barrowclough (2008) revisaram estudos filogeográficos de aves e corroboraram tais expectativas, com apenas um estudo envolvendo um cenário com estrutura no nuDNA e ausência no mtDNA, detectada com base em diferenças médias na frequência de haplótipos entre as populações e não em árvores ou redes (Pruett & Winker 2005). Zink & Barrowclough (2008) sugerem então que o DNA mitocondrial é um bom marcador para se iniciar e embasar estudos sobre padrões filogeográficos, embora seu uso isolado não seja recomendado para a compreensão dos processos envolvidos e a inferência de parâmetros demográficos.

Demografia Histórica

Alguns dos processos envolvidos nas distribuições geográficas da diversidade genética podem ser compreendidos com base em análises de genética de populações, utilizadas para inferir a demografia histórica das populações. É provável que ao longo da história

demográfica de uma espécie eventos como subdivisões populacionais, variação no tamanho populacional efetivo e variação na área ocupada tenham ocorrido (Hewitt 1996, 2000).

Variações no tamanho podem alterar a intensidade das, e a relação entre, forças microevolutivas atuando sobre a população, como a seleção natural e a deriva genética. Populações que passaram por gargalos demográficos normalmente perdem diversidade genética por deriva genética. Populações em expansão, pelo contrário, estão sob menor pressão da deriva genética, espera-se maior estabilidade das frequências genotípicas e maior ocorrência de alelos raros (Excoffier *et al.* 2009). Dessa forma, alterações demográficas alteram também a maneira como os polimorfismos estão distribuídos em uma população, permitindo que a partir de uma análise dos últimos consiga se estimar os primeiros (Emerson *et al.* 2001).

Diversos testes foram desenvolvidos para se estudar alterações demográficas, utilizando como arcabouço a teoria da coalescência para compreender a maneira como diferentes genealogias se estruturavam (Emerson *et al.* 2001). Tais testes são realizados com base na informação de diversidade atual da população estudada, podendo se basear na frequência de sítios segregantes e sua distribuição, na distribuição de haplótipos na população ou nas diferenças par a par entre as sequências (acurácia e poder dos testes revisados em Ramos-Onsins & Rozas 2002). Outros testes consideram explicitamente a genealogia dos marcadores envolvidos, permitindo que estimativas de tamanho populacional possam variar ao longo do tempo (Ho & Shapiro 2011).

Além de variações puramente demográficas, alterações espaciais na área de distribuição das espécies também influenciam a diversidade genética. É provável que muitas espécies tenham sofrido alterações nas suas áreas de distribuição ao longo do Pleistoceno, em decorrência de alterações climáticas caracterizadas por períodos glaciais longos intercalados por períodos interglaciais menores, como o que estamos vivenciando. Dessa forma, acredita-se que a distribuição de muitas espécies florestais tenha sido reduzida durante os períodos de glaciação e tenha chegado à sua atual conformação se expandindo desde o final do período glacial. Tais expansões podem ser representadas por uma sequência de eventos de colonização de áreas vizinhas. A cada colonização por apenas uma parcela dos indivíduos da população original fundaria a nova subpopulação, o que é chamado de efeito do fundador, aumentando o efeito da deriva e reduzindo a diversidade genética local. Diversas evidências empíricas corroboram tais consequências genéticas dos ciclos glaciais ao redor do globo, com particularidades relacionadas aos grupos e regiões estudadas (Hewitt 1996, 1999, 2000 e 2004).

Ao simular um cenário de expansão em etapas (*stepping stones*), como o descrito acima, ao longo de um eixo unidimensional foi encontrada redução da diversidade genética em pontos afastados do ponto de origem e elevada estrutura (elevado valor de F_{ST}) entre as áreas no início da expansão, o que não se sustenta com o aporte de novos migrantes em gerações subsequentes (Austerlitz *et al.* 1997). Tal abordagem de simulação é realizada com base na teoria da coalescência, baseado na premissa de que mutações neutras não afetam o sucesso reprodutivo de seus portadores, e assim também não afetam a genealogia da população. Dessa forma, é possível estudar as consequências de alterações populacionais nos polimorfismos genéticos com base nas consequências de tais alterações sobre as genealogias. Essa metodologia de estudo consiste na simulação de uma genealogia e posterior inclusão de mutações sobre a mesma (Nordborg 2007).

A teoria da coalescência (Kingman 1982) estende a genética de população com uma abordagem para se olhar do presente para o passado, estudando a maneira como diferentes moléculas de DNA em um determinado momento do tempo estão genealogicamente relacionadas entre si através de eventos coalescentes. Um evento coalescente é o momento no tempo em que, olhando para trás, duas linhagens em uma genealogia se encontram.

Em uma população evoluindo seguindo o modelo de Wright e Fisher (com gerações discretas, panmixia e tamanho constante) cada indivíduo produz em média um descendente, com uma variância se aproximando de 1 conforme o tamanho populacional se aproxima de infinito. Utilizando este modelo populacional a probabilidade de que ocorra um evento coalescente na geração anterior é igual $1/N$, sendo N o número de moléculas na população (revisado em Nordborg 2007). A cada evento coalescente, o número de moléculas diminui em um, até que todas as moléculas coalesçam no último ancestral comum mais recente (MRCA – *Most Recent Common Ancestor*, em inglês).

Com base nesse princípio é possível simular uma genealogia do presente para o passado, o que é computacionalmente muito mais eficiente do que simular uma genealogia do passado para o presente e depois retirar os ramos que não chegam até o presente. Conforme variações no modelo populacional são incorporadas às estimativas de coalescência é possível estudar como variações nos parâmetros de um modelo populacional afetam a genealogia. Por exemplo, a variação do parâmetro *tamanho populacional* resulta em um maior tempo para que os eventos coalescentes ocorram, o que é uma consequência intuitiva da probabilidade de coalescência na geração anterior ser igual a $1/N$. Menos intuitiva é a consequência da variação na variância de produção de descendentes de cada indivíduo, que possui uma relação positiva com o tempo de coalescência. Se a variância for alta, poucos indivíduos produzirão muitos

descendentes, e dessa forma os eventos coalescentes acontecerão mais rapidamente, e a genealogia se comportaria como a se a população possuísse um tamanho menor, e seu tamanho populacional efetivo (N_e) passa a ser igual ao tamanho original dividido pela variância e a probabilidade de coalescência na geração anterior igual a $1/N_e$.

Utilizando esta ferramenta é possível verificar como as genealogias se comportam em diferentes cenários demográficos, e quais as consequências de tais alterações nos polimorfismos genéticos. Como o comportamento das genealogias em cada cenário é estocástico é interessante que os dados empíricos possam ser contrastados com uma distribuição nula de genealogias geradas sob um determinado modelo. A chamada filogeografia estatística (revisado em Knowles 2009) nasce dessa possibilidade de se testar os dados contra uma distribuição nula de genealogias criadas sob um determinado conjunto de parâmetros populacionais. É importante ressaltar que: i) virtualmente, infinitos cenários podem ser simulados, entretanto os mesmos precisam fazer sentido frente ao conhecimento sobre a espécie e o seu habitat e ii) as distribuições nulas de diferentes cenários podem se sobrepor, e mudanças sutis entre os cenários podem não ser passíveis de distinção ou requerer um grande volume de dados empíricos assim como um grande número de genealogias simuladas. Divergências antigas e cenários de expansão populacional produzem árvores com pouca variação estocástica, diferente do que ocorre em cenários de declínio populacional, migração e divergências recentes (Wakeley 2003).

Filogeografia Comparada

A dinâmica de um bioma ao longo do tempo afeta a diversidade das espécies que o compõe, sendo assim passível de ser inferida a partir do produto dessa história. A comparação de estudos filogeográficos permite que se estude os processos evolutivos de uma região com base em processos demográficos de suas espécies (Bermingham & Moritz 1998). Da mesma forma que a comparação de padrões de distribuição é utilizada em biogeografia, os padrões filogeográficos podem ser utilizados para se testar e propor hipóteses sobre a evolução da região estudada. Espera-se congruência de padrões filogeográficos de espécies simpátricas caso os mesmos sejam produzidos pelos mesmos eventos, como retração ou expansão do bioma em que estão inseridos. Entretanto, diferentes espécies podem responder a um mesmo evento de maneira distinta, seja por efeito do acaso ou por particularidades ecológicas.

A história do bioma, entretanto, pode ser inferida também com a utilização de fontes de dados independentes, como registros históricos de pólen, dados geológicos, dados climáticos e modelagens de distribuição projetadas para diferentes períodos do tempo.

Modelos de distribuição, ou modelos ecológicos de nicho, são modelos que, considerando informações sobre o nicho da espécie em pontos de ocorrência registrados, se propõem a inferir o nicho realizado da espécie, e com base nesse modelo de nicho inferem potenciais áreas de ocorrência para a espécie. Informações comumente utilizadas, dada a sua disponibilidade, são as variáveis bioclimáticas relacionadas à temperatura e à umidade dos períodos entre os anos 1950 e 2000 (Hijmans *et al.* 2005) entretanto, outras variáveis podem ser utilizadas, como por exemplo variáveis que considerem interações bióticas (e.g. Giannini *et al.* 2012).

Diferentes algoritmos podem ser utilizados para criar um modelo de nicho, e normalmente necessitam de informações sobre locais de ocorrência e de ausência da espécie. O desenvolvimento de um algoritmo baseado na teoria de máxima entropia possibilitou que modelos fossem criados com relativo sucesso sem a utilização de dados de ausência, que são raros em regiões pouco estudadas, como a Neotropical (Phillips *et al.* 2006).

A partir da criação de um modelo de nicho a sua projeção geográfica pode ser feita no presente, no passado ou no futuro, em sua própria área de ocorrência ou em outra região. Dessa forma, a filogeografia tem se beneficiado de projeções para o passado como forma independente de dados genéticos para inferir alterações na distribuição da espécie estudada.

Esse conjunto de evidências, somado às inferências filogeográficas, pode contribuir para um melhor entendimento da história do bioma, e assim, a um melhor entendimento dos processos que moldaram a distribuição da diversidade genética.

Filogeografia da Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um conjunto de formações florestais com grande extensão territorial ocupando a porção oriental da América do Sul, distribuída no Brasil do nordeste ao sul do país, no leste do Paraguai e no nordeste da Argentina (Câmara 2003). Devido à sua grande extensão e ao relevo das regiões que ocupa, com elevações a mais de 1.700 metros acima do nível do mar, é um bioma sob condições ambientais bastante heterogêneas, composto por áreas com diferentes fitofisionomias (Oliveira-Filho & Fontes 2000). Apresenta também grande biodiversidade e altas taxas de endemismo, estima-se que sejam endêmicas cerca de 40% das espécies de plantas (800 espécies), 16% das aves (148), 27% dos mamíferos (71), 31% dos répteis (94) e 60% dos anfíbios (286) (Mittermeier *et al.* 2005). Essa biodiversidade, entretanto, está ameaçada. Mais de 500 espécies endêmicas de diferentes táxons encontram-se ameaçadas de extinção (Conservation International do Brasil *et al.* 2000). Devido ao alto endemismo e ao grave estado de deterioração da Mata Atlântica, ela é

considerada importante para a biodiversidade e uma das áreas prioritárias para conservação no planeta (Myers *et al.* 2000). Entretanto, pouco se sabe sobre os processos que geraram e mantêm a biodiversidade nesse bioma e a compreensão da história evolutiva dos organismos e dos biomas é essencial para que se conserve de forma eficiente não apenas a biodiversidade, mas também os mecanismos e processos envolvidos (Moritz & Faith 1998).

Diversos estudos avaliaram a distribuição da diversidade genética de espécies endêmicas da Mata Atlântica, assumindo que a história da biota reflete parte da história do bioma. Descontinuidades genéticas ao longo da distribuição de tais espécies, ou grupos de espécies proximamente relacionadas, foram encontradas na maioria dos casos. A localização geográfica de tais descontinuidades chamamos de quebras filogeográficas. A partir da localização espaço-temporal das quebras filogeográficas e de inferências sobre a demografia histórica desses grupos diferentes hipóteses foram utilizadas para explicar a diversificação recente da Mata Atlântica.

As quebras filogeográficas encontradas nas espécies de lagarto do complexo *Gymnodactylus darwinii* coincidem com diversos rios ao longo da Mata Atlântica, sugerindo que os mesmos sejam barreira primária ou secundária ao fluxo gênico (Pellegrino *et al.* 2005). As divergências encontradas entre os grupos foram datadas como tendo ocorrido, em sua maioria, no Mioceno ou no Plioceno, período marcado por intensa atividade orogênica. Desta forma, quebras filogeográficas anteriores ao Pleistoceno tendem a ter sua origem atribuída à atividade orogênica do período em questão (e.g. Grazziotin *et al.* 2006, Amaro *et al.* 2012, Amaral *et al.* 2013).

Apesar das quebras filogeográficas encontradas na espécie de passeriforme *Xyphorhynchus fuscus* (atualmente *X. fuscus* e *X. atlanticus*) também coincidirem com o curso de alguns rios, a data de suas divergências são mais recentes e coincidem com o Pleistoceno (Cabanne *et al.* 2007, 2008). O período foi marcado por oscilações climáticas intercalando períodos glaciais e interglaciais e diversos dados paleo-ambientais sugerem que a Mata Atlântica teve sua área de distribuição reduzida durante o período glacial, dando espaço a formações vegetais rupestres (Behling & Negrelle 2001, Behling 2002, Ledru *et al.* 2005). Dessa forma, quebras filogeográficas que ocorreram no Pleistoceno tendem a ter sua origem atribuída ao efeito de tal redução da floresta, em específico à fragmentação da mesma em refúgios florestais isolados entre si durante o período glacial (e.g. Cabanne *et al.* 2007, 2008, Carnaval *et al.* 2009, Maldonado-Coelho 2012). Em adição à datação das quebras, sinais de alteração demográfica também suportam a hipótese de fragmentação e redução do habitat dos táxons estudados, afetando também o tamanho populacional de grupos que divergiram em período anterior ao Pleistoceno (e.g. Grazziotin *et al.* 2006).

Tratando a Mata Atlântica como uma unidade, modelos de distribuição da floresta atualmente, há 6 mil anos e há 21 mil anos atrás (no último máximo glacial, UMG) foram criados com base em variáveis bioclimáticas. A partir da sobreposição desses modelos áreas de estabilidade, refúgios, e de instabilidade da floresta foram propostas. Os dois principais refúgios propostos são o refúgio Bahia, entre o Rio Doce e o Rio São Francisco e o refúgio Pernambuco, ao norte do Rio São Francisco (Carnaval & Moritz 2008). Não foi encontrado sinal de persistência de floresta no sul da Mata Atlântica com tais modelos de distribuição. Entretanto, diversos trabalhos encontram sinal de estrutura genética nessa região (e.g. Cabanne *et al.* 2008, Carnaval *et al.* 2009, Thomé *et al.* 2010) e modelos de distribuição de algumas espécies endêmicas apontam existência de refúgio nessa região (Porto *et al.* 2012), suportando um cenário de persistência da floresta também na região sul da Mata Atlântica.

Diversos estudos filogeográficos corroboram a existência de um cenário de instabilidade do sul e estabilidade do norte da Mata Atlântica ao longo do Pleistoceno. Os estudos com os passeriformes *X. fuscus* (Cabanne *et al.* 2008) e *Sclerurus scansor* (d'Horta *et al.* 2011), entretanto, limitam a região estável do norte ao que seria o refúgio Bahia e dividem a Mata Atlântica latitudinalmente em três unidades, duas instáveis (sul e norte) e uma estável (centro). Interessantemente, as duas regiões instáveis apresentam respostas opostas às oscilações climáticas, de maneira que enquanto há sinal de retração da floresta no período glacial no sul, há sinal de expansão no norte.

Em contraponto ao cenário de retração florestal no sul da Mata Atlântica ao longo do período glacial o modelo paleoclimático da perereca *Proceratophrys boiei* (Amaro *et al.* 2012) apresenta sinal de uma população maior no UMG do que no presente, e um dos modelos paleoclimáticos de *Rhinella crucifer* não apresenta grande diferença na área da população (Thomé *et al.* 2010). Ambas as espécies apresentam tolerância ao clima frio, a primeira podendo ocupar regiões elevadas em montanhas atingindo mais de 1.200 metros acima do nível do mar e a segunda com distribuição em altas latitudes.

As incongruências temporais das quebras corroboram a ideia de diversificação constante ao longo do Terciário e Quaternário na região Neotropical (Rull 2008). E em conjunto com as incongruências espaciais apontam para a complexidade de respostas dos táxons da Mata Atlântica às alterações na floresta. De maneira que a estrutura florestal que se configura em refúgio para uma espécie pode não ser um refúgio para outra, refletindo em uma história complexa a heterogeneidade do bioma e sua biota, com diferentes distribuições geográficas e requerimentos ecológicos atualmente.

Dessa forma, o presente estudo se propõe a estudar a filogeografia de duas espécies de aves passeriformes endêmicas da Mata Atlântica: *Chiroxiphia caudata* e *Hemitriccus diops*.

Objetivos

Os objetivos do trabalho, e de cada capítulo, são: i) descrever a distribuição geográfica da diversidade genética de ambas as espécies, ii) inferir os possíveis processos responsáveis por tal distribuição e iii) contribuir para a discussão sobre a história biogeográfica da Mata Atlântica.

Abstract

Pleistocene glacial cycles changed the distribution of tropical forests through time, and consequently, its biota's distribution too. However, phylogeographic studies in the Atlantic Forest reveal a complex pattern, with old and recent divergences in different regions of the biome. In order to sum up more information to help reconstruct the biome's history, we studied the phylogeography of *Chiroxiphia caudata*. Samples of 112 individuals were collected throughout the species' distribution, and partial sequences of the mitochondrial gene ND2 and the intron of the nuclear gene G3PDH were obtained. We found signal of population expansion with the mitochondrial gene, and absence of phylogeographic structure with both markers. Demographic scenarios with population expansion and divergence were simulated, and we could not reject them. Therefore, it is possible that the absence of phylogeographic structure could be related to the large generation time of *C. caudata*. Two different distribution models during the last glacial maximum were obtained and they produced different results between them and were also incongruent with the genetic data. The results are congruent with published studies, and suggested that glacial cycles influenced the history of the Atlantic Forest biota, but the level of this influence is not clear.

Resumo

Os ciclos glaciais ao longo do Pleistoceno alteraram a distribuição das florestas tropicais ao longo do tempo, e, conseqüentemente, a distribuição de sua biota. Entretanto, estudos filogeográficos na Mata Atlântica revelam padrões complexos, com divergências antigas e recentes em diferentes regiões do bioma. Com o intuito de agregar mais informação ao panorama da história do bioma, o presente trabalho se propôs a realizar um estudo filogeográfico de *Chiroxiphia caudata*. Foram utilizados 112 indivíduos amostrados ao longo da distribuição da espécie e obtidas seqüências parciais do gene mitocondrial ND2 e de um íntron do gene nuclear G3PDH. Foi encontrado sinal de expansão populacional recente com o marcador mitocondrial, e ausência de estrutura filogeográfica com ambos os marcadores. Foram simulados cenários demográficos com expansão populacional e cenários com divergência recente, e nenhum deles foi rejeitado. Assim, é possível que a ausência de estrutura filogeográfica possa ser fruto do longo tempo de geração da espécie. Foram criados dois modelos de distribuição da espécie no último máximo glacial, que apresentaram resultados discordantes entre em si e com os dados genéticos. Os resultados foram congruentes com dados da literatura e corroboraram a influência dos períodos glaciais na biota da Mata Atlântica, embora não seja clara a extensão de tal influência.

Introdução

As florestas tropicais eram vistas como regiões estáveis ao longo do tempo, o que teria permitido o surgimento da sua grande biodiversidade (e.g. Fischer 1960). Essa concepção cedeu espaço a uma visão das florestas tropicais como ecossistemas dinâmicos quando, na transição dos anos 1960 para os 1970, dados geológicos e de distribuição das espécies possibilitaram a proposição da teoria dos refúgios associados aos ciclos glaciais na Amazônia (Haffer 1969, Vanzolini & Williams 1970, história revisada por Vanzolini 1992). Diversos mecanismos foram levantados para explicar a diversificação na região neotropical, sendo provável que grande parte da diversidade atual seja fruto de processos geotectônicos do Terciário e dos ciclos glaciais do Quaternário (Rull 2008).

A Mata Atlântica é uma floresta tropical situada na porção oriental da América do Sul com elevado índice de endemismo e deteriorado estado de conservação (Myers *et al.* 2000). Estima-se que atinja hoje no máximo 16% de seu tamanho original (Ribeiro *et al.* 2009). A hipótese de que o bioma possui uma história dinâmica ao longo dos períodos glaciais do Pleistoceno encontra suporte em estudos palinológicos (e.g. Behling 2002), paleoclimáticos (e.g. Carnaval & Moritz 2008) e filogeográficos (e.g. Cabanne *et al.* 2008). No entanto, alguns trabalhos filogeográficos também sugerem diversificação anterior ao Pleistoceno (e.g. Amaral *et al.* 2013), apresentando suporte à ideia de que, assim como visto para toda a região neotropical, os processos envolvidos na origem da diversidade atual na Mata Atlântica também estão distribuídos ao longo do Terciário e do Quaternário.

Além da distinção temporal encontrada entre os estudos filogeográficos da Mata Atlântica, a localização das quebras filogeográficas também apresenta um padrão complexo. Tal complexidade sugere que diferentes espécies responderam de maneiras diferentes aos processos históricos, e um maior número de trabalhos pode auxiliar na compreensão da diversificação no bioma.

Visando contribuir para um melhor entendimento da história do bioma e de sua biodiversidade, o presente trabalho se propõe a estudar a filogeografia de *Chiroxiphia caudata*, popularmente conhecida como tangará (Figura 1). A ave pertencente à família Pipridae ocorre do sul de Goiás e da Bahia até o oeste do Paraná e sul do Rio Grande do Sul, no sudeste do Paraguai e no extremo nordeste da Argentina (Snow 2004; Figura 1). Um estudo de sistemática do gênero *Chiroxiphia* indica que *C. caudata* é uma espécie monofilética e que tenha divergido de seu grupo irmão, composto pelas espécies *C. napensis*, *C. regina*, *C. pareola*, *C. lanceolata* e *C. linearis*, há cerca de 4 milhões de anos atrás (nomenclatura das espécies do gênero segundo o proposto pelo estudo de sistemática das mesmas, Agne 2012). *C. caudata* e seu grupo irmão formam um grupo dentro do gênero

Chiroxiphia com espécies de regiões florestais úmidas. *C. caudata* e *C. pareola* são as únicas espécies que ocorrem na Mata Atlântica, sendo que a última também ocorre na Amazônia, com a divergência entre as populações de *C. pareola* da Mata Atlântica e da Amazônia datadas há cerca de 200 mil anos atrás. O grupo irmão das espécies florestais é composto pelas demais espécies do gênero, *C. boliviana*, *C. galeata* e *C. bokermanni*, que ocorrem em regiões secas, no sul dos Andes, no Cerrado e na Chapada do Araripe (Ceará), respectivamente.

Figura 1. Mapa da América do Sul. Em detalhe: área de distribuição de *Chiroxiphia caudata* em cinza (segundo <http://www.natureserve.org/getData/birdMaps.jsp>) e localidades amostradas (números de acordo com Tabela 1). Ilustração do macho de *C. caudata* (adaptada de del Hoyo *et al.* 2004).

C. caudata é uma ave estritamente florestal, de forma que mudanças na distribuição da vegetação podem ter afetado a distribuição da espécie. Seus indivíduos podem atravessar matrizes de até 80 metros (Boscolo 2007), com alguns registros de indivíduos que cruzaram

até 130 metros (Uezu *et al.* 2005). Apesar de ser pouco sensível à fragmentação (Parker III *et al.* 1996), um baixo isolamento por distância (avaliado por microssatélites) foi encontrado entre populações de *C. caudata* em um contínuo florestal ao longo da Serra do Mar, no estado de São Paulo, indicando que a capacidade de dispersão da espécie não é suficiente para resultar em fluxo gênico capaz de compensar a ação da deriva em cada população, o que pode levar a uma perda da diversidade local, e aumento da divergência entre as localidades, em um cenário de maior fragmentação (Francisco *et al.* 2007). Tal isolamento pode ser fruto da estrutura social da espécie, na qual existe uma alta variância no sucesso reprodutivo dos machos. Os machos estão organizados em grupos de 4 a 6 indivíduos que compartilham um território, *lek*, que contém alguns sítios específicos para a realização da corte reprodutiva que consiste em uma dança cooperativa que pode resultar na cópula da fêmea com o macho alfa do grupo. Em geral, os machos frequentam o mesmo *lek* por vários anos e a hierarquia entre eles é mantida (Foster 1981).

Materiais e Métodos

Foram analisadas amostras de 112 indivíduos de *Chiroxiphia caudata* de 33 localidades (Figura 1, Tabela 1) representando a distribuição geográfica da espécie. Dentre essas amostras, 19 foram coletadas durante o desenvolvimento do presente projeto, utilizando redes de neblina ou carabinas de pressão com munição de chumbo único ou cartuchos personalizados (Amaral *et al.* 2012). As expedições de coleta foram autorizadas sob a licença permanente para coleta de material zoológico no. 14673-1 sob responsabilidade de C.Y. Miyaki. Os indivíduos sacrificados foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), e seus tecidos estão depositados na coleção do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves da USP (LGEMA-USP; credenciado como Fiel Depositário junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, Proc. No. 20000.000019/2003-32; Diário Oficial da União No. 119 de 24/06/2003, pg. 196). As demais amostras pertencentes ao acervo LGEMA USP utilizadas neste trabalho foram coletadas por integrantes ou colaboradores do laboratório. Amostras de tecido do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (LBEM UFMG), do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) e da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) foram cedidas via pedido de empréstimo. Por fim, foram também utilizadas sequências de DNA de um indivíduo de Boracéia, São Paulo, depositadas no GenBank (AY136620.1, Marini & Hackett 2002).

Tabela 1. Amostras de *Chiroxiphia caudata* analisadas. “Código” se refere às localidades indicadas na Figura 1. As cores indicam os agrupamentos das localidades segundo suas latitudes. “Coleção” se refere à coleção de origem da amostra, com as siglas se referindo às seguintes coleções: Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves da Universidade de São Paulo (LGEMA USP), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (LBEM UFMG), Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ) e Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). As colunas correspondentes aos genes (ND2 e G3PDH) indicam quais foram sequenciados com sucesso para cada amostra, sendo que em vermelho estão sequências que não puderam ser utilizadas devido à baixa precisão na determinação da fase gamética.

Código	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra	Coleção	ND2	G3PDH
1	Camacan	BA	-15.38	-39.65	13739	LGEMA USP	X	X
1	Camacan	BA	-15.38	-39.65	13768	LGEMA USP	X	
1	Camacan	BA	-15.38	-39.65	91023	MZUSP	X	X
1	Camacan	BA	-15.38	-39.65	91024	MZUSP	X	X
1	Camacan	BA	-15.38	-39.65	91026	MZUSP	X	X
1	Camacan	BA	-15.38	-39.65	91027	MZUSP		X
2	Jequitinhonha	MG	-15.77	-41	B1114	UMFG	X	
2	Jequitinhonha	MG	-15.77	-41	B1119	UMFG	X	X
2	Jequitinhonha	MG	-15.77	-41	B1677	UMFG	X	
3	Santa Maria do Salto	MG	-16.41	-40.05	CM116	LGEMA USP		X
3	Santa Maria do Salto	MG	-16.41	-40.05	CM119	LGEMA USP		X
3	Santa Maria do Salto	MG	-16.41	-40.05	CM124	LGEMA USP		X
4	Belo Horizonte	MG	-18.26	-43.11	B11	LBEM UFMG	X	
4	Belo Horizonte	MG	-18.26	-43.11	B14	LBEM UFMG	X	X
5	Santa Teresa	MG	-19.88	-40.64	B1710	LBEM UFMG	X	
5	Santa Teresa	MG	-19.88	-40.64	B1712	LBEM UFMG		X
5	Santa Teresa	MG	-19.88	-40.64	MNT023	MNRJ	X	X
5	Santa Teresa	MG	-19.88	-40.64	MNT109	MNRJ	X	X
5	Santa Teresa	MG	-19.88	-40.64	MNT149	MNRJ	X	X
6	Caraça	MG	-19.9	-43.67	CPA364	MNRJ	X	
6	Caraça	MG	-19.9	-43.67	CPA379	MNRJ	X	X
6	Caraça	MG	-19.9	-43.67	CPA380	MNRJ	X	X
7	Simonésia	MG	-20	-42.02	B361	LBEM UFMG	X	
7	Simonésia	MG	-20	-42.02	B362	LBEM UFMG	X	
7	Simonésia	MG	-20	-42.02	B428	LBEM UFMG	X	X
7	Simonésia	MG	-20	-42.02	B445	LBEM UFMG	X	X
8	Itabirito	MG	-20	-44	MNT1507	MNRJ		X
8	Itabirito	MG	-20	-44	MNT1516	MNRJ		X
8	Itabirito	MG	-20	-44	MNT1560	MNRJ	X	

Continuação da Tabela 1.

Código	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra	Coleção	ND2	G3PDH
9	Nova Lima	MG	-20.08	-43.93	B1010	LBEM UFMG	X	
10	Domingos Martins	ES	-20.36	-40.66	MNT2588	MNRJ	X	X
10	Domingos Martins	ES	-20.36	-40.66	MNT2589	MNRJ	X	
10	Domingos Martins	ES	-20.36	-40.66	MNT2590	MNRJ	X	X
10	Domingos Martins	ES	-20.36	-40.66	MNT2622	MNRJ	X	X
10	Domingos Martins	ES	-20.36	-40.66	MNT2640	MNRJ	X	
11	Araponga	MG	-20.59	-42.44	B1099	LBEM UFMG	X	
11	Araponga	MG	-20.59	-42.44	B1168	LBEM UFMG	X	X
11	Araponga	MG	-20.59	-42.44	B608	LBEM UFMG	X	X
12	Viçosa	MG	-20.74	-42.92	B12	LBEM UFMG	X	X
12	Viçosa	MG	-20.74	-42.92	B1707	LBEM UFMG	X	
12	Viçosa	MG	-20.74	-42.92	B1708	LBEM UFMG	X	X
12	Viçosa	MG	-20.74	-42.92	B1713	LBEM UFMG	X	
12	Viçosa	MG	-20.74	-42.92	B1809	LBEM UFMG		X
13	Itatiaia	RJ	-22.34	-44.66	P1359	LGEMA USP	X	X
13	Itatiaia	RJ	-22.34	-44.66	P1362	LGEMA USP	X	X
13	Itatiaia	RJ	-22.34	-44.66	P1365	LGEMA USP	X	
13	Itatiaia	RJ	-22.34	-44.66	P1366	LGEMA USP	X	
14	Morro do Diabo	SP	-22.55	-52.28	P1450	LGEMA USP	X	X
14	Morro do Diabo	SP	-22.55	-52.28	P2159	LGEMA USP	X	X
15	Gonçalves	MG	-22.66	-45.85	P1238	LGEMA USP	X	X
16	Bananal	SP	-22.68	-44.32	P1230	LGEMA USP	X	X
16	Bananal	SP	-22.68	-44.32	P1231	LGEMA USP	X	
16	Bananal	SP	-22.68	-44.32	P1232	LGEMA USP	X	
16	Bananal	SP	-22.68	-44.32	P1233	LGEMA USP	X	X
16	Bananal	SP	-22.68	-44.32	P1234	LGEMA USP	X	
17	Barreiro Rico	SP	-22.79	-48.18	P1648	LGEMA USP	X	
17	Barreiro Rico	SP	-22.79	-48.18	P1662	LGEMA USP	X	X
17	Barreiro Rico	SP	-22.79	-48.18	P1687	LGEMA USP	X	
17	Barreiro Rico	SP	-22.79	-48.18	P1695	LGEMA USP	X	X
18	Santa Virgínia	SP	-23.3	-45.06	P1237	LGEMA USP	X	X
19	Boracéia	SP	-23.65	-45.89	15552	LGEMA USP	X	X
19	Boracéia	SP	-23.65	-45.89	15586	LGEMA USP	X	X
19	Boracéia	SP	-23.65	-45.89	15595	LGEMA USP	X	X
19	Boracéia	SP	-23.65	-45.89	15596	LGEMA USP		X
19	Boracéia	SP	-23.65	-45.89	15600	LGEMA USP		X
19	Boracéia	SP	-23.65	-45.89	15671	LGEMA USP		X

Continuação da Tabela 1.

Código	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra	Coleção	ND2	G3PDH
19	Boracéia	SP	-23.65	-45.89	AY136620		X	
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P787	LGEMA USP	X	
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P796	LGEMA USP	X	X
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P799	LGEMA USP	X	X
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P809	LGEMA USP	X	X
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P816	LGEMA USP	X	X
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P820	LGEMA USP	X	
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P826	LGEMA USP	X	X
20	Caucaia do Alto	SP	-23.66	-47.03	P928	LGEMA USP	X	X
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P2618	LGEMA USP	X	X
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P393	LGEMA USP	X	X
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P552	LGEMA USP	X	X
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P610	LGEMA USP	X	X
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P617	LGEMA USP	X	
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P638	LGEMA USP	X	
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P643	LGEMA USP		X
21	Morro Grande	SP	-23.7	-45.95	P656	LGEMA USP	X	X
22	Piedade	SP	-23.72	-47.4	P2060	LGEMA USP	X	
22	Piedade	SP	-23.72	-47.4	P680	LGEMA USP	X	
22	Piedade	SP	-23.72	-47.4	P682	LGEMA USP	X	X
22	Piedade	SP	-23.72	-47.4	P684	LGEMA USP	X	X
23	Buri	SP	-23.72	-48.57	P832	LGEMA USP	X	X
23	Buri	SP	-23.72	-48.57	P845	LGEMA USP	X	X
24	Wencenslau Braz	PR	-23.85	-49.8	P947	LGEMA USP	X	X
24	Wencenslau Braz	PR	-23.85	-49.8	P955	LGEMA USP	X	X
25	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P2031	LGEMA USP	X	
25	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P720	LGEMA USP	X	X
25	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P721	LGEMA USP	X	X
25	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P728	LGEMA USP	X	X
25	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P729	LGEMA USP	X	X
26	Rio Juquiá	SP	-24.05	-47.61	12254	LGEMA USP	X	X
27	Ortigueira	PR	-24.2	-51	11441	LGEMA USP	X	X
28	PETAR	SP	-24.52	-48.83	P1202	LGEMA USP	X	X
28	PETAR	SP	-24.52	-48.83	P1212	LGEMA USP	X	
29	Guaraqueçaba	PR	-25.2	-48.23	14660	LGEMA USP	X	X
29	Guaraqueçaba	PR	-25.2	-48.23	14671	LGEMA USP	X	X
29	Guaraqueçaba	PR	-25.2	-48.23	14677	LGEMA USP	X	X
29	Guaraqueçaba	PR	-25.2	-48.23	14685	LGEMA USP	X	X
29	Guaraqueçaba	PR	-25.2	-48.23	14694	LGEMA USP		X
30	Nova Trento	SC	-27.32	-48.96	14595	LGEMA USP	X	X

Continuação da Tabela 1.

Código	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra	Coleção	ND2	G3PDH
30	Nova Trento	SC	-27.32	-48.96	14596	LGEMA USP	X	X
30	Nova Trento	SC	-27.32	-48.96	14597	LGEMA USP	X	X
30	Nova Trento	SC	-27.32	-48.96	14614	LGEMA USP	X	
30	Nova Trento	SC	-27.32	-48.96	14620	LGEMA USP	X	X
30	Nova Trento	SC	-27.32	-48.96	14624	LGEMA USP	X	X
30	Nova Trento	SC	-27.32	-48.96	14630	LGEMA USP	X	X
31	Morro Grande	SC	-28.7	-49.77	14541	LGEMA USP	X	X
32	Santa Maria	RS	-29.68	-53.81	MCP905	PUC-RS	X	X
33	Porto Alegre	RS	-30.03	-51.22	MCP1482	PUC-RS	X	
						Total	102	82(63+19)

Trabalho LaboratorialExtração do DNA

O DNA total foi extraído, para cada amostra, em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Para a lise celular e digestão das proteínas foram utilizados: 300 µl de TNE (50 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de EDTA, pH 7,5), 30 µl de Tris 1 M pH 7,5, 10 µl de SDS 20%, 20 µl de proteinase K (25 mg/ml). Por fim foi acrescentado cerca de 2 mm² do tecido. A mistura resultante foi incubada por 24 horas a 55 °C. Em seguida, foi adicionado um volume da mistura de Fenol, Clorofórmio e Álcool Isoamílico (em mistura de 25:24:1, respectivamente) para a remoção das proteínas e dos restos celulares. O material foi então misturado e centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, a fase superior, que contém o DNA, foi retirada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Foram adicionados dois volumes de Etanol 100% para a precipitação do DNA e foi feita uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 300 µl de Etanol 70% e foi feita uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. O material foi centrifugado a vácuo por 30 minutos para que o álcool restante evaporasse. Foi acrescentado 100 µl de TE (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0) para ressuspender o DNA, e este foi estocado na geladeira (protocolo modificado de Bruford *et al.* 1992).

A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose (concentração 1%), momento no qual também foi realizada quantificação do DNA por meio de comparação com amostras de concentração conhecida (DNA lambda com as seguintes concentrações: 250 ng/µl, 125 ng/µl e 62,5 ng/µl). O DNA foi visualizado no gel com o corante não tóxico GelRed (Biotium) exposto à luz ultravioleta. Sendo confirmada a presença

e a boa qualidade do material, foram preparadas diluições de cerca de 20 ng/μl para posterior uso nas ampliações.

Marcadores Moleculares

Foram utilizados dois marcadores moleculares: o gene mitocondrial que codifica a subunidade 2 da NADH desidrogenase (chamado aqui de ND2) e o íntron 11 do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (chamado aqui de G3PDH).

Amplificação do DNA e purificação do produto amplificado

A amplificação dos segmentos-alvo foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (sigla em inglês, PCR). Os segmentos foram amplificados em uma mistura de 2,5 μl de tampão 10x (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM), 1 μl de dNTP (2 mM de cada), 1 μl do iniciador *forward* a 10 μM, 1 μl do iniciador *reverse* a 10 μM, 18,4 μl de H₂O Milli-Q, 0,1 μl de *Taq* polimerase (5 U/μl, GE Health Care) e 1 μl de DNA. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento de cada fragmento foram: Lmet (Ribas *et al.* 2005) e H6313 (Sorenson *et al.* 1999) para o ND2, e G3PDH-L e G3PDH-R (Friesen *et al.* 1997) para o G3PDH. A PCR foi realizada em termociclador (TC9600 e TC9700, Applied Biosystems) com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; seguida de 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, *annealing* em temperatura variável por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos; e extensão final a 72°C por 9 minutos. Para a PCR do ND2 a temperatura inicial de *annealing* foi de 60 °C, sendo reduzida em 1 °C por ciclo até atingir 50 °C, temperatura que foi mantida até o final da reação. Para a PCR do G3PDH a temperatura de *annealing* utilizada foi de 56 °C.

Cerca de 3 μl do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar se a amplificação havia ocorrido, possuía apenas uma banda e de tamanho esperado, sendo a comparação realizada com um marcador de peso molecular (1 kb ladder, GE Health Care). Os produtos amplificados com sucesso foram purificados por precipitação com polietileno glicol 20% seguindo o protocolo de Paithankar e Prasad (1991) ou utilizando, para cada microlitro de produto amplificado, 0,25 μl de *Exonuclease I* (Fermentas, 20 U/μl) e *FastAP Alkaline Phosphatase* (Fermentas, 1 U/μl) misturadas na proporção 1:4, que permaneceram 30 minutos a 37 °C e 15 minutos a 80 °C antes de serem utilizados.

Sequenciamento do DNA

O produto purificado foi utilizado em reações de sequenciamento com o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) utilizando: 2 a 6 µl de água Milli-Q, 1,5 µl de tampão para Big Dye 5X, 1 µl do iniciador a 10 µM, 0,5 a 1,0 µl de solução Big Dye e de 1 a 4 µl de DNA purificado (dependendo do tamanho do produto), com a mistura final sempre contendo volume total igual a 10 µl. A mistura foi colocada em um termociclador (TC9700 Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 60 °C por 4 minutos, e uma extensão final de 60 °C por 7 minutos.

Após a reação, o produto foi precipitado com o seguinte protocolo: adição de 80 µl de Isopropanol 75% ao produto, mistura e manutenção em temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugação por 40 minutos a 4.000 rpm. Descarte do sobrenadante e adição de 200 µl de Etanol 70%. Centrifugação por 20 minutos a 4.000 rpm, descarte do sobrenadante. Secagem a 37 °C por 20 minutos. A reação foi analisada em sequenciador automático (ABI 3100 ou ABI 3130, Applied Biosystems).

Análise dos dados

Análise e alinhamento das sequências

Os cromatogramas obtidos na análise da reação em sequenciador automático foram analisados visualmente um a um utilizando o programa CodonCode Aligner 3.6.1 (CodonCode Corporation), que também foi utilizado para alinhar as sequências das duas fitas e obter a sequência consenso de cada amostra. As sequências consenso foram exportadas em formato *fasta* para serem alinhadas utilizando o método CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994), como implementado no programa MEGA 5. As sequências do ND2 foram traduzidas no programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) para verificar a existência de códons de parada inesperados e a composição de bases nucleotídicas, a fim de verificar se as sequências seguiam o esperado para o mtDNA. No caso do G3PDH, para determinar a fase gamética dos indivíduos heterozigotos foi utilizado o PHASE (Stephens *et al.* 2001), implementado no programa DnaSPv5 (Librado & Rozas 2009). Os indivíduos cuja determinação da fase gamética tiveram probabilidade inferior ao valor arbitrário de 80% foram removidos das análises subsequentes. Para verificar se as sequências apresentavam sinal de recombinação foi utilizado o teste PHI implementado no programa SplitsTree (Huson & Bryant 2006), que apresenta bom desempenho em diferenciar eventos de recombinação de homoplasias, mesmo em situação de expansão populacional (Bruen *et al.* 2006).

Análises de estrutura populacional

Para verificar se a espécie apresenta quebras filogeográficas foi construída, com base em amostras com a localização geográfica conhecida, uma rede de haplótipos para cada marcador. A rede de haplótipos foi inferida segundo metodologia de *Median-Joining* (Bandelt *et al.* 1999) no programa NETWORK 4.5.1.0 (<http://fluxus-engineering.com>).

Para testar se a espécie apresente estrutura populacional foi realizado o Teste de Mantel e a Análise de Variância Molecular (AMOVA). O teste de Mantel foi realizado no *Isolation By Distance Web Service* (IBDWS) versão 3.23 (Jensen *et al.* 2005) para verificar se existe isolamento por distância entre as localidades, medindo a correlação entre a distância genética e geográfica entre as localidades. A AMOVA foi realizada no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), para compreender como a diversidade genética está distribuída entre e intra-localidades. Como não foi encontrado sinal de estrutura na rede de haplótipos, a AMOVA foi realizada assumindo as localidades como subpopulações e somente um único grupo. Em ambas as análises apenas as localidades com três ou mais sequências foram utilizadas (22 das 33 localidades para o ND2 e 16 para o G3PDH) e a distância genética entre elas foi calculada com base no Φ_{ST} , considerando tanto a frequência dos haplótipos quanto a informação contida nas sequências (Excoffier *et al.* 1992). Para a utilização do teste do Mantel a distância geográfica foi estimada no programa DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2001).

Diversidade Genética e Demografia Histórica

Para acessar a diversidade genética foram utilizadas as seguintes medidas: número de sítios segregantes (S), diversidade haplotípica (H_d), número de haplótipos (h) e diversidade nucleotídica (π). Para testar se há sinal de alteração demográfica, foram utilizados os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima 1983) e F_s de Fu (Fu 1997) e o teste R_2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Esses dados foram obtidos para cada marcador no programa DnaSPv5.

Os valores de diversidade nucleotídica para cada marcador, em relação à latitude de coleta foram plotados em um gráfico para analisar como essa medida está distribuída latitudinalmente, visando testar se regiões com menor diversidade genética podem ser resultantes de eventos de gargalos ao longo de uma onda de expansão (Austerlitz *et al.* 1997).

Também com o objetivo de obter estimativas de alteração no tamanho populacional foi utilizado o programa FLUCTUATE, implementado no programa LAMARC 2.1.8 (Kuhner 2006), com corridas distintas para cada marcador. O programa permite estimar uma taxa de crescimento (ou redução) populacional com base em uma abordagem coalescente. Foi utilizado o modelo evolutivo de Felsenstein 84 (e.g. Felsenstein & Churchill 1996) para os

dois marcadores e taxa de transição/transversão igual a 4,3 para o mtDNA e 1,59 para o G3PDH, conforme estimativas obtidas no programa MEGA. Foram realizadas duas corridas com valores diferentes de *random seed* para cada marcador, cada corrida com 10 cadeias iniciais com 20.000 iterações cada e 10% de *burn-in*, e duas cadeias finais com 1.000.000 de iterações e 10% de *burn-in*. As corridas foram avaliadas tanto pelo valor do Tamanho Amostral Efetivo (*Effective Sample Size*, ESS) do logaritmo da verossimilhança quanto por comparações qualitativas dos resultados das duas corridas. O resultado final apresentado é uma média dos valores obtidos em cada corrida.

De acordo com o pressuposto de que o tamanho populacional variou ao longo dos ciclos glaciais do Pleistoceno é possível que a população tenha passado por períodos de expansão, retração e de relativa estabilidade uma ou mais vezes. Entretanto, os testes apresentados oferecem suporte, de maneira geral e atemporal, para apenas um dos três eventos demográficos (crescimento, redução ou estabilidade). Com o intuito de obter uma estimativa temporal da dinâmica do tamanho populacional foi realizado o *Bayesian Skyline Plot* (BSP, Drummond *et al.* 2005). Para a análise do BSP foi utilizado inicialmente o programa BEAUTi 1.7.5 (Drummond & Rambaut 2007), que gerou um arquivo de entrada para o programa BEAST 1.7.5 (Drummond & Rambaut 2007). Foi utilizado na análise o modelo evolutivo mais adequado que foi indicado pelo programa ModelTest 3.7 win (Posada & Crandall 1998), e disponível no BEAUTi 1.7.5, de acordo com o Critério de Informação de Akaike (sigla em inglês, AIC). O *hierarchical Likelihood Ratio Test* (hLRT) foi realizado, como implementado no MEGA 5, para verificar se os dados rejeitavam a hipótese de relógio molecular constante e assim, determinar se seria utilizado um modelo de relógio relaxado ou não. As taxas de mutação por sítio por linhagem por milhão de anos foram estimadas com base em uma distribuição uniforme. Para o ND2 a taxa se inicia em 0,01035, com distribuição de 0,00475 a 0,0187 (taxa estimada para Passeriformes, Weir & Schluter 2008). Para o G3PDH a taxa se inicia em 0,00135, com distribuição de 0,0012 a 0,0015 (taxa de mutação média para bases nucleotídicas nucleares neutras em Galíformes, Ellegren 2007). A árvore inicial foi construída por UPGMA. O modelo de *skyline* utilizado foi o *piecewise linear*, que permite que o tamanho populacional se altere constantemente ao longo dos intervalos coalescentes. O programa foi configurado para realizar a análise inicial com 100 milhões de iterações e *burn-in* de 10% das árvores iniciais. Foram realizadas análises com 5, 10 e 15 grupos coalescentes, as quais foram comparadas por *Bayes factor* no programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2007). Para verificar se a análise explorou adequadamente as árvores possíveis foi verificado o valor do ESS de todas as análises. A análise com maior valor de *Bayes factor* foi repetida e

teve seu resultado qualitativamente comparado com o da primeira corrida. Para cada análise o programa gerou um valor de *random seed* para iniciar a análise.

Não foram realizadas análises combinando os dois marcadores, tanto com o LAMARC quanto com o BEAST, pois não conhecemos a relação entre o tamanho populacional efetivo do mtDNA e do nucDNA de *C. caudata*, que apresenta um sistema de acasalamento peculiar organizado em *leks*.

Modelagem Ecológica de Nicho

A modelagem ecológica de nicho da distribuição atual e pretérita foi realizada no programa MaxEnt 3.3.3 (Phillips *et al.* 2006). Foram utilizados pontos de ocorrência cujo registro possui informação de latitude e longitude. Os pontos de ocorrência incluem as localidades das amostras de tecido utilizadas no presente trabalho, dos indivíduos depositados no MZUSP (coordenadas geográficas dos indivíduos cuja localidade não estava georreferenciada foram estimadas segundo o *Ornithological Gazetteer of Brazil*, Paynter Jr. & Traylor Jr 1991) e de coleções biológicas em bases de dados *online* (acessados por meio da Rede speciesLink e do *GBIF data portal*; respectivamente, <http://www.splink.org.br> acessado em 26/06/2012, <http://www.gbif.org/> acessado em 26/06/2012). Apenas um registro por coordenada geográfica foi utilizado. Essas coordenadas foram verificadas no programa DIVA-GIS, para reduzir a possibilidade de erros de localização. Existe a preocupação de que os pontos de ocorrência podem estar enviesados por um esforço de coleta não uniforme ao longo da distribuição da espécie e, com isso, ao se basear nesses dados, um modelo de distribuição resultante seria um misto de modelo de distribuição da espécie e de modelo do esforço de coleta (Soberón & Nakamura 2009, Phillips *et al.* 2009). Assim, para diminuir o impacto do viés de coleta utilizamos uma metodologia de subamostragem dos pontos. Os pontos foram tratados de maneira que apenas um por célula de 0,5 ° x 0,5 ° fosse selecionado na construção do modelo. Essa metodologia está sujeita à escolha subjetiva do tamanho das células, entretanto foi empregada aqui dado que: i) não temos conhecimento suficiente sobre o histórico do esforço de coleta que permita atribuir pesos diferentes a cada área amostrada e ii) metodologias que visam estender o viés de coleta às variáveis ambientais demonstraram não melhorar a acurácia dos modelos na América do Sul (Phillips *et al.* 2009).

Um total de 10.000 pontos de pseudo-ausência foi gerado dentro de um raio de 500 quilômetros a partir de cada ponto de ocorrência. O objetivo desta metodologia é obter amostras do ambiente a partir de pontos em que os indivíduos da espécie poderiam atingir por

dispersão (WanDerVal *et al.* 2009). Pontos localizados no oceano, para os quais as camadas ambientais não possuem informações, não foram considerados.

As camadas ambientais utilizadas foram as 19 variáveis climáticas do WORLDCLIM (Hijmans *et al.* 2005). O modelo foi avaliado com base no valor da área sob a curva de característica de operação do receptor (tradução livre do termo em inglês: *Area Under the receiver operating characteristic Curve*, AUC), que mede a fração de pontos de ocorrência corretamente inferidos (sensitividade) em relação à fração de pontos de ocorrência incorretamente inferidos (em inglês, *commission errors*). A projeção para o passado foi realizada com base nas 19 camadas climáticas de 21 mil anos atrás do projeto MIROC (*Model for Interdisciplinary Research on Climate*, <http://www.ccsr.u-tokyo.ac.jp/kyosei/hasumi/MIROC/tech-repo.pdf>) e do projeto CCSM3 (*The Community Climate System Model*, Collins *et al.* 2006). Um valor limiar de *10 percentile training presence* (valores em que a probabilidade de ocorrência fosse igual ou maior aos valores de probabilidade de ocorrência de pelo menos 10% das localidades utilizadas para a construção do modelo) foi utilizado para a obtenção de mapas binários (presença ou ausência da espécie).

Teste de Cenários Demográficos

As análises a seguir permitem avaliar se as histórias (cenários) que estamos propondo poderiam de fato ter resultado nos valores de diversidade genética similares às observadas. Assim, utilizando uma metodologia coalescente estes cenários foram simulados no programa BayeSSC (Anderson *et al.* 2005), uma modificação do programa SIMCOAL (Excoffier *et al.* 2000), com o intuito de criar uma distribuição nula das medidas de diversidade genética de cada cenário. Para a criação dessa distribuição 1.000 réplicas de cada cenário foram simuladas, e a análise do ajuste dos dados observados para cada cenário modelado foi feita seguindo a metodologia proposta por Voight e colaboradores (2005), que oferece uma estratégia para combinar múltiplas medidas de diversidade genética e múltiplos marcadores. Devido ao grande número de testes, foi utilizada correção de Bonferroni-Holm (Holm 1979) com $\alpha = 0,05$. As medidas de diversidade genética utilizadas foram: diversidade nucleotídica, diversidade haplotípica, número de sítios segregantes, número de haplótipos e D de Tajima. O resultado do ajuste foi obtido considerando cada marcador isoladamente e a combinação dos valores de diversidade de ambos marcadores.

Acreditamos que seja importante ressaltar que os cenários testados não conseguem abranger todos os processos que podem ter gerado o padrão filogeográfico encontrado. Assim, a interpretação resultante do ajuste dos dados aos cenários se baseia tanto na confiança de que os parâmetros utilizados (tamanho populacional, taxa de mutação, taxa de crescimento e

modelo de substituição) representam valores próximos dos reais quanto na capacidade de os marcadores utilizados possuírem informação passível de distinguir diferentes cenários. Dessa forma, tentamos formular cenários suficientemente amplos para que suas respostas fossem pouco afetadas pelas incertezas na estimativa dos parâmetros, mas estreitos o suficiente para que respostas relativamente distintas não se sobreponham.

Como os resultados oferecem suporte a cenários de expansão populacional e ausência de estrutura filogeográfica, os cenários desenvolvidos focaram em analisar duas perguntas principais: i) a diversidade genética encontrada em *C. caudata* é condizente com um cenário de expansão populacional posterior a um período glacial recente? ii) a ausência de estrutura pode ser uma consequência do longo tempo de geração de *C. caudata*?

Para abordar a primeira pergunta foram simulados cenários com população de tamanho constante, com a população reduzida no último período glacial, no penúltimo período glacial ou em ambos. Tendo em vista que mudanças climáticas em regiões polares parecem estar relacionadas com mudanças climáticas em regiões tropicais (Ledru *et al.* 2005) o tempo no qual as populações ficaram reduzidas foi determinado com base em uma curva de temperaturas do Pleistoceno estimada com base em dados de uma geleira na Antártida (Petit *et al.* 1999). A partir dessa curva, foram determinados dois intervalos de tempo no qual a temperatura esteve 2 °C menor que a temperatura atual, um representando o último período glacial e o outro o penúltimo.

Em todos os cenários testados as alterações demográficas ocorreram ao longo de 10 mil anos seguindo um modelo de expansão ou redução exponencial. O tamanho das populações reduzidas teria atingido valor entre 1% e 10% do seu tamanho original, sendo que esse intervalo engloba a redução populacional estimada a partir da razão entre as medidas de tendência central, média e mediana, do tamanho populacional no presente e no passado obtidas no BSP para o ND2. Dessa forma, foram inicialmente simulados quatro cenários para testar a hipótese de expansão populacional de uma única população sem estruturação (Figura 2A).

Como é possível que um sinal de expansão populacional seja gerado por populações subdivididas (Peter *et al.* 2010), também foram simulados cenários com 10 subpopulações, com intervalo de migração variando de 0 a 1 % de genes por geração e seguindo um modelo de ilhas, que se dividiram de uma única população ancestral ao mesmo tempo, no último ou no penúltimo período glacial. Dessa forma, foram simulados mais dois cenários (Figura 2B) que potencialmente poderiam explicar a diversidade genética encontrada.

Para abordar a segunda pergunta foram simulados cenários com divergências datadas no início do último ou do penúltimo período glacial resultando em duas populações. Os cenários são idênticos aos cenários com alterações demográficas simulados inicialmente, com a adição de subdivisão populacional. Nenhum dos cenários assume possibilidade de migração. Dessa forma, foram simulados mais três cenários (Figura 2C).

Figura 2. Cenários demográficos simulados, com variação no tempo do presente para o passado. A) cenários I a IV, simulados para testar a hipótese de expansão populacional de uma única população sem estruturação, as setas indicam o momento dos eventos históricos, B) cenários V e VI, simulados como possível cenário alternativo ao sinal de expansão e assumindo presença de estruturação populacional, C) cenários VII a IX, simulados para testar a hipótese de estruturação populacional (apesar de não ter sido detectado no presente trabalho), D) informações sobre os modelos, contendo a data dos eventos históricos, taxa de migração (quando utilizada), tamanho populacional efetivo e taxa de crescimento. *O intervalo de taxa de crescimento utilizado corresponde a alterações que reduzem a população a um tamanho entre 1 e 10 % de seu tamanho original.

Para estimar o tamanho populacional efetivo (N_e) da população no presente foram utilizadas duas inferências de θ ($2N_e\mu$ – sendo μ o valor da taxa de mutação) distintas: uma estimada pelo programa LAMARC, sob o pressuposto de alteração constante do tamanho populacional, e outra pelo IMA2 (Hey & Nielsen 2007), sob o pressuposto de tamanho constante. A estimativa do LAMARC foi feita em conjunto com a estimativa de taxa de

crescimento no FLUCTUATE como descrito acima. A estimativa do IMA2 foi obtida após análises exploratórias para melhor definir o intervalo de pressupostos (*priors*) utilizados. Por fim, duas corridas independentes para cada marcador foram realizadas e foram explorados valores de θ entre 0 e 300 para o ND2 e de 0 a 10 para o G3PDH. A discrepância nos valores de θ é um reflexo dos valores da taxa de mutação, que também variam em uma escala de grandeza, de maneira que tal discrepância não é mantida na estimativa de tamanho populacional efetivo. Para ambos os marcadores as primeiras 50.000 iterações foram consideradas como período de *burn-in* e pelo menos 1.000.000 de iterações subsequentes foram realizadas e foram utilizadas 20 cadeias de Markov com aquecimento geométrico de 0,96 a 0,9. As taxas de mutação utilizadas para converter os valores de θ foram as mesmas utilizadas no BSP, porém apenas considerando os seus valores centrais: 0,01035 para o ND2 e 0,00135 para o G3PDH. As estimativas apresentadas nos resultados para cada método e para cada marcador são as médias obtidas em cada uma das duas corridas. As estimativas de tamanho populacional foram analisadas de maneira subjetiva para definir qual o intervalo de valores seriam utilizado nas simulações, verificando se os intervalos em cada análise seriam semelhantes ou, caso discordassem, analisando a convergência de cada análise com o intuito de determinar a melhor estimativa dentro do modelo empregado em cada uma.

Nos cenários com duas subpopulações no presente, foi atribuída para cada uma metade do tamanho populacional estimado. Nos cenários com 10 subpopulações no presente, foi atribuída para cada uma um décimo do tamanho populacional estimado. Os intervalos de tempo, definidos primeiramente em anos, foram escalonados para unidades de tempo de geração, seguindo as especificações do programa. Para o mtDNA foi utilizado tempo de geração igual a 4,9 anos, como estimado para as fêmeas da espécie do mesmo gênero, *Chiroxiphia linearis* (McDonald 1993). Para o marcador nuclear foi utilizada uma média entre o tempo de geração das fêmeas e dos machos (11,7 anos) de *C. linearis*, considerando que o número de fêmeas se reproduzindo é três vezes maior que o número de machos devido ao comportamento reprodutivo em *leks* [tempo de geração nuDNA = $(3 \times 4.9 + 11.7) / 4 = 6.6$].

Como as taxas de mutação utilizadas partem de estimativas obtidas por mutação por ano, o aumento no tempo de geração leva tanto à redução da estimativa de N_e quanto à redução do número de gerações em um gargalo. Como a redução do tamanho populacional aumenta a probabilidade de um evento coalescente, espera-se que a quantidade de eventos coalescentes que ocorram em um período de gargalo reduzido (por causa do aumento do tempo de geração) seja compensada proporcionalmente (Wakeley 2003). Dessa forma, apesar

de utilizar valores que acreditamos estarem mais próximos da realidade, acreditamos que, por mais incertas as nossas estimativas de tempo de geração sejam, elas não devem comprometer os cenários simulados.

Resultados

Foram obtidas 102 sequências de 932 pares de base (pb) do ND2 nas quais nenhum códon de término foi encontrado. Também foram obtidos 82 pares de sequências do G3PDH e após a identificação da fase gamética dos heterozigotos, obtivemos 126 sequências de 303 pb do G3PDH, pertencentes a 63 indivíduos (Tabela 1). O teste PHI não encontrou sinal de recombinação no ND2 ou no G3PDH ($p = 0,17$ e $p = 0,16$, respectivamente). A rede de haplótipos construída com o ND2 (Figura 3) não apresentou sinal de estruturação genética, com haplótipos centrais com alta frequência encontrados na maior parte da distribuição da espécie, assim como haplótipos únicos em diferentes latitudes. A rede de haplótipos construída com o G3PDH (Figura 4) também não apresenta sinal de estruturação genética, com haplótipos centrais ocorrendo do norte ao sul da distribuição da espécie, porém com os haplótipos que ocorrem ao norte, apesar de não serem exclusivos, mais próximos entre si.

Figura 3. Rede de haplótipos baseada em 932 pb do gene mitocondrial ND2 de *Chiroxiphia caudata*. Números em vermelho entre os haplótipos indicam a posição da substituição nucleotídica. Cores de acordo com a Tabela 1.

Figura 4. Rede de haplótipos baseada em 303 pb do íntron 11 do gene nuclear G3PDH de *Chiroxiphia caudata*. Números em vermelho entre os haplótipos indicam a posição da substituição nucleotídica. Cores de acordo com a Tabela 1.

Para a realização do teste de Mantel e da AMOVA foram utilizadas 83 sequências do ND2 e 102 sequências do G3PDH. O teste de Mantel apresentou sinal de isolamento por distância ($r = 0,3483$ e $r = 0,2623$ para o ND2 e para o G3PDH, respectivamente) significativo ($p = 0,005$ para o ND2 e $p = 0,021$ para o G3PDH) com α igual a 5%, suportando um cenário de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas.

A AMOVA indicou que a maior parte da variação foi encontrada dentro das subpopulações (99,76% da diversidade do ND2 e 90,53% da diversidade do G3PDH) e, logo, baixo valor de F_{ST} , que nesse caso é igual à porcentagem de variação entre as subpopulações (0,00235 com o ND2 e 0,0947 com o G3PDH). F_{ST} com valor de p igual a 0,45 para o ND2 e 0,006 para o G3PDH, dessa forma indicando para o último um cenário de leve estruturação ($\alpha = 5\%$).

Para as sequências de ND2 foram encontrados 36 sítios segregantes, 30 haplótipos, diversidade nucleotídica de 0,00285 (dp. 0,00024) e diversidade haplotípica de 0,88 (dp. 0,02). As sequências possuem menor frequência de guanina (timina = 29.1%, citosina = 30.6%, adenina = 29.9% e guanina = 10.4%), como observado no mtDNA de outras aves (Johnson & Sorenson 1998, Cabanne *et al.* 2007, Maldonado-Coelho *et al.* 2013). Para o G3PDH foram encontrados 10 sítios segregantes, 14 haplótipos, diversidade nucleotídica de 0,00771 (dp. 0,00045) e diversidade haplotípica de 0,858 (dp. 0,018).

Para o ND2, os testes de neutralidade de Tajima ($D = -2,28$) e de Fu ($F_s = -29,12$), assim como o teste R_2 (0,02), apresentaram resultados significativos ($P < 0,01$ em todos os testes), rejeitando um cenário de estabilidade e sugerindo um cenário de expansão

populacional. O LAMARC corrobora esse cenário, apresentando um valor positivo de taxa de crescimento ($g = 1482$, 95% HPD = 991 a 3207). Para o G3PDH, os testes de Tajima ($D = 0,33$), de Fu ($F_s = -2,93$) e o R_2 (0,12) não apresentaram valores significativos, não rejeitando um cenário de estabilidade populacional. O LAMARC corrobora esse cenário e apresenta um baixo valor da taxa de crescimento com um intervalo que contém zero ($g = 189$, 95% HPD = -112 a 1240). O valor de diversidade nucleotídica das localidades com três ou mais indivíduos em relação às suas latitudes indica aumento da diversidade conforme as localidades se afastam da linha do Equador (Figura 5).

Figura 5. Distribuição latitudinal da diversidade genética (π) por marcador.

A violação da premissa de panmixia do BSP apresenta resultados mais robustos quando são utilizadas amostras de muitas subpopulações do que quando uma única subpopulação é utilizada (Heller *et al.* 2013). Dessa forma, utilizamos essa análise tratando todas as nossas amostras como oriundas de uma única população panmítica. O modelo de substituição de nucleotídeos indicado para o ND2 foi K81uf+G ($\alpha = 0,32$, Kimura 1981). Entretanto, como esse modelo não existe no programa MEGA foi utilizado o modelo GTR+G (Rodríguez *et al.* 1990), e o relógio molecular foi rejeitado. Assim, utilizamos *Relaxed Clock Uncorrelated Lognormal* para calcular o *Bayesian Skyline Plot* (BSP). Para o G3PDH foi selecionado o modelo TVM+I ($I = 0,96$, Posada & Crandall 2001b). Da mesma maneira, foi utilizado o GTR+I no MEGA e o relógio molecular não foi rejeitado, então foi utilizado o *Strict Clock*. O BSP do ND2 (Figura 6A) apresentou sinal de expansão recente, entre 25.000 e 50.000 anos atrás, enquanto o do G3PDH (Figura 6B) não apresentou sinal de alteração demográfica.

Figura 6. Bayesian Skyline Plot (BSP). O eixo x mostra o tempo em milhões de anos do presente para o passado. O eixo y representa o tamanho efetivo da população multiplicado pelo tempo de geração. A linha central representa a estimativa média do tamanho populacional, e as linhas externas indicam o intervalo de 95% de HPD (*Highest Posterior Density*). A) análise do ND2 e B) análise do G3PDH.

A modelagem climática do presente foi realizada com 52 pontos de ocorrência e apresentou alto valor de AUC (0,902). Quando projetada no UMG sob diferentes modelos paleoclimáticos indicou dois cenários distintos para a distribuição da espécie (Figura 7). O modelo baseado no MIROC apresentou uma grande área contínua e pequenas manchas isoladas onde a espécie teria condições de sobreviver, em regiões semelhantes à distribuição atual. Já segundo o modelo baseado no CCSM, teriam existido pelo menos duas áreas descontínuas onde a espécie poderia ter permanecido, com redução notável na região sul da Mata Atlântica.

Figura 7. Predição da modelagem de nicho ecológico de *Chiroxiphia caudata*. A) modelo para condições atuais. B) modelo para condições há 21 mil anos atrás (Último Máximo Glacial) baseado no modelo de clima do CCSM. C) modelo para condições há 21 mil anos atrás baseado no modelo de clima do MIROC. Em preto: áreas com probabilidade de ocorrência da espécie acima de um limiar previamente definido (*10 percentile training presence*).

As estimativas de tamanho populacional obtidas com o LAMARC e com o IMA2 para cada marcador estão apresentadas na tabela 2. Mesmo com a primeira estimativa baseada em um modelo de crescimento populacional exponencial constante ao longo do tempo e a segunda em um modelo de população constante, os intervalos contendo 95% de maior densidade de probabilidades posteriores (HPD, sigla em inglês referente a *Highest Posterior Density*) de cada análise apresentaram grande sobreposição. Dessa forma, utilizamos na simulação dos cenários demográficos um tamanho populacional que contivesse todo esse intervalo de variação (Figura 2D).

Tabela 2. Intervalo de 95% da distribuição de densidade de probabilidade posterior do tamanho populacional efetivo em número de genes estimado com o IMA2 e com o LAMARC para cada marcador. N indica o número de sequências utilizadas em cada estimativa.

Método	Marcador (N)	N _e (em número de genes)	
		95 HPD	
		inferior	superior
IMa2	ND2 (102)	515502	906382
	G3PDH (126)	406572	1271579
LAMARC	ND2 (102)	431790	1823869
	G3PDH (126)	657295	1928002

Todos os cenários que simularam tamanho populacional constante foram rejeitados. Dos cenários com expansão populacional e sem divergência, apenas aquele com dois gargalos populacionais seguidos foi rejeitado. Dos cenários com divergência, apenas aquele na qual ela ocorreu no último período glacial não foi rejeitado. Os valores de *p* para cada cenário estão apresentados por gene e combinadamente na tabela 3.

Tabela 3. Resultado do BayeSSC. Cenários correspondentes aos apresentados na figura 2. Valores de p para cada marcador e para os marcadores combinados. * cenários rejeitados com $\alpha = 5\%$ (com correção de Bonferroni-Holm).

Cenário	ND2	G3PDH	Combinado
I	0*	0,487	0*
II	0,19	0,13	0,108
III	0,014*	0,406	0,046
IV	0,256	0,005*	0,01*
V	0*	0,678	0,001*
VI	0*	0,692	0,001*
VII	0,009*	0,176	0,021
VIII	0,002*	0,417	0,011*
IX	0,007*	0,004*	0*

Discussão

Distribuição geográfica da diversidade genética

Os resultados indicaram um cenário de ausência de estrutura filogeográfica em *Chiroxiphia caudata*. No caso das redes de haplótipos (Figuras 3 e 4), os haplótipos mais frequentes se encontraram distribuídos por toda a área de ocorrência da espécie. O resultado da AMOVA também não apresenta redução da diversidade genética em decorrência do agrupamento em localidades baseado nos dados de ND2. O valor encontrado para o G3PDH pode ser um indício de que a ação da deriva genética dentro das localidades não esteja sendo homogeneizada pelo fluxo gênico. Esses resultados são congruentes com dados ecológicos que indicam que as fêmeas de *C. caudata* e *C. linearis* possuem maior capacidade de dispersão (Foster 1981, McDonald 1993).

É preciso ter em mente que as nossas comparações entre o mtDNA e o nucDNA são limitadas devido ao baixo número de marcadores utilizados, e podem ser frutos de um processo estocástico independente de cada genealogia (Edwards & Beerli 2000). Uma possibilidade para obter réplicas independentes dos processos históricos relativos às fêmeas de aves seria a utilização de marcadores ligados ao cromossomo sexual W, exclusivo delas. Entretanto tais marcadores ainda não são bem estudados, pouco se conhecendo sobre as suas propriedades, que, excetuando a herança matrilinear, podem ser muito diferentes das do mtDNA. Réplicas independentes da história da população como um todo poderiam ser obtidas com a utilização de marcadores em cromossomos autossômicos.

A correlação entre a distância genética e a geográfica das localidades amostradas é congruente com o resultado obtido por Francisco e colaboradores (2007) com populações de

C. caudata ao longo de um fragmento florestal na Serra do Mar e sugere que, apesar da ausência de linhagens divergentes, a espécie não deve ser vista como uma população panmítica. Tal correlação pode surgir como resultado do balanço entre a ação da deriva genética, que ao remover diversidade nas localidades contribui para a sua diferenciação, e a ação do fluxo gênico entre tais localidades, que diminui a diferenciação. De acordo com o modelo proposto por Hutchison e Templeton (1999), esse cenário pode ser atingido por uma população que esteve estável por tempo suficiente para que o balanço entre essas duas forças entre em um equilíbrio. O baixo índice de fixação do ND2 encontrado na AMOVA sugere que, apesar de localidades mais próximas serem menos diferenciadas, não há diferenciação significativa da diversidade mitocondrial entre as localidades.

Ambos os marcadores possuem valores de diversidade genética maiores nas localidades ao sul da distribuição da espécie (Figura 5), decrescendo em direção ao norte. Uma possível explicação para esse padrão é a expansão da população em direção ao norte e tais mecanismos históricos serão discutidos no próximo tópico.

A ausência de estrutura filogeográfica não é um padrão novo, e nem surpreendente, dentre os padrões filogeográficos de espécies endêmicas da Mata Atlântica. Ele foi registrado pela primeira vez, e foi considerado “um padrão contrastante”, por d’Horta em sua Tese (d’Horta 2008), um ano após a primeira publicação indexada de um estudo filogeográfico de uma ave do bioma (Cabanne *et al.* 2007). Registrado novamente por Cabanne em sua Tese (Cabanne 2009), trabalho que veio a ser publicado em periódico indexado em 2012 (Cabanne *et al.* 2012). E, também em 2012, registrada pela primeira vez em um periódico indexado por Batalha-Filho e colaboradores (Batalha-Filho *et al.* 2012).

Embora em todos esses casos a distribuição das espécies englobe áreas de quebras filogeográficas recorrentes na Mata Atlântica, é possível que: 1) as alterações ambientais que se colocaram como barreira para outras espécies não tenham tido papel semelhante para as espécies sem quebras filogeográficas, 2) tais espécies tenham sido subdivididas e extintas em uma das áreas, 3) tais espécies tenham sido subdivididas, porém o isolamento não foi suficiente para que linhagens distintas tenham surgido, ou 4) a distribuição pretérita dessas espécies, mais especificamente no momento em que houve o surgimento da barreira, não englobaria as áreas de quebras filogeográficas.

Demografia Histórica

Todos os testes utilizando o ND2 apontam um cenário de expansão, enquanto com o G3PDH, um cenário de estabilidade populacional (e.g. Figura 6). Esses resultados contrastantes podem ter sido gerados devido à falta de poder de resolução de eventos

recentes por parte dos dados do G3PDH, o que é esperado de um marcador nuclear, com evolução mais lenta que um marcador mitocondrial (Zink & Barrowclough 2008).

O gráfico do *Bayesian Skyline Plot* (BSP, Figura 6) sugere que o início da expansão tenha acontecido aproximadamente entre 25.000 e 50.000 anos atrás, intervalo de tempo anterior ao término do último período glacial. Utilizando modelagem ecológica de nicho para inferir a possível distribuição da espécie há 21.000 anos atrás (durante o período glacial), encontramos duas possíveis distribuições (Figura 7). Em um dos casos, a distribuição foi menor do que a atual e subdividida, sugerindo que houve uma expansão da população até a sua distribuição presente, congruente com os resultados encontrados com o ND2. No outro caso a distribuição foi bastante semelhante à atual, o que sugere estabilidade populacional, congruente com os resultados encontrados com o G3PDH. A incongruência entre modelos do último máximo glacial (UMG) já foi registrada por Thomé e colaboradores (2010), que levantaram a possibilidade de que estimativas climáticas baseadas em modelos de circulação atmosférica e oceânica iniciados com diferentes parâmetros (CCSM inicia a partir de dados de circulação do UMG, MIROC inicia a partir de dados modernos de circulação) possam ser responsáveis pelas diferenças (Weber *et al.* 2007).

Apesar do fato de que a expansão populacional possa ter se iniciado antes do fim do período glacial, seu tamanho provavelmente ainda era menor há 21.000 do que no presente, sendo possível que a espécie tenha atingido uma distribuição menor do que a sugerida nos modelos de nicho (Figuras 7). Entretanto, a grande margem de erro associada ao BSP e a imprecisão da projeção de modelos de nicho no tempo inviabilizam uma discussão sobre detalhes do tamanho populacional no passado e início da expansão.

A correlação positiva entre a diversidade genética e a distância da linha do Equador (como ilustrado na Figura 5) sugere que a espécie permaneceu no sul da Mata Atlântica e se expandiu para o norte. Esse cenário é incongruente com ambos os modelos. Em um dos modelos o refúgio hipotético da espécie está localizado no norte e no outro não há sinal de alteração demográfica. Incongruências entre modelos de distribuição e dados genéticos já foram registrados na Mata Atlântica (Thomé *et al.* 2010, Tonini *et al.* 2013), sendo possível que estimativas climáticas baseadas em modelos de circulação tenham baixa eficácia na reconstrução do clima pretérito na região (Cook & Vizy 2006).

Ambos os modelos aqui obtidos (Figura 7) apresentaram uma área isolada longitudinalmente, na região do atual Pantanal. Modelos de nicho para outras espécies da Mata Atlântica já projetaram uma área de estabilidade similar (Porto *et al.* 2012), assim

como os modelos da Mata Atlântica de Carnaval e Moritz (2008); porém, até o momento, nenhum estudo filogeográfico que temos conhecimento recuperou uma linhagem associada a esta região do Pantanal, nem mesmo o da espécie de roedor *Akodon montensis*, que apresenta complexa estrutura filogeográfica no interior do continente (Valdez & D'Elia 2013). Apesar de as redes de haplótipos (Figuras 3 e Figura 4) aqui obtidas terem sido coloridas segundo a latitude de amostragem não foram encontrados grupos de haplótipos diferenciados, assim como nenhum haplótipo exclusivo dessa faixa latitudinal, com exceção de haplótipos únicos, que estão presentes em toda a distribuição da espécie.

Amaro e colaboradores (2012) propuseram que a tolerância ao frio pode estar associada a um menor impacto das mudanças climáticas na espécie de anfíbio *Proceratophrys boiei*. Sendo possível que o modelo de nicho de *C. caudata* que sugere estabilidade populacional também possa ser explicado sob essa perspectiva: ocorrência da espécie em altitudes mais elevadas (tolerância ao frio) e estabilidade populacional. Entretanto, os resultados das análises genéticas com o ND2 rejeitam a hipótese de estabilidade ao longo do Pleistoceno, de maneira que o efeito de uma tolerância ao frio parece não ter sido suficiente para impedir a flutuação do tamanho populacional na espécie e o modelo de distribuição no UMG deve ser interpretado com cautela.

Análise dos cenários demográficos

Ao comparar o desempenho do ND2 e do G3PDH na avaliação do ajuste dos cenários simulados aos dados empíricos notamos que quase a totalidade dos cenários poderia ter gerado diversidade genética similar à do G3PDH, indicando que este não seja um marcador muito informativo em relação à história demográfica da espécie. Entretanto, ao combinar os dois marcadores é possível notar que dois modelos (III e VII) que haviam sido rejeitados pelo ND2 passam a ser aceitos, e um modelo (IV) que havia sido aceito passa a ser rejeitado (Figura 2, Tabela 3). Indicando que embora pouco eficiente isoladamente, o G3PDH possui informação útil quando utilizado de forma combinada. Dessa forma, a adição de novos marcadores, muito ou pouco informativos, pode contribuir para um melhor resultado final na avaliação dos modelos.

Os cenários demográficos testados suportam os cenários citados ao longo da discussão. Tanto a ausência de rejeição de modelos envolvendo gargalos quanto a rejeição dos modelos de tamanho constante indicam que a espécie passou por gargalos populacionais ao longo do fim do Pleistoceno (Figura 2, Tabela 3), período marcado por oscilações climáticas que afetaram, subdividindo ou não, a diversidade genética das espécies da Mata Atlântica. A rejeição dos modelos com dois gargalos consecutivos (Modelos IV e IX, Figura

2, Tabela 3) sugere que a população de *C. caudata* possa não ter sido afetada pelos dois eventos glaciais da mesma forma.

A não rejeição do cenário no qual a população é mantida isolada durante o último período glacial sugere que o longo tempo de geração (4,9 anos em fêmeas e 11,7 anos em machos de *C. linearis*, McDonald 1993) possa ter contribuído para a ausência de estrutura em *C. caudata*.

A metodologia de simulação utilizada não considera alterações geograficamente explícitas. Dessa forma, não conseguimos testar cenários com mudança de área de ocorrência, como sugerido em um dos modelos de distribuição do UMG. Arenas e colaboradores (2012) simularam diversos cenários sob essa perspectiva, e encontraram que fatores como a capacidade de dispersão, velocidade de alteração da distribuição e a capacidade de perceber em que sentido as novas áreas habitáveis estão mudando estão relacionados à manutenção da diversidade da espécie.

Abstract

Distinct evolutionary processes may act on the diversification of highland and lowland biota. Despite occurring in a topographic complex region, few studies discuss the role of mountains on the Atlantic Forest Pleistocene dynamics. The present study aims to analyze the phylogeography of *Hemitriccus diops*, an endemic Atlantic Forest passerine bird occurring from sea level to more than 1,600 meters. We sampled 82 individuals throughout its distribution, and partial sequences of the mitochondrial gene ND2 and of introns of the G3PDH and ODC nuclear genes were obtained. We found a shallow but sharp phylogeographic structure based on the ND2 data. The species' demographic history showed either signal of expansion or stability depending on the method of analysis. Inferred models of distribution during the last glacial maximum exhibited a larger distribution than in the present. Population stability is congruent with the possibility that cold-tolerant, montane-distributed species have suffered less impact of glacial cycles than other organisms not tolerant to cooler temperatures. However, the population structure estimated to have occurred during the Pleistocene suggests that the glacial cycles could have caused divergence in this species, as it was found in similar phylogeographic studies of other montane Atlantic Forest birds.

Resumo

Distintos processos evolutivos podem atuar na diversificação da biota de regiões elevadas e de regiões de baixada. Apesar de ocupar uma região topograficamente complexa, poucos estudos realizados na Mata Atlântica tentam discutir o papel das montanhas na dinâmica florestal durante o Pleistoceno. O presente trabalho se propôs a realizar o estudo filogeográfico de *Hemitriccus diops*, espécie de passeriforme endêmico da Mata Atlântica que ocorre do nível do mar até mais de 1.600 m. Foram utilizados 82 indivíduos amostrados ao longo da distribuição da espécie, e obtidas sequências parciais do gene mitocondrial ND2 e de íntrons dos genes nucleares G3PDH e ODC. Foi encontrado sinal de estrutura filogeográfica recente com o ND2, sem compartilhamento de haplótipos entre os dois grupos. Foram encontrados resultados distintos a cerca da dinâmica populacional da espécie, com sinais de expansão populacional e de estabilidade populacional dependendo do método de análise. Foram obtidos modelos de distribuição da espécie no último máximo glacial, que indicaram distribuição maior que a atual. Cenários com estabilidade populacional são congruentes com a proposta de que espécies capazes de ocorrer em regiões elevadas possuem tolerância ao frio e assim sofreram um menor impacto durante os períodos glaciais. Entretanto o resultado de presença de estrutura populacional recente com divergência datada no Pleistoceno sugere que,

como encontrado para outras aves que ocorrem em montanhas na Mata Atlântica, os ciclos glaciais tiveram influência suficiente para causar divergência na espécie.

Introdução

Regiões montanhosas possuem grande biodiversidade e abrigam metade das áreas prioritárias para conservação no planeta, tendo um papel às vezes visto como de berço da biodiversidade (Fjeldså *et al.* 2012). Parte do debate sobre a diversificação da biota Neotropical leva em consideração o efeito de suas montanhas, distinguindo processos que atuam na fauna de regiões elevadas dos atuantes nas regiões de baixada. Diferenças nas taxas de diversificação da avifauna neotropical desses dois grupos sugerem que a biota de regiões elevadas foi mais sensível às alterações climáticas do Pleistoceno, apresentando divergências mais recentes e um aumento da taxa de diversificação no Pleistoceno, o oposto do apresentado pelas aves de regiões baixas (Weir 2006, 2009).

A Mata Atlântica ocupa uma região em que as altitudes variam do nível do mar a mais de 1.700 metros acima do mesmo e é um bioma sob condições ambientais bastante heterogêneas, composto por áreas com diferentes fitofisionomias (Oliveira-Filho & Fontes 2000). A atividade orogênica na região durante os períodos geológicos anteriores ao Pleistoceno tem sido invocada como um dos processos responsáveis pela grande biodiversidade do bioma (e.g. Grazziotin *et al.* 2006, Amaral *et al.* 2013). Sendo a teoria de refúgios durante os ciclos glaciais do Pleistoceno (Haffer 1969, Vanzolini & Williams 1970) não refutada em estudos que apontam divergências recentes de animais (e.g. Cabanne *et al.* 2007, 2008, Carnaval *et al.* 2009). No estudo filogeográfico da perereca endêmica da Mata Atlântica *Proceratophrys boiei*, que não apresenta divergência no Pleistoceno, a capacidade de tolerar climas frios foi invocada como fator de resiliência maior às mudanças climáticas (Amaro *et al.* 2012). *P. boiei* atinge regiões de mais de 1.200 metros de altitude, e assim os autores do estudo propõem que espécies capazes de ocorrer em regiões elevadas de montanhas, ou seja, tolerantes a climas frios, sofreriam menor impacto das mudanças climáticas ao longo do Pleistoceno.

Dentre as espécies de aves endêmicas da Mata Atlântica com estudos filogeográficos disponíveis, a maioria também consegue atingir altitudes acima de 1.200 metros (Tabela 1). As exceções são *Myrmeciza squamosa*, que ocupa a região sul da Mata Atlântica e não possui estrutura filogeográfica (Amaral *et al.* 2012) e *Pyriglena atra*, restrita a uma pequena porção do nordeste do Brasil e ameaçada de extinção (Maldonado-Coelho *et al.* 2012). As demais englobam espécies tanto sem estrutura filogeográfica quanto com quebras filogeográficas

recentes em diferentes pontos da Mata Atlântica, evidenciando a complexidade da história do bioma.

Tabela 1. Distribuição altitudinal de aves endêmicas da Mata Atlântica (Parker III *et al.* 1996) com estudo filogeográfico disponível. O termo “baixada” foi utilizado como tradução livre de “lowlands”, empregado pelos autores para se referir à ocorrência da espécie em regiões de baixo relevo sem distinguir com precisão a altitude.

Espécie	Altura mínima	Altura Máxima	Referência
<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	baixada	1300	Cabanne <i>et al.</i> 2007, 2008.
<i>Sclerurus scansor</i>	baixada	1250	d'Horta <i>et al.</i> 2011
<i>Basileuterus leucoblepharus</i>	baixada	2000	Batalha-Filho <i>et al.</i> 2012
<i>Schiffornis virescens</i>	baixada	1700	Cabanne <i>et al.</i> 2012
<i>Pyriglena atra</i>	baixada	baixada	Maldonado-Coelho 2012
<i>Pyriglena leucoptera</i>	baixada	1250	Maldonado-Coelho 2012
<i>Myrmeciza loricata</i>	700 m	1300	Amaral <i>et al.</i> 2013
<i>Myrmeciza squamosa</i>	baixada	1000	Amaral <i>et al.</i> 2013
<i>Chiroxiphia caudata</i>	baixada	1900	Cap. 1 da presente dissertação

Dentro desse contexto, o presente estudo pretende analisar a filogeografia da espécie de ave passeriforme endêmica da Mata Atlântica *Hemitriccus diops*, popularmente conhecida como olho-falso (Figura 1). A espécie ocorre no centro e sul da Mata Atlântica: do sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul, leste do Paraguai e nordeste da Argentina, em Misiones (Fitzpatrick 2004, Figura 1). Ao longo de sua distribuição pode ser encontrada em altitudes superiores a 1.300 metros acima do nível do mar, caracterizando assim uma tolerância da espécie a climas frios. É uma ave comumente encontrada em associação com bambuzais, se alimentando de insetos entre as folhas (Fitzpatrick 2004, Santana & Anjos 2010, Parker III *et al.* 1996), e assim pode ser considerada estritamente florestal.

Na Mata Atlântica existem duas áreas de endemismo de bambus, uma na Serra do Mar e outra no sul da Bahia. No sul da Bahia se encontram as áreas mais ricas em bambus da região neotropical, com 22 gêneros (53% dos gêneros do Novo Mundo), sendo cinco endêmicos. Mas existem poucos estudos com biogeografia de bambu e sobre as relações dessas duas áreas com as demais áreas do próprio bioma e de outros biomas (Soderstrom *et al.* 1987). Assim, o estudo filogeográfico de uma ave associada a bambus também pode auxiliar a entender a dinâmica desse tipo de vegetação dentro da Mata Atlântica.

Figura 1. Mapa da América do Sul. Em detalhe: área de distribuição de *Hemitriccus diops* em cinza (segundo <http://www.natureserve.org/getData/birdMaps.jsp>) e localidades amostradas (números de acordo com Tabela 2). Imagem de *H. diops* (adaptada de del Hoyo *et al.* 2004).

Materiais e Métodos

Foram analisadas amostras de 82 indivíduos de *Hemitriccus diops* de 22 localidades (Tabela 2) visando representar a distribuição geográfica da espécie. Dessas amostras, 13 foram coletadas no decorrer do presente projeto, utilizando redes de neblina ou carabinas de pressão. Com as carabinas foram utilizadas munição de chumbo único ou cartuchos como descrito por Amaral e colaboradores (Amaral *et al.* 2012). As expedições de coleta foram autorizadas sob a licença permanente para coleta de material zoológico no. 14673-1 sob responsabilidade de C.Y. Miyaki. Os indivíduos sacrificados foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), e seus tecidos estão depositados na coleção do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves da USP (LGEMA-USP; credenciado como Fiel Depositário junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, Proc. No. 20000.000019/2003-32; Diário Oficial da União No. 119 de 24/06/2003, pg. 196). As demais amostras pertencentes ao acervo do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves da Universidade de São Paulo (LGEMA USP) utilizadas neste trabalho foram coletadas por colaboradores do laboratório. Amostras de tecido do Museu de Zoologia da

Universidade de São Paulo (MZ USP), Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (LBEM UFMG), Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNA PUC-Minas) e do Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa (MZ UFV) foram cedidas por doação. Por fim, foram também utilizadas duas sequências do GenBank de aves de Itapuã, Paraguay (EU231668.1 e EU231868.1, Ohlson *et al.* 2008).

Tabela 2. Amostras de *Hemitriccus diops*. “Cód.” se refere às localidades indicadas na figura 2. “Coleção” se refere à coleção de origem da amostra, com as siglas se referindo às seguintes coleções: Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves da Universidade de São Paulo (LGEMA USP), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais (LBEM UFMG), Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (MCNA PUC-Minas) e Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa (MZ UFV). As colunas correspondentes aos genes (ND2, G3PDH e ODC) indicam com “X” as amostras que foram sequenciadas com sucesso, sendo que em vermelho estão sequências que não puderam ser utilizadas devido à baixa precisão na determinação da fase gamética.

Cód.	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Amostra	Coleção	ND2	G3PDH	ODC
1	Bonito	BA	-11.9	-42.21	P2270	LGEMA USP	X	X	
2	Boa Nova	BA	-14.4	-40.12	MMC128	LBEM UFMG	X		
2	Boa Nova	BA	-14.4	-40.12	MMC129	LBEM UFMG	X	X	
2	Boa Nova	BA	-14.4	-40.12	MMC130	LBEM UFMG	X	X	X
2	Boa Nova	BA	-14.4	-40.12	MMC134	LBEM UFMG	X	X	
2	Boa Nova	BA	-14.4	-40.12	MMC135	LBEM UFMG	X	X	X
2	Boa Nova	BA	-14.4	-40.12	MMC136	LBEM UFMG	X	X	X
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA100	MZUSP	X	X	X
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA104	MZUSP	X	X	X
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA107	MZUSP	X	X	X
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA108	MZUSP	X	X	X
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA125	MZUSP	X	X	
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA157	MZUSP	X	X	
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA216	MZUSP		X	
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA224	MZUSP		X	
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA26	MZUSP		X	
3	Camacan	BA	-15.42	-39.49	BA90	MZUSP	X	X	
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	1644	MZUFV	X	X	X
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	1645	MZUFV	X	X	X
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	1646	MZUFV	X	X	X
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	CM135	LGEMA USP			X

Continuação da Tabela 2.

Cód.	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Amostra	Coleção	ND2	G3PDH	ODC
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	CM139	LGEMA USP			X
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	CM140	LGEMA USP			X
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	CM164	LGEMA USP	X		X
4	Santa Maria do Salto	MG	-16.412	-40.055	CM201	LGEMA USP	X	X	X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B0956	LBEM UFMG		X	
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B1026	LBEM UFMG	X	X	X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B1174	LBEM UFMG	X		X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B1176	LBEM UFMG	X	X	X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B1177	LBEM UFMG	X	X	X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B1178	LBEM UFMG	X	X	X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B1662	LBEM UFMG	X	X	X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	B1678	LBEM UFMG	X		X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	15947	LBEM UFMG	X	X	
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	MMC03	LBEM UFMG	X	X	
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	MMC04	LBEM UFMG	X	X	X
5	Mata Escura	MG	-16.43	-41	MMC15	LBEM UFMG	X	X	X
6	Ladainha	MG	-17.572	-41.802	CM62	LGEMA USP	X	X	X
6	Ladainha	MG	-17.572	-41.802	CM70	LGEMA USP	X	X	X
6	Ladainha	MG	-17.572	-41.802	CM98	LGEMA USP			X
7	Poté	MG	-17.738	-41.787	CM73	LGEMA USP	X		
7	Poté	MG	-17.738	-41.787	CM74	LGEMA USP	X	X	X
7	Poté	MG	-17.738	-41.787	CM75	LGEMA USP	X	X	X
7	Poté	MG	-17.738	-41.787	CM84	LGEMA USP	X	X	
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	1656	MZUFV	X	X	X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	B0969	LBEM UFMG	X		X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	B0970	LBEM UFMG	X	X	X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	B0971	LBEM UFMG			X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	B0973	LBEM UFMG	X	X	X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	B0974	LBEM UFMG	X		X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	B0976	LBEM UFMG	X		X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	B0977	LBEM UFMG		X	
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	MMC39	LBEM UFMG	X	X	X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	MMC41	LBEM UFMG	X	X	X
8	Nova Lima	MG	-19.98	-43.83	MMC42	LBEM UFMG	X	X	X
9	Santa Bárbara	MG	-20.08	-43.51	3044	MCNA PUC-Minas	X		
9	Santa Bárbara	MG	-20.08	-43.51	3070	MCNA PUC-Minas	X		
9	Santa Bárbara	MG	-20.08	-43.51	3072	MCNA PUC-Minas	X		

Continuação da Tabela 2.

Cód.	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Amostra	Coleção	ND2	G3PDH	ODC
9	Santa Bárbara	MG	-20.08	-43.51	3077	MCNA PUC-Minas	X		
9	Santa Bárbara	MG	-20.08	-43.51	B3662	LBEM UFMG	X	X	X
10	Mariana	MG	-20.27	-43.5	B3605	LBEM UFMG		X	X
10	Mariana	MG	-20.27	-43.5	B3606	LBEM UFMG	X		X
10	Mariana	MG	-20.27	-43.5	B3607	LBEM UFMG	X		X
10	Mariana	MG	-20.27	-43.5	B3609	LBEM UFMG	X		X
10	Mariana	MG	-20.27	-43.5	B3625	LBEM UFMG	X		X
10	Mariana	MG	-20.27	-43.5	B3640	LBEM UFMG		X	X
11	São Bartolomeu	MG	-20.3	-43.58	B1018	LBEM UFMG	X	X	
12	Araponga	MG	-20.65	-42.5	B1095	LBEM UFMG	X	X	X
12	Araponga	MG	-20.65	-42.5	B1096	LBEM UFMG	X	X	X
12	Araponga	MG	-20.65	-42.5	B1852	LBEM UFMG	X	X	X
12	Araponga	MG	-20.65	-42.5	B1857	LBEM UFMG		X	
13	Poços de Caldas	MG	-21.79	-46.56	81507	MZUSP			X
14	São José dos Campos	SP	-23.08	-46.06	85673	MZUSP	X		X
14	São José dos Campos	SP	-23.08	-46.06	91678	MZUSP	X		X
15	Serra da Cantareira	SP	-23.4	-46.67	87858	MZUSP	X		X
16	Piedade	SP	-23.71	-47.43	P2051	LGEMA USP	X		
17	Wenceslau Braz	PR	-23.87	-49.8	P962	LGEMA USP	X	X	X
17	Wenceslau Braz	PR	-23.87	-49.8	P985	LGEMA USP	X	X	X
18	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P1997	LGEMA USP	X	X	
18	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P769	LGEMA USP	X	X	X
18	Juquitiba	SP	-23.93	-47.07	P770	LGEMA USP	X	X	X
19	Pinhalão	PR	-23.97	-50.5	P868	LGEMA USP	X	X	X
19	Pinhalão	PR	-23.97	-50.5	P876	LGEMA USP	X	X	X
20	Curucutu	SP	-24.007	-46.933	15129	LGEMA USP	X	X	X
21	Ortigueira	PR	-24.2	-50.92	11420	LGEMA USP	X	X	X
22	Itapuã, Paraguai		-26.58	-54.88	NRM 956601			X	X
Total							71	60 (44+16)	62 (49+13)

Marcadores Moleculares

Foram utilizados três marcadores moleculares: o gene mitocondrial que codifica a subunidade 2 da NADH desidrogenase (ND2), o íntron 11 do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) e um trecho entre os éxons 6 e 8 do gene que codifica a ornitina descarboxilase (ODC).

Trabalho Laboratorial

A extração e amplificação do DNA, purificação do produto amplificado, sequenciamento do DNA e o alinhamento das sequências foram realizados como descritos no capítulo anterior. Os procedimentos para o ODC foram os mesmos utilizados para o G3PDH, e os iniciadores foram ODC-F e ODC-R (Friesen *et al.* 1999).

Análise dos dados

Análise e alinhamento das sequências seguiram o mesmo procedimento do capítulo anterior. Como foi encontrado sinal de recombinação no G3PDH foi utilizado o DnaSPv5 para determinar o número mínimo de recombinações e as regiões de provável ocorrência das mesmas. As sequências foram separadas em trechos contínuos sem a presença de regiões com provável ocorrência de recombinação. Dentre esses trechos do G3PDH foi selecionado aquele com maior variabilidade.

Análises de estrutura populacional

Foram construídas redes de haplótipos para todos os marcadores seguindo a mesma metodologia do capítulo anterior. Como na rede do ND2 foi encontrado sinal de estrutura, com duas linhagens congruentes com suas distribuições geográficas, a AMOVA foi realizada de maneira hierárquica, adicionando o nível no qual as localidades estão organizadas em dois grupos correspondentes aos grupos de haplótipos do ND2. Essa análise foi realizada no programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) incluindo apenas as localidades com três ou mais sequências.

Diversidade Genética e Demografia Histórica

As estatísticas sumárias obtidas para cada linhagem foram as mesmas do capítulo anterior: número de sítios segregantes (S), diversidade haplotípica (H_d), número de haplótipos (h) e diversidade nucleotídica (π). Para testar se há sinal de alteração demográfica, foram utilizados os testes D de Tajima (Tajima 1983), F_s de Fu (Fu 1997) e o R_2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Esses dados foram obtidos para cada marcador no programa DnaSPv5.

Com o intuito de obter uma estimativa temporal da dinâmica do tamanho populacional foi realizado o *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP, Heled & Drummond 2008) para cada linhagem da seguinte maneira: inicialmente o arquivo a ser utilizado no programa BEAST 1.7.5 (Drummond & Rambaut 2007) foi montado no programa BEAUTi 1.7.5 (Drummond & Rambaut 2007). O modelo de evolução das sequências, a hipótese de um relógio molecular constante, a árvore inicial e a taxa de mutação para cada marcador foram determinados da

mesma forma que no capítulo anterior, sendo a taxa de mutação do ODC considerada como sendo igual à do G3PDH. O programa foi configurado para realizar a análise com 200 milhões de iterações e *burn-in* de 10% das árvores iniciais. Para verificar se a análise explorou adequadamente as árvores possíveis elas foram executadas duas vezes para cada grupo, sempre com um valor de *random seed* próprio, e os seus resultados foram comparados. Também utilizamos o programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2007) para verificar o valor do Tamanho Amostral Efetivo (em inglês, *Effective Sample Size*, ESS).

A fim de obter estimativas do tempo de divergência, tamanho populacional e taxa de migração utilizamos o programa IMA2 (Hey & Nielsen 2007) considerando que os dois grupos de haplótipos encontrados são grupos irmãos e oriundos de uma população ancestral comum exclusiva. Análises exploratórias foram realizadas para ajustar os parâmetros da corrida. Foram então realizadas três corridas independentes nas quais foram explorados valores de Θ entre 0 e 12, parâmetro de migração entre 0 e 8 e parâmetro de tempo de divergência entre 0 e 4. Foram realizadas 50.000 iterações como período de *burn-in* e permitimos que as análises prosseguissem até que pelo menos 35.000 árvores fossem obtidas (3.500.000 iterações). Foram utilizadas 20 cadeias de Markov com aquecimento geométrico de 0,96 a 0,9. As análises foram avaliadas com base no seu valor de ESS, nas curvas de probabilidade posterior de cada parâmetro e ao se comparar o resultado de análises independentes. Foram obtidas 121.623 árvores que foram combinadas em uma última análise, que permitiu obter novas curvas de probabilidade posterior para a estimativa de cada parâmetro e realizar um teste com seis modelos aninhados.

O modelo completo, que é o mesmo modelo sob o qual as análises independentes foram realizadas, estima um valor de Θ independente para cada linhagem atual e para a população ancestral e valores de taxa de migração independentes entre as linhagens atuais (modelo ABCDE, seguindo a nomenclatura utilizada em Hey & Nielsen 2007). Os seis modelos aninhados testados foram: 1) taxas de migração iguais (ABCDD), 2) taxas de migração igual a zero (ABC00), 3) tamanho populacional igual das populações atuais e mesma taxa de migração (AACDD), 4) tamanho populacional igual das populações atuais e taxa de migração igual a zero (AAC00), 5) tamanho populacional igual em todas as populações e a mesma taxa de migração (AAADD) e 6) tamanho populacional igual em todas as populações e taxa de migração igual a zero (AAA00). A performance de cada modelo foi testada com base no teste de logaritmo da razão de verossimilhança, como implementado no próprio programa (Hey & Nielsen 2007).

O IMA2 aparenta ser mais eficiente que o LAMARC em discriminar fluxo gênico de polimorfismo ancestral, dessa forma não utilizamos o último para inferir tais parâmetros demográficos apesar de ele possibilitar que um pressuposto de tamanho não constante pudesse ser utilizado.

Modelagem Ecológica de Nicho

A modelagem ecológica de nicho foi realizada seguindo a mesma metodologia do capítulo anterior. Foram gerados 14.000 pontos de pseudo-ausência em um raio de 700 quilômetros a partir de cada ponto de ocorrência, tal alteração ocorreu porque o uso de um raio de 500 quilômetros resultava em modelos com valores de AUC inferiores a 0,9.

Teste de Cenários Demográficos

Os cenários demográficos foram criados e avaliados segundo a mesma metodologia do capítulo anterior. Entretanto, as estatísticas sumárias (diversidade nucleotídica, diversidade haplotípica, número de sítios segregantes, número de haplótipos e D de Tajima) foram obtidas para cada grupo (linhagem genética) e não para a amostragem total da espécie, permitindo que cada grupo fosse avaliado independentemente. Dessa forma, possibilitamos que o cenário simulado pudesse ser rejeitado para um dos grupos e não para o outro, assumindo que as duas populações podem ter histórias diferentes. Para a avaliação combinada dos cenários, e não de cada população, foram considerados a combinação de todas as estatísticas sumárias e o valor de F_{ST} .

Os resultados das análises genéticas suportaram cenários tanto de estabilidade quanto de expansão populacional. A modelagem ecológica de nicho indicou um cenário de retração populacional após o UMG. Portanto desenhamos cenários demográficos para avaliar se tais dinâmicas populacionais poderiam produzir a diversidade genética similar à que encontramos.

Como no capítulo anterior, foram definidos intervalos de tempo com base em uma curva de temperaturas do final do Pleistoceno (Petit *et al.* 1999). Assumimos que a dinâmica da população seguiu os ciclos glaciais, seja diminuindo durante o período glacial (e depois expandindo até o presente) ou aumentando (e depois diminuindo até o presente). A divergência da população foi estimada com base na análise do modelo completo do IMA2, o tamanho populacional efetivo e a taxa de migração foram estimados com base nos valores estimados para o modelo AABDD, modelo mais simples não rejeitado pela análise dos modelos aninhados.

Foram simulados cenários com alteração demográfica no último período glacial, no penúltimo período glacial e em ambos, além de um cenário sem alterações demográficas. Os

cenários foram simulados sob dois intervalos de intensidade de alterações demográficas diferentes. O primeiro resultando em populações no período glacial de 1% a 10% do tamanho populacional efetivo atual ou com populações cujo tamanho atual represente de 1% a 10% do tamanho atingido durante o período glacial. E o segundo com intensidade menor, com mudanças de 40% a 50% do tamanho populacional efetivo (Figura 2).

Figura 2. Cenários demográficos simulados, com variação no tempo do presente para o passado. A) Esquema das alterações demográficas, linha branca representa a estrutura populacional. B) informações sobre os modelos, contendo a data dos eventos históricos, a taxa de migração, tamanho populacional efetivo e taxa de crescimento. *Os intervalos de taxa de crescimento utilizados correspondem a alterações que reduzem a população a um tamanho entre 1 e 10 % ou entre 40 e 50 % de seu tamanho original.

Resultados

Foram obtidas: a) 71 sequências de 910 pares de base (pb) do gene ND2 nas quais nenhum códon de término foi encontrado, b) sequências do G3PDH para 60 indivíduos que, após o descarte das sequências cuja determinação da fase gamética tinham baixa probabilidade, resultaram em 88 sequências de 323 pb do G3PDH, e 3) sequências do ODC

para 62 indivíduos que, após o descarte das sequências cuja determinação da fase gamética possuía baixa probabilidade, resultaram em 98 sequências de 517 pb (Tabela 2). As duas primeiras bases nucleotídicas do trecho utilizado para o ODC são do éxon 6, as bases de 159 a 239 do éxon 7, e as 434 bases restantes pertencentes a dois íntrons, as regiões correspondentes aos éxons foram removidas das análises.

Foi encontrado sinal de recombinação no G3PDH ($p = 0,023$), mas não no ODC ($p = 1,0$) e nem no ND2 ($p = 0,1951$). Foram identificadas três regiões livres de recombinação no G3PDH, com 28 pb, 66 pb e 73 pb, contendo quatro, oito e três haplótipos, respectivamente. As análises seguintes foram realizadas com a região de 66 pb.

A rede de haplótipos construída com o ND2 (Figura 3) apresentou dois grupos contendo haplótipos exclusivos e conectados pelos haplótipos centrais de cada grupo, que diferem em apenas um passo mutacional. Os dois grupos de haplótipos possuem distribuição geográfica disjunta, sendo que a separação entre os grupos apresenta alguma coincidência com a localização do Rio Doce. Sendo assim, denominamos o grupo ao norte do Rio Doce de “linhagem norte” e o grupo ao sul, de “linhagem sul”. As redes de haplótipos construídas com o G3PDH (Figura 4) e com o ODC (Figura 4) não apresentaram estruturação, e contém diversos haplótipos compartilhados entre indivíduos que pertencem às duas linhagens mitocondriais.

Figura 3. A) Rede de haplótipos baseada em 910 pb do gene mitocondrial ND2 de *Hemitriccus diops*. Números em vermelho entre os haplótipos indicam a posição da substituição nucleotídica. Cores representam duas linhagens genéticas. B) Mapa com a distribuição de *H. diops* e localidades amostradas (cores correspondem às linhagens, números de acordo com Tabela 2).

Figura 4. Redes de haplótipos de 434 pb do ODC e de 66 pb do íntron G3PDH de *Hemitriccus diops*. Cores representam as linhagens mitocondriais (Figura 3).

Seguindo os resultados das redes de haplótipos, o ND2 foi o único marcador que apresentou sinal de estrutura entre as duas linhagens na AMOVA ($\Phi_{CT} = 0,39$). Tanto o ND2 quanto o G3PDH apresentam sinal de estrutura em relação às localidades dentro de cada linhagem ($\Phi_{SC} = 0,13$ e $\Phi_{SC} = 0,11$, respectivamente) e em relação às localidades e o total ($\Phi_{ST} = 0,47$ e $\Phi_{ST} = 0,10$, respectivamente). O ODC não apresenta nenhum sinal de estrutura. Em todos os casos, a maior variação foi encontrada dentro das localidades (Tabela 3).

Os resultados dos testes de expansão por marcador (Tabela 4) indicaram para a linhagem norte expansão populacional (F_s e R_2 para ND2; F_s para G3PDH; F_s e R_2 para ODC) e estabilidade populacional (D para ND2; R_2 e D para G3PDH; D para ODC). Já para a linhagem sul, os resultados sugeriram expansão populacional (F_s e R_2 para ND2; F_s para G3PDH; F_s para ODC) e estabilidade populacional (D para ND2; R_2 e D para G3PDH; R_2 e D para ODC).

Tabela 3 – Resultados da AMOVA. Componentes de variância e porcentagem de variação por grupo hierárquico por marcador, entre parênteses o número de sequências utilizadas. Valores dos índices de fixação por marcador. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Fonte de variação	ND2 (57)		G3PDH (72)		ODC (80)	
	Componentes de Variância	% de variação	Componentes de Variância	% de variação	Componentes de Variância	% de variação
Entre linhagens	0,64783	39,12	-0,00267	-0,88	-0,00138	-0,23
Entre localidades dentro das linhagens	0,13507	8,16	0,04156	13,7	0,01944	3,3
Dentro das localidades	0,87289	52,72	0,26446	87,18	0,57181	96,94
Índice de fixação						
Φ_{SC}	0,13401**		0,13582**		0,03288	
Φ_{ST}	0,47283**		0,12822**		0,03062	
Φ_{CT}	0,39125*		-0,00879		-0,00234	

Tabela 4. Estatísticas sumárias por marcador por linhagem. N = número de genes analisados. S = número de sítios segregantes. h = número de haplótipos. Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica. dp = desvio padrão. D = D de Tajima. $F_s = F_s$ de Fu. $R = R_2$. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Marcador		N	S	h	Hd (dp)	π (dp)	D	Fs	R
Norte	ND2	36	14	13	0,881 (0,039)	0,00237 (0,0003)	-1,39	-6,28**	0,065*
	G3PDH	52	4	6	0,374 (0,083)	0,00714 (0,0019)	-1,38	-3,43*	0,064
	ODC	50	12	10	0,652 (0,005)	0,00256 (0,0005)	-1,73	-4,81**	0,046*
Sul	ND2	35	13	14	0,879 (0,041)	0,00205 (0,0002)	-1,6	-9,49**	0,055**
	G3PDH	36	4	5	0,538 (0,091)	0,00938 (0,0019)	-0,88	-1,72	0,081
	ODC	48	8	9	0,781 (0,047)	0,00305 (0,0003)	-0,73	-2,91	0,081

O modelo de substituição de nucleotídeos indicado para o ND2 foi o TrN + I (I = 0,7; Tamura & Nei 1993), para o G3PDH foi TIM+I+G (I = 0,65 e $\alpha = 0,63$; Posada & Crandall 2001b) e para o ODC foi o HKY (Hasegawa *et al.* 1985). A hipótese de relógio molecular constante ao longo da evolução das amostras foi rejeitada apenas para o ND2, tanto na linhagem norte quanto na linhagem sul. Nesses casos, foi utilizado *Relaxed Clock: Uncorrelated Lognormal* para calcular o EBS, o modelo de substituição de nucleotídeos utilizado para o G3PDH foi o TrN+I+G, dado que o programa MEGA não contém todos os modelos evolutivos. O EBS não apresentou mudanças no tamanho populacional, e assim, indicou um cenário de estabilidade populacional em ambas as linhagens (Figura 5).

Figura 5. Extended Bayesian Skyline Plot (EBS) baseado em 910 pb do ND2, 66 pb do G3PDH e 434 pb do ODC. A) linhagem norte e B) linhagem sul de *Hemitriccus diops*. O eixo y representa o tamanho efetivo da população multiplicado pelo tempo de geração. A linha central representa a estimativa média do tamanho populacional, e as linhas externas delimitam os 95% dos valores de HPD (*Highest Posterior Density*). O eixo x mostra o tempo em milhões de anos do presente para o passado.

A modelagem de distribuição da espécie no presente foi baseada em 31 registros de ocorrência da espécie e obteve um alto valor de AUC (0,906). O modelo de distribuição do presente mostra uma distribuição contínua, com a linhagem norte ocupando uma faixa estreita ao norte do Rio Doce, e uma região mais ampla ao sul do mesmo, conectadas por uma região estreita. A modelagem paleoclimática indica que há 21 mil anos atrás a distribuição da espécie também possuía uma distribuição contínua, e ocupava uma área mais ampla, tanto a norte quanto a sul do Rio Doce, incluindo áreas hoje abaixo do nível do mar, mas que possivelmente estavam expostas no passado devido à diminuição do nível do mar (Figura 6).

Figura 6. Predição da modelagem de nicho ecológico de *Hemitriccus diops*. A) modelo para condições atuais. B) modelo para condições há 21 mil anos atrás (Último Máximo Glacial) baseado no modelo CCSM. C) modelo para condições há 21 mil anos atrás baseado no modelo MIROC. D) sobreposição das distribuições baseadas no modelo CCSM e Atual. Em preto: áreas com probabilidade de ocorrência superior a 10 *percentile training presence*.

As análises do IMA2 baseadas nos dados dos três marcadores apresentaram altos valores de ESS, entretanto a estimativa do tempo de divergência teve baixa convergência ($ESS < 50$). A probabilidade posterior da estimativa do tempo de divergência entre os dois grupos não toca o zero após o pico em 677.472 anos (Figura 7). A estimativa de tamanho populacional, em número de indivíduos, tem pico em 1.960.689 indivíduos no sul, 1.422.388 indivíduos no norte e 1.619 indivíduos na população ancestral, sendo que a estimativa da última é muito próxima de zero (Figura 8). A estimativa da taxa de migração de indivíduos do norte para o sul tem pico em 0,000001 indivíduos por geração e do sul para o norte em 0,00000064 indivíduos por geração e em nenhum dos casos toca o zero antes de atingir o pico, atribuindo probabilidades relativamente altas à ausência de migração (Figura 9). Os valores contendo 95% da densidade de probabilidade posterior e os valores

originais não convertidos com base na taxa de mutação utilizada estão apresentados na tabela 5.

Figura 7. Estimativa de tempo de divergência das duas linhagens de *Hcemitriccus diops*.

Figura 8. Estimativa de Θ para a linhagem sul (preto), linhagem norte (cinza escuro) e população ancestral (cinza claro) de *Hemitriccus diops*.

Figura 9. Estimativa da taxa de migração por geração da linhagem norte para a linhagem sul (preto) e o inverso (cinza) para *Hemitriccus diops*.

Tabela 5. Estimativas demográficas do IMA2. 95 Inf HPD = Limite inferior de 95% da Densidade de Probabilidade Posterior (DPP). 95 Sup HPD = Limite superior da DPP. Pico = estimativa com maior valor de probabilidade posterior. AACDD = valores obtidos para o modelo aninhado AACDD. Tempo em anos obtido pela divisão do parâmetro “Tempo” pela taxa de mutação. Número de indivíduos (grupos do sul, do norte e ancestral) obtido pela divisão de Θ por 4 vezes o valor da taxa de mutação. %/ano de migrantes obtida pela multiplicação do parâmetro de migração pela taxa de mutação. Taxa de mutação utilizada igual à média geométrica da taxa de mutação para cada gene (7.41×10^{-7} mutações por gene por ano).

	95 Inf HPD	95 Sup HPD	Pico	AACDD
Tempo	0,114	3,186	1,65	
Em anos	153848	4299655	2226752	
Θ Sul	1,458	7,59	3,414	5,2877
Θ Norte	1,614	7,986	3,702	5,2877
Θ Ancestral	0	5,118	0,006	0,0064
Indivíduos Sul	491910	2560764	1151838	1783999
Indivíduos Norte	544542	2694369	1249005	1783999
Indivíduos Ancestral	0	1726745	2024	2159
Migração Norte > Sul	0	4,204	0,668	1,2364
Migração Sul > Norte	0	4,644	0,94	1,2364
%/ano Norte > Sul	0	$3,112 \times 10^{-6}$	$4,95 \times 10^{-7}$	$9,162 \times 10^{-7}$
%/ano Sul > Norte	0	$3,441 \times 10^{-6}$	$6,965 \times 10^{-7}$	$9,162 \times 10^{-7}$

No teste dos modelos aninhados no IMA2 todos os modelos com ausência de migração foram rejeitados, assim como o modelo no qual as duas populações atuais e a população ancestral possuem o mesmo tamanho (Tabela 6).

Tabela 6. Modelos aninhados do IMA2. gl = graus de liberdade. 2LLR = teste do logaritmo da razão da verossimilhança. ESS = tamanho amostral efetivo. p = valor de p de cada cenário. *modelos no qual um parâmetro foi fixado no limiar da distribuição (migração = 0) e nos quais é esperado que o valor de 2LLR assumia distribuição congruente com a de qui-quadrado metade das vezes e zero na outra metade

Modelo	gl	2LLR	ESS	p
ABCDE	-	-	31,14	-
ABCDD	1	1,589	15,21	0,207
ABC00	2*	11,22	1	0,002
AACDD	2	2,46	14,81	0,292
AAC00	3*	20,64	1	0
AAADD	3	9,793	204,9	0,02
AAA00	4*	20,78	1	0

Dessa forma consideramos para a simulação de cenários coalescentes um cenário mais próximo do AACDD: duas populações atuais com igual tamanho e mesma taxa de migração entre elas. O tamanho das populações do presente, da população ancestral e a taxa de migração do cenário AACDD foram, respectivamente, 1.783.999 indivíduos, 2.159 indivíduos e $9,16 \times 10^{-5}$ % por geração. O baixo de valor de ESS nas estimativas de tempo de divergência e a curva que não toca o zero após o pico podem indicar que os dados não possuem informação suficiente para estimar parâmetros da população ancestral. A estimativa de tamanho populacional efetivo da população ancestral é sensível a quanto é permitido variar as estimativas de tempo de divergência, permitindo mais ou menos valores na cauda da curva que não toca o zero. Como existe sobreposição das três estimativas de tamanho populacional, optamos por simular cenários demográficos com uma população ancestral menor que as populações atuais, porém com tamanho arbitrariamente definido como metade do tamanho das populações atuais.

Todos os cenários de expansão populacional durante os períodos glaciais foram rejeitados. Enquanto cenários de redução populacional durante os períodos glaciais e de estabilidade populacional não foram rejeitados (Tabela 7).

Tabela 7. 3. Resultado do BayeSSC, valores de p para os três marcadores combinados e separadamente. Cenários correspondentes aos apresentados na Figura 2. * cenários rejeitados com $\alpha = 5\%$ (com correção de Bonferroni-Holm).

Cenário	Taxa de Crescimento	Combinados			ND2			ODC			G3PDH		
		Hd	Sul	Norte	Hd	Sul	Norte	Hd	Sul	Norte	Hd	Sul	Norte
I	-	0,02	0,02	0,02	0*	0*	0,01	0,42	0,62	0,31	0,12	0,14	0,09
II	1 - 10 %	0*	0*	0,01	0,15	0,13	0,29	0,03	0,19	0,03	0,01	0,03	0,02
III	1 - 10 %	0,24	0,24	0,19	0,25	0,22	0,26	0,47	0,56	0,49	0,08	0,11	0,09
IV	1 - 10 %	0*	0*	0*	0,12	0,12	0,19	0*	0	0	0*	0,01	0,01
V	1 - 10 %	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0,01	0*	0,004	0,01
VI	1 - 10 %	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0,03	0,08	0,03	0,72	0,69	0,55
VII	1 - 10 %	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0,93	0,88	0,75
II	40 - 50 %	0,09	0,09	0,02	0,008*	0,04	0,02	0,11	0,23	0,08	0,43	0,57	0,38
III	40 - 50 %	0,2	0,22	0,18	0,25	0,21	0,26	0,45	0,54	0,48	0,08	0,1	0,07
IV	40 - 50 %	0,25	0,26	0,16	0,56	0,45	0,47	0,35	0,48	0,39	0,04	0,07	0,04
V	40 - 50 %	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0,03	0,03	0,03	0,76	0,71	0,59
VI	40 - 50 %	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0,05	0,1	0,05	0,68	0,66	0,5
VII	40 - 50 %	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0,02	0,05	0,02	0,83	0,78	0,63

Discussão

Os resultados obtidos com mtDNA indicaram a existência de estrutura filogeográfica em *Hemitriccus diops*, com uma quebra próxima à região do Rio Doce (Figura 3, Tabela 3). Entretanto, existem localidades amostradas em ambos os lados da cabeceira do rio cujas amostras pertencem à mesma linhagem genética e, assim, o Rio Doce não seria uma barreira ao fluxo gênico da espécie, mas um marco geográfico que indica a região onde essa quebra filogeográfica ocorreu. A região do Rio Doce coincide com a quebra filogeográfica de outras espécies de aves (Cabanne et al. 2008, Maldonado-Coelho et al. 2012, Batalha-Filho 2012), uma das quais apresenta área de contato de linhagens na região entre o Rio Doce e o Rio Jequitinhonha (Batalha-Filho 2012). A região ao norte do Rio Doce coincide com o refúgio Bahia e ao sul, com um refúgio em São Paulo (Carnaval & Moritz 2008). Há também coincidência com áreas de endemismo de bambu na Mata Atlântica: sul da Bahia (norte do Rio Doce) e a Serra do Mar (majoritariamente no estado de São Paulo) (Soderstrom et al. 1987).

A ausência de sinal de estrutura populacional baseado nos dados nucleares (Figura 4, Tabela 3) pode ser reflexo de uma evolução mais lenta dos marcadores nucleares em relação ao mitocondrial (Zink & Barrowclough 2008), resultando em pouca informação acerca de eventos recentes da história da espécie.

A AMOVA baseada nos dados do ND2 e do G3PDH (Tabela 3) apresentou resultados significativos de estrutura entre as localidades. Esse resultado sugere um cenário no qual a ação da deriva genética dentro das localidades não parece ser compensada pelo fluxo gênico.

As estimativas do I_{Ma}2 obtidas com os três marcadores em conjunto (Tabela 6) rejeitaram cenários com ausência de migração entre as duas linhagens. Entretanto, a rede de haplótipos do ND2 (Figura 3) não mostra nenhum haplótipo compartilhado entre as linhagens, sugerindo que hoje não exista mais migração entre as populações e que o sinal de migração encontrado seja referente a uma dinâmica não mais atuante na população. Com base na baixa taxa de migração inferida e na existência de uma região não amostrada entre as duas linhagens existe a possibilidade de que não tenhamos amostrado localidades de uma possível zona de contato secundário, com compartilhamento de haplótipos no mtDNA. Segundo um cenário de seleção contra híbridos é esperado, segundo a regra de Haldane, que as fêmeas em aves (sexo heterogamético – ZW) apresentem menos introgressão e que a zona de contato seja estreita (Sætre & Sæther 2010). Entretanto, os nossos dados não nos permitem abordar a incongruência entre os dados mitocondriais e nucleares aprofundadamente.

Os sinais de expansão encontrados nas duas linhagens com o F_s de F_u e o R_2 (Tabela 4) indicaram cenários de instabilidade populacional que poderiam estar associados aos ciclos glaciais. O teste D de Tajima, entretanto, não apresenta sinal de expansão (Tabela 4), o que ser devido a uma menor robustez do teste em relação ao F_s de F_u e ao R_2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Esses sinais foram encontrados para todos os marcadores na linhagem norte e apenas no ND2 para a linhagem sul. Os cenários demográficos simulados que incluíam a presença de expansão populacional após os períodos glaciais não foram rejeitados (Tabela 7), indicando que a diversidade genética atual poderia ser resultado desse processo.

O *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) realizado com os três marcadores apresentou leve aumento na mediana nos períodos recentes (Figura 5), entretanto a distribuição da densidade de probabilidade posterior e o padrão da curva sugeriram cenários de estabilidade populacional. Nas duas análises do EBSP foi possível notar que a largura da estimativa do parâmetro de tamanho populacional aumentou há cerca de 500 mil anos, indicando que os dados são pouco informativos no período. Tal perda de informação pode ser um reflexo da divergência recente das linhagens, que deve ter ocorrido há 600 mil anos atrás (Figura 7, Tabela 5), de forma que ao subdividir os dados para a realização do EBSP a informação referente à população ancestral esteja incompleta em ambas as análises.

Apesar de os modelos de distribuição da espécie no último máximo glacial (UMG) apresentarem maior disponibilidade de áreas para a espécie do que no presente (Figura 6), os cenários demográficos simulados baseados nessa possível distribuição mais ampla no passado foram rejeitados. Incongruências entre dados genéticos e de modelagem ecológica de nicho já foram encontradas em outros estudos com espécies da Mata Atlântica (Thomé *et al.* 2010, Tonini *et al.* 2013) e em geral tem sido atribuídas a problemas nas estimativas baseadas em modelos de circulação atmosférica e oceânica para inferir o clima na região (Cook & Vizy 2006). A modelagem de distribuição de *Proceratophrys boiei* no UMG também apresentava uma área disponível maior que a presente (Amaro *et al.* 2012), o que em conjunto com a ausência de sinal de expansão foi interpretado como indício de estabilidade populacional, já que a distribuição não era menor no UMG como esperado. O cenário demográfico de estabilidade populacional simulado não foi rejeitado (Tabela 7), o que, em conjunto com o EBSP (Figura 5) e o modelo de distribuição sem redução da área de ocorrência durante o UMG (Figura 6) suportam um cenário no qual o tamanho populacional da espécie se manteve constante.

Apesar da congruência espacial com dois dos refúgios descritos por Carnaval e Moritz (2008), o sinal de expansão na linhagem norte, assim como valores mais baixos de diversidade genética no G3PDH e no ODC na mesma região (Tabela 4), é contrário à hipótese

de estabilidade nessa região (Cabanne *et al.* 2008, Carnaval *et al.* 2009). Por outro lado, a não rejeição de cenários de estabilidade (Tabela 7), apesar de ser congruente com o esperado para a linhagem norte, não o é em relação à linhagem sul.

Os cenários demográficos simulados (Tabela 7, Figura 2) também nos permitiram avaliar a dinâmica em cada linhagem além da dinâmica na espécie como um todo. A não rejeição de cenários de expansão e de estabilidade em cada uma das linhagens permite inferir que cenários onde apenas uma das linhagens é estável também são plausíveis, apesar de não terem sido explicitamente testados.

A adição de mais marcadores moleculares independentes pode vir a auxiliar na obtenção de estimativas mais claras acerca dos processos históricos que moldaram a diversidade genética de *H. diops*. A utilização de metodologias que permitem comparar modelos estatisticamente, com o intuito de distinguir dentre os modelos utilizados aquele que melhor explica os dados obtidos, também pode ser uma ferramenta útil na compreensão desses processos (Hickerson *et al.* 2006).

De toda forma, por mais que a população de *H. diops* possa ter se mantido estável ao longo dos últimos milhares de anos, que a espécie consiga ocupar altitudes elevadas na Mata Atlântica e possua, assim como *P. boiei*, uma área de distribuição potencial maior no UMG, a estimativa de tempo de divergência coincidente com o Pleistoceno sugere que mesmo com tolerância ao frio a espécie sofreu efeitos demográficos possivelmente associados às oscilações climáticas. Outros estudos com aves também encontraram divergências pleistocênicas em espécies capazes de ocorrer em montanhas e com padrões filogeográficos diferentes (Cabanne 2007, 2008, Maldonado-Coelho 2012). É possível que diferenças fisiológicas entre aves e anfíbios tenham contribuído para que as predições de Amaro e colaboradores (2012) a cerca dos processos filogeográficos de espécies tolerantes ao frio na Mata Atlântica não sejam aplicáveis às aves.

Outra explicação possível é que, apesar de tempos de divergência coincidentes com o Pleistoceno, eventos que resultaram no surgimento das duas linhagens possam não ser consequência direta dos ciclos glaciais. Dentro desse contexto, é possível que ao invés de um evento vicariante que separe a população em dois refúgios distintos, um evento de dispersão tenha ocorrido através do Rio Doce, possivelmente de um lado para outro do rio.

Um maior conhecimento sobre a ecologia e o nicho das espécies estudadas pode vir a contribuir para o entendimento sobre a origem de padrões filogeográficos distintos em uma região topograficamente complexa como a Mata Atlântica (Wiens 2004, Kozak & Wiens 2007).

DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de contribuir para uma melhor compreensão da história da Mata Atlântica por meio da descrição de padrões de diversidade genética e da inferência de processos históricos. Com base em uma abordagem filogeográfica tentamos descrever a organização da diversidade genética em duas espécies de passeriformes e inferir então os processos históricos que moldaram tal organização. Utilizando modelos ecológicos de nicho tentamos obter informações independentes dos nossos dados genéticos para inferir processos históricos. E com base em simulações coalescentes tentamos testar os processos que poderiam explicar os dados obtidos.

Registramos no primeiro capítulo mais um caso de ausência de estrutura filogeográfica, em uma espécie com biologia reprodutiva complexa. Tal cenário se contrapõe aos resultados obtidos com outros organismos co-distribuídos e que possuem estrutura filogeográfica, suportando a ideia de que os eventos históricos na Mata Atlântica não atuaram de maneira semelhante em todas as espécies.

No segundo capítulo encontramos uma quebra filogeográfica congruente espacial e temporalmente com outros trabalhos, corroborando a importância da região próxima ao Rio Doce nos processos de diversificação recente na Mata Atlântica. Entretanto o impacto dos últimos períodos glaciais na dinâmica populacional da espécie não resultou em informações muito claras.

Apesar de algumas incertezas em relação aos dados de cada uma das espécies aqui estudadas, obtivemos dois padrões distintos, o que é congruente com a complexidade de padrões encontrados em outras espécies, e por sua vez, a complexidade da história do bioma sendo estudado. A adição de marcadores moleculares pode auxiliar em uma melhor compreensão dos processos atuantes em cada espécie, assim como a utilização de diferentes metodologias de análise, como a *Approximate Bayesian computation* (e.g. Hickerson *et al.* 2006) para avaliar os modelos ou a utilização de modelagens coalescentes sob uma hipótese explicitamente espacial (Ray *et al.* 2010). Além disso, a compreensão mais clara a cerca dos processos históricos que moldaram a diversidade do bioma vai exigir também a existência de informações mais detalhadas sobre a biologia das espécies estudadas.

Estudos filogeográficos almejam compreender a distribuição da diversidade genética de uma espécie. E ainda, estudos de organismos co-distribuídos permitem inferir os processos atuantes na história da região de sua ocorrência. Dentro desse contexto o presente trabalho se propôs a estudar a filogeografia de duas espécies de passeriformes endêmicos da Mata Atlântica, *Chiroxiphia caudata* e *Hemitreccus diops*, visando auxiliar na compreensão da evolução da biota neste bioma. Foram utilizados indivíduos amostrados ao longo da distribuição das espécies: 112 de *C. caudata* e 82 de *H. diops*. Foram obtidas sequências parciais do gene mitocondrial ND2 (932 pb e 910 pb, respectivamente para *C. caudata* e *H. diops*), de um íntron do gene G3PDH (303 pb e 323 pb, respectivamente), e de íntrons do gene ODC (517 pb) para *H. diops*. Não foi encontrada estrutura filogeográfica em *C. caudata*, que apresentou sinal de expansão recente. A ausência de estrutura pode ser decorrência do longo tempo de geração da espécie. Modelos de distribuição da espécie durante o último máximo glacial apresentaram dois cenários divergentes, um com distribuição predominantemente ao norte e outro com distribuição similar ou maior que a atual. Em contraste, foi encontrada uma baixa, mas clara estrutura filogeográfica em *H. diops*. Os sinais de alteração demográfica, entretanto, são menos claros, havendo tanto sinal de expansão quanto de estabilidade populacional ao longo dos ciclos glaciais. A diversidade de padrões filogeográficos encontrada na presente Dissertação é congruente com achados sobre a distribuição da diversidade genética de outros organismos da Mata Atlântica, e ultimamente, refletem a complexidade do bioma como um todo.

ABSTRACT

Phylogeographic studies aim to analyze the distribution of the genetic diversity of a given species. In addition, studies of co-distributed organisms enable to infer historic processes acting on the region where they occur. In this context the present work intended to study the phylogeography of two Atlantic Forest endemic birds, *Chiroxiphia caudata* and *Hemitriccus diops* to help to understand how this biome evolved. 112 individuals of *C. caudata* and 82 of *H. diops* were sampled throughout their distributions. We obtained partial sequences of the mitochondrial gene ND2 (932 bp and 910 bp, respectively, for *C. caudata* and *H. diops*), of an intron of the G3PDH gene (303 bp and 323 bp, respectively), and introns from the ODC gene (517 bp) of *H. diops*. No signal of phylogeographic structure was found for *C. caudata*, which exhibits signal of recent demographic expansion. The absence of population structure may be a consequence of the species long generation time. Models of distribution during the last glacial maximum exhibited two discordant scenarios: one with its main distribution in the north and another with a similar or larger distribution than the current one. In contrast, we found a shallow, but clear phylogeographic structure for *H. diops*. The demographic history, however, was not clear, with signal of both demographic expansion and stability during the glacial cycles. The different phylogeographic patterns found here are congruent with the diversity of patterns observed in other Atlantic Forest organisms, reflecting the complex history of the biome.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agne, C. E. 2012. *Filogenia Molecular de Chiroxiphia e Antilophia (Aves: Pipridar)*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Amaral, F. R.; Albers, P. K.; Edwards, S. V. & Miyaki, C. Y. 2013. Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (*Myrmeciza*). *Molecular Ecology* 15: 3996-4013.
- Amaral, F. R.; Piacentini, V. de Q.; Brito, G. R. R. & Curcio, F. F. 2012. A simple and effective air shotgun for collecting small birds and other vertebrates at close range. *Journal of Field Ornithology* 83: 403-406.
- Amaro, R. C.; Rodrigues, M. T.; Yonenaga-Yassuda, Y. & Carnaval, A. C. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 880-888.
- Anderson CNK, Ramakrishnan U, Chan YL and Hadly EA (2005) Serial SimCoal: A population genetic model for data from multiple populations and points in time. *Bioinformatics* 21: 1733-1734.
- Arenas, M.; Ray, N.; Curat, M. & Excoffier, L. 2012. Consequences of range contractions and range shift on molecular diversity. *Molecular Biology and Evolution* 29: 207-218.
- Austerlitz, F.; Jung-Muller, B.; Godelle, B. & Gouyon, P. H. 1997. Evolution of coalescence times, genetic diversity and structure during colonization. *Theoretical Population Biology* 51: 148-164.
- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A. & Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA. Bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Ballard, J. & Whitlock, M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744.
- Bandelt, H.-J.; Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Batalha-Filho, H. 2012. *Padrões e Processos de Diversificação em Aves da Amazônia e da Mata Atlântica*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Batalha-Filho, H.; Cabanne, G. S. & Miyaki, C. Y. 2012. Phylogeography of an Atlantic Forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892-902.

Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177: 19–27.

Behling, H. & Negrelle, R. R. B. 2001. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, Southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research* 56: 383-389.

Bermingham, E. & Moritz, C. 1998. Inferences about the structure and history of populations: Coalescents and intraspecific phylogeography. *Molecular Ecology* 7: 367-369.

Boscolo, D. 2007. *Influência da Estrutura da Paisagem sobre a Persistência de Três Espécies de Aves em Paisagens Fragmentadas da Mata Atlântica*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bruen, T. C.; Philippe, H. & Bryant, D. 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172: 2665–2681.

Bruford, M. W.; Hanotte, O.; Brookfield, J. F. Y. & Burke, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A. R. (editor) *Molecular Genetic Analysis of Populations – a Practical Approach*. Oxford University Press, New York.

Cabanne, G. S. 2009. *Padrões de Distribuição Geográfica de Linhagens Intra-Específicas e Processos Demográficos Históricos em Aves da Floresta Atlântica*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cabanne, G. S.; Santos, F. & Miyaki, C. Y. 2007. Phylogeography and demographic history of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes: Dendrocolaptidae) in the southern Atlantic forest of Brazil and Argentina. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 73-84.

Cabanne, G. S.; Sari, E. H. R.; Meyer, D.; Santos, F. R. & Miyaki, C. Y. 2012. Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish Schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). *Journal of Ornithology* 1-14.

Cabanne, G. S.; Sari, E.H. R.; Santos, F. R. & Miyaki, C. Y. 2008. Areas of endemism and avian diversification in the Atlantic forest: a study with *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae) using nuclear and mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760-773.

Câmara, I. G. 2003. Brief history of conservation in the Atlantic forest. *In*: Galindo-Leal, C & Câmara, I. G. (editores). *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlooks*. CABS and Island Press, Washington.

Carnaval, A. C.; Hickerson, M. J.; Haddad, C. F. B.; Rodrigues, M. T. & Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785-789.

Carnaval, A. C. & Moritz, C. 2008. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.

Collins, W. D.; Bitz, C. M.; Blackmon, M. L.; Bonan, G. B.; Bretherton, C. S.; Carton, J. A.; Chang, P.; Doney, S. C.; Hack, J. J.; Henderson, T. B.; Kiehl, J. T.; Large, W. G.; McKenna, D. S.; Santer, B. S. & Smith, R. S. 2006. The Community Climate Model version 3 (CCSM3). *Journal of Climate* 19: 2122-2143.

Conservation Internacional do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/Instituto Estadual de Florestas-MG, 2000. *Avaliação e Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos*. MMA/SBF, Brasília.

Cook, K. H. & Vizy, E. K. 2006. South American climate during the Last Glacial Maximum: delayed onset of the South American monsoon. *Journal of Geophysical Research* 111. doi:10.1029/2005JD005980.

Crisci, J. V.; Katinas, L. & Posadas, P. 2003. *Historical Biogeography: An Introduction*. Harvard University Press, Cambridge.

del Hoyo, J.; Elliott, A.; & Christie, D. (editors.). 2004. *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 9: Cotingas to Pipits and Wagtails. Linx Edicions, Barcelona.

Desjardins, P. & Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212: 599-634.

d'Horta, F. M. 2008. *Filogenia Molecular e Filogeografia de Espécies de Passeriformes (Aves): História Biogeográfica da Região Neotropical com ênfase na Floresta Atlântica*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

d'Horta, F. M.; Cabanne, G. S.; Meyer, D. & Miyaki, C. Y. 2011. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1923-1935.

Drummond, A. J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.

Drummond, A. J.; Rambaut, A.; Shapiro, B. & Pybus, O. G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185-1192.

Edwards, S. V. & Beerli, P. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54: 1839-1854.

Ellegren, H. 2007. Molecular evolutionary genomics of birds. *Cytogenetic and Genome Research* 117: 120-130.

Emerson, B. C.; Paradis, E. & Thébaud, C. 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology, Evolution and Systematics* 16: 707-716.

Excoffier, L.; Foll, M. & Petit, R. J. 2009. Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 481-501.

Excoffier, L. & Lischer, H.E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Excoffier L, Novembre J & Schneider S (2000) SIMCOAL: a general coalescent program for simulation of molecular data in interconnected populations with arbitrary demography. *Journal of Heredity* 91: 506-509.

Excoffier, L.; Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Felsenstein, J. & Churchill, G. A. 1996. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution* 13: 93-104.

Fischer, G. A. 1960. Latitudinal variations in organic diversity. *Evolution* 14: 64-81.

Fitzpatrick, J. W. 2004. Family Tyrannidae (Tyrant-Flycatchers). In: del Hoyo, .; Elliott, A.; & Christie, D. (eds.). *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 9: Cotingas to Pipits and Wagtails. Linx Edicions, Barcelona.

Fjeldså, J.; Bowie, R. C. K. & Rahbek, C. 2012. The role of mountain ranges in the diversification of birds. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 43: 249-265.

Foster, M. S. 1981. Cooperative behavior and social organization of the swallow-tailed manakin (*Chiroxiphia caudata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 9: 167-177.

- Francisco, M. R.; Gibbs, H. L.; Galetti, M.; Lunardi, V. & Galetti Jr., P. 2007. Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 16: 4908-4918.
- Friesen, V. L.; Congdon, B. C.; Kidd, M. G. & Birt, T. P. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five introns in vertebrates. *Molecular Ecology* 8: 2147-2149.
- Friesen, V. L.; Congdon, B. C.; Walsh, H. E. & Birt, T. P. 1997. Intron variation in marbled murrelets detected using analyses of single-stranded conformational polymorphisms. *Molecular Ecology* 11: 1047-1058.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Giannini, T. C.; Chapman, D. S.; Saraiva, A. M.; Alves-dos-Santos, I. & Biesmeijer, J. C. 2012. Improving species distribution models using biotic interactions: a case study of parasites, pollinators and plants. *Ecography* 35: 001–008.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 15: 3969–3982.
- Haffer J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131–137.
- Hasegawa, M.; Kishino, K. & Yano, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Heled, J. & Drummond, A. J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology* 8: 289.
- Heller, R.; Chikhi, L. & Siegismund, H. R. 2013. The confounding effect of population structure on Bayesian Skyline Plot inferences of demographic history. *PLOS One* 8: e62992.
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt, G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- Hewitt, G. M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 359: 183-195.

Hey, J. & Nielsen, R. 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of National Academy of Science* 104: 2785–2790.

Hickerson, M. J.; Dolman, G. & Moritz, C. 2006. Comparative phylogeographic summary statistics for testing simultaneous vicariance. *Molecular Ecology* 15: 209–223.

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

Hijmans, R. J.; Cameron, S. E.; Parra, J. L.; Jones, P. G. & Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.

Hijmans, R. J., Guarino, L., Cruz, M., & Rojas, E. (2001). Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 15–19.

Ho, S. Y. W. & Shapiro, B. 2011. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources* 11: 423–434.

Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6: 65–70.

Huson, D. H. & Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.

Hutchison, D. W. & Templeton, A. R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 1898–1914.

Jensen, J. L.; Bohonak, A. J., & Kelley, S. T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6.

Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78: 454–458.

Kingman, J. F. C. 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications* 13: 235–248.

Knowles, L. L. 2009. Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 593–612.

Kozak, K. H. & Wiens, J. J. 2007. Does niche conservatism promote speciation? A case study in North American salamanders. *Evolution* 60: 2604–2621.

Kuhner, M. K. 2006. LAMARC 2.0: Maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics Applications Note* 22: 768–770.

Ledru, M.-P.; Rousseau, D.-D.; Cruz Jr., F. W.; Riccomini, C.; Karmann, I. & Martin, L. 2005. Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research* 64: 444–450.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

Lomolino, M. V., Riddle, B. R., Whittaker, R. J. & Brown, J. H. (2010). *Biogeography*. 4ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

Maldonado-Coelho, M. 2012. Climatic oscillations shape the phylogeographical structure of Atlantic Forest fire-eye antbirds (Aves: Thamnophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 105: 900–924.

Maldonado-Coelho, M.; Blake, J. G.; Silveira, L. F.; Batalha-Filho, H. & Ricklefs, R. E. 2013. Rivers, refuges and population divergence of fire-eye antbirds (*Pyriglena*) in the Amazon basin. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 1090–1107.

Mardulyn, P. 2012. Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Molecular Ecology* 14: 3385–90.

Marini, M. A. & Hackett, S. J. 2002. A multifaceted approach to the characterization of an intergeneric hybrid manakin (Pipridae) from Brazil. *The Auk* 119: 1114–1120.

McDonald, D. B. 1993. Demographic consequences of sexual selection in the long-tailed manakin. *Behavioral Ecology* 4: 297–309.

Mindell, D. P.; Sorenson, M. D. & Dimcheff, D. E. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 10693–10697.

Mittermeier, R. A.; Gil, P. R.; Hoffmann, M.; Pilgrim, J.; Brooks, J.; Mittermeier, C. G.; Lamourux, J. & Fonseca, G. A. B. 2005. *Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*. Cemex, Washington.

Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene tree versus nuclear-gene tree. *Evolution* 49: 718–726.

Moritz, C. & Faith, D. P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419–429.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; da Fonseca, G. A. B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.

Myers, A. A. & Giller, P. S. 1988. Process, pattern and scale in biogeography. In Myers, A. A. & Giller, P. S. (editors.). *Analytical Biogeography. An Integrated Approach to the Study of Animal and Plant Distributions*. Chapman and Hall, London.

Nichols, R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 358-364.

Nordborg, M. Coalescent Theory. In: Balding, D. J.; Bishop, M. & Cannings, C. (editores). *Handbook of Statistical Genetics*. 3ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

Ohlson, J.; Fjeldså, J. & Ericson, P. G. P. 2008. Tyrant flycatchers coming out in the open: phylogeny and ecological radiation on Tyrannidae (Aves, Passeriformes). *Zoologica Scripta* 37: 315-335.

Oliveira-Filho, A. T. & Fontes, M. A. L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.

Paithankar, K. R. & Prasad, K. S. 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research* 19: 1346.

Parker III, T. A.; Stotz, D. F. & Fitzpatrick, J. W. Ecological and Distributional Databases. In: Stotz, D. F.; Fitzpatrick, J. W.; Parker III, T. A. & Moskovits, D. K. 1996. *Neotropical Birds: Ecology and Conservation*. The University of Chicago Press, Chicago.

Paynter Jr., R. A. & Traylor Jr., 1991. *Ornithological Gazetteer of Brasil*. (2 vols.) Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge.

Pellegrino, K. C. M.; Rodrigues, M. T.; Waite, A. N.; Morando, M.; Yassuda, Y. Y. & Sites, J. W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13-26.

Peter, B. M.; Wegmann, D. & Excoffier, L. 2010. Distinguishing between population bottleneck and population subdivision by a Bayesian model choice procedure. *Molecular Ecology* 19: 4648-4660.

Petit, J. R.; Jouzel, J.; Raynaud, D.; Barkov, N. I.; Barnola, J. M.; Basile, I.; Bender, M.; Chappellaz, J.; Davisk, M.; Delaygue, G.; Delmotte, M.; Kotlyakov, V. M.; Legrand, M.; Lipenkov, V. Y.; Lorius, C.; Pépin, L.; Ritz, C.; Saltzmank, E. & Stievenard, M. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399: 429-436.

Phillips, S. J.; Anderson, R. P. & Schapire, R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modeling* 190: 231-259.

- Phillips, S. J.; Dudík, M.; Elith, J.; Graham, C. H.; Lehmann, A.; Leathwick, J. & Ferrier, S. 2009. Sample selection bias and presence-only distribution models: implications for background and pseudo-absence data. *Ecological Applications* 19: 181–197.
- Porto, T. J.; Carnaval, A. C. & Rocha, P. L. B. 2012. Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. *Diversity and Distribution*. doi: 10.1111/j.1472-4642.2012.00944.x.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 2001a. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37-45.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 2001b. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution* 18: 897-906.
- Pruett, C. L. & Winker, K. 2005. Northwestern song sparrow populations show genetic effects of sequential colonization. *Molecular Ecology* 14: 1421-1434.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.4 (acessado em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> no dia 11 de março de 2011).
- Ramos-Onsins, S. E. & Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- Ray, N.; Currat, M.; Foll, M. & Excoffier, L. 2010. SPLATCHE2: A spatially explicit simulation framework for complex demography, genetic admixture and recombination. *Bioinformatics Applications Note* 26: 2993–2994.
- Ribas, C. G.; Gaban-Lima, R.; Miyaki, C. Y. & Cracraft, J. 2005. Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography* 32: 1409-1427.
- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J. & Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141-1153.
- Ridley, M. 2006. *Evolução*. 3ed. Artmed, Porto Alegre.
- Rodríguez, F.; Oliver, J. F.; Marín, A. & Medina, J. R. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142:485-501.
- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology* 17: 2722–2729.

Sætre, G.-P. & Sæther, S. A. 2010. Ecology and genetics of speciation in *Ficedula* flycatchers. *Molecular Ecology* 19: 1091–1106.

Santana, C. R. & dos Anjos, L. 2010. Associação de aves a agrupamentos de bambu na porção Sul da Mata Atlântica, Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Biota Neotropica* 10: 39–44.

Soberón, J. & Nakamura, M. 2009. Niches and distributional areas: Concepts, methods. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 19644–19650.

Soderstrom, T. R.; Judziewicz, E. J. & Clark, L. G. 1987. Distribution patterns of Neotropical bamboos. In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (editors.). *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

Smith, B. T.; Bryson Jr., R. W.; Houston, D. D. & Klicka, J. 2012. An asymmetry in niche conservatism contributes to the latitudinal species diversity gradient in New World vertebrates. *Ecology Letters* 15: 1318–1325.

Snow, D. W. 2004. Family Pipridae (Manakins). In: del Hoyo, J.; Elliott, A.; & Christie, D. (editors.). *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 9: Cotingas to Pipits and Wagtails. Linx Edicions, Barcelona.

Sorenson, M. D.; Ast, J. C.; Dimcheff, D. E.; Yuri, T. & Mindell, D. P. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 105–114.

Stephens, M.; Smith, N. J. & Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978–989.

Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437–460.

Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

Thomé, M. T. C.; Zamudio, K. R.; Giovanelli, J. G. R.; Haddad, C. F. B.; Baldissera Júnior, F. A. & Alexandrino, J. 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene

persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018-1031.

Tonini, J. F. R.; Costa, L. P. & Carnaval, A. C. 2013. Phylogeographic structure is strong in the Atlantic Forest; predictive power of correlative paleodistribution models, not always. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. doi 10.1111/jzs.12014.

Uezu, A.; Metzger, J. P. & Vielliard, J. M. E. 2005. Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. *Biological Conservation* 123: 507-519.

Valdez, L. & D'Elía, G. 2013. Differentiation in the Atlantic Forest: Phylogeography of *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae) and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia. *Journal of Mammology* 94: 911-922.

Vanzolini, P. E. 1992. Paleoclimas e especiação em animais da América do Sul tropical. *Estudos Avançados* 6:41-65.

Vanzolini PE, Williams EE. 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: iguanidae). *Arquivos de Zoologia (São Paulo)* 19: 1–298.

Voight, B. F.; Adams, A. M.; Frisse, L. A.; Qian, Y.; Hudson, R. R. & Di Rienzo, A. 2005. Interrogating multiple aspects of variation in a full resequencing data set to infer human population size changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 18508–18513.

Wakeley, J. 2003. Inferences about the structure and history of populations: coalescents and intraspecific phylogeography. In: Singh, R. S. & Uyenoyama, M. K. (eds.). *The Evolution of Population Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.

WanDerVal, J.; Shoo, L. P.; Graham, C. & Williams, S. E. 2009. Selecting pseudo-absence data for presence-only distribution modeling: How far should you stray from what you know? *Ecological Modelling* 220: 589–594.

Weber, S.; Drijhout, S.; Abe-Ouchi, A.; Crucifix, M.; Eby, M.; Ganopolski, A.; Murakami, S.; Otto-Bliesner, B. & Peltier, W. R. 2007. The modern and glacial overturning circulation in the Atlantic Ocean in PMIP coupled model simulations. *Climate of the Past* 2: 923-949.

Weir, J. T. 2006. Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland neotropical birds. *Evolution* 60: 842-855.

Weir, J. T. 2009. Implications of genetic differentiation in neotropical montane forest birds. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 410-433.

Weir, J. T. & Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17: 2321-2328.

Wiens, J. J. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58: 193-197.

Zink, R. M. & Barrowclough, G. F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* 9: 2107-2121.