

André Murilo Magro Freddi

Sistemática molecular e biogeografia
histórica do gênero *Aratinga* (Psittacidae,
Aves)

Molecular systematics and historical
biogeography of genus *Aratinga*
(Psittacidae, Aves)

São Paulo

2012

André Murilo Magro Freddi

Sistemática molecular e biogeografia
histórica do gênero *Aratinga* (Psittacidae,
Aves)

Molecular systematics and historical
biogeography of genus *Aratinga*
(Psittacidae, Aves)

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em 2012, na Área de Genética e
Biologia Evolutiva.

Orientador(a): Cristina Yumi
Miyaki

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Freddi, André Murilo Magro
Sistemática molecular e
biogeografia histórica do gênero
Aratinga (Psittacidae, Aves)
Número de páginas: 80

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

1. Gênero *Aratinga* 2. Sistemática
Molecular da tribo Arini 3. Biogeografia
4. Biogeografia neotropical
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).

Orientador(a)

À Lu, eterna companheira de minha vida,
Aos meus pais, meu irmão e toda minha família.

“Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution”

Theodosius Dobzhansky, 1973.

Agradecimentos

À professora Dra. Cristina Yumi Miyaki pela orientação, toda a ajuda com discussões sobre o trabalho e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao Fábio S. R. do Amaral por toda a ajuda com as filogenias, com as datações, com discussões enriquecedoras sobre sistemática, pela paciência para me ajudar no lab, responder mensagens tarde da noite no gtalk, assim como pela amizade e as muitas risadas.

À Erika S. Tavares por toda a ajuda com os métodos do trabalho, assim como com discussões sobre as datações moleculares.

Ao Henrique Batalha Filho pela ajuda com as datações moleculares, assim como discussões, assim como ajuda no sequenciamento e na purificação das PCRs e também pela amizade.

À Adriana R. Oliveira-Marques pela ajuda no laboratório, pela amizade e por nos trazer o Lino.

Ao Danilo A. Rufo pela ajuda no laboratório, pelas inúmeras PCRs tiradas dos termocicladores, assim como pelas muitas risadas e a amizade.

Ao Marcos M. Coelho pela ajuda a rodar as análises de Máxima Verossimilhança no RAxML e também pela amizade.

A todos os outros amigos e companheiros de laboratório: Ana Cris, Carol, Cibele, Ricardo, Tiago; pela ajuda no laboratório, discussões enriquecedoras e também pela amizade.

À Flávia Presti que me ajudou no momento em que entrei no laboratório, com paciência e atenção.

A todos que contribuíram com amostras para realizar o trabalho: Criadouro Stanislau, Criadouro de Aluísio, African Safari Zoo, Colina dos Aragaris, Rio Zoo, Zoológico de Sorocaba, professor Dr. Luís Fábio Silveira, Parque Zoológico Quinzinho de Barros, Criadouro Carlos Isoldi, Paulo Martuscelli e Carlos Yamashita, Edislane Barreiros de Souza, Ademar Marra, Michael Braun e o professor Dr. Michael Wink.

À Lynx Edicions pela permissão de uso das imagens de psitacídeos do Handbook.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por me conceder a bolsa de mestrado para realizar esse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desse trabalho.

À professora Dra. Maria Rita S. P. Bueno por permitir o uso de sua centrífuga de placas, assim como a todos os seus alunos, pelo auxílio no uso do equipamento.

A todos os professores e colegas do IB pelo enriquecimento de meus conhecimentos durante o mestrado.

A todos os funcionários do IB, pela sua atuação essencial para manter este Instituto funcionando.

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Biodiversidade e Computação da Universidade de São Paulo (NAP BioComp).

À Luana por todo o amor, o apoio, a ajuda com tudo e a paciência de ouvir sobre filogenias de aves.

Aos meus pais, meu irmão e toda a minha família pelo apoio e carinho durante todo o mestrado.

Índice

Resumo	01
Abstract	02
1. Introdução	03
1.1. Sistemática Filogenética	03
1.2. Métodos de Sistemática Molecular	04
1.3. Métodos de Datação Molecular	09
1.4. Família Psittacidae	10
1.5. Gênero <i>Aratinga</i>	12
1.6. Origem e biogeografia de Psittaciformes	24
1.7. Biogeografia neotropical	29
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Amostras utilizadas	31
3.2. Genes analisados	34
3.3. Extração e purificação do DNA	35
3.4. Amplificação do DNA	36
3.5. Sequenciamento do DNA amplificado	38
3.6. Alinhamento das sequências	38
3.7. Seleção dos modelos evolutivos	39
3.8. Análises por Máxima Verossimilhança (MV)	39
3.9. Análises Bayesianas	39
3.10. Datação Molecular	40
3.11. Análises de Reconstrução de Área Ancestral	41
4. Resultados	42
4.1. Análise das Sequências	42
4.2. Análises Filogenéticas	43
4.2.1 Análises de Máxima Verossimilhança	44
4.2.2 Análises Bayesianas	46
4.3. Datação Molecular	49
5. Discussão	53
5.1. Sistemática do gênero <i>Aratinga</i>	53
5.2. Datas de divergência e Biogeografia do gênero	55
6. Conclusões	66
7. Referências Bibliográficas	67
Anexo I: Tabela de distância-p mitocondrial	79

Resumo

A família Psittacidae possui 332 espécies de papagaios, periquitos e afins, e os táxons Neotropicais formam um grupo monofilético (tribo Arini), dentro desta tribo está o gênero *Aratinga*. A sistemática deste gênero é mal resolvida, com poucos estudos morfológicos e algumas filogenias moleculares que apontam que não seja monofilético. Porém, é preciso destacar que esses estudos não amostraram uma quantidade representativa de espécies do gênero, o que deixa essas relações incertas. Para melhor compreender a história evolutiva do gênero *Aratinga*, realizamos uma análise filogenética com 21 das 22 espécies do gênero, o táxon monotípico *Nandayus nenday* que é proximamente relacionado a algumas espécies de *Aratinga* e representantes de outros gêneros da tribo Arini. Foram sequenciados cinco genes mitocondriais (12S, 16S, citocromo b, NADH2, COIII) e um nuclear (RAG-1). As filogenias obtidas por máxima verossimilhança e análise Bayesiana foram congruentes e indicam a ausência de monofilia do gênero *Aratinga*. A maioria das espécies do gênero foi posicionada em três clados com alto suporte, mas que não se apresentam agrupados em um clado monofilético. Estes três clados são congruentes com grupos previamente propostos com base em caracteres morfológicos. *Nandayus nenday* está dentro de um destes clados, que é grupo irmão de um clado que contém outros quatro gêneros da tribo Arini. A única espécie que não foi incluída em nenhum destes clados é *Aratinga acuticaudata*, que aparentemente é mais proximamente relacionada aos gêneros *Diopsittaca* e *Guarouba*. A maioria dos eventos de divergência das espécies do gênero *Aratinga* nesses diferentes clados parece ter ocorrido nos últimos 5 milhões de anos (Ma.). Enquanto as estimativas de datas de divergências entre os principais clados sugerem que elas ocorreram durante o Mioceno inicial. O padrão biogeográfico da diversificação dos clados de *Aratinga* foi complexo, possivelmente relacionado com o soergimento dos Andes, com múltiplas colonizações da América Central antes e depois do fechamento do Istmo do Panamá e com ciclos glaciais do Pleistoceno. Esses resultados refutam a monofilia do gênero e uma revisão taxonômica do táxon parece ser necessária.

Abstract

Family Psittacidae includes 332 species of parrots and all Neotropical taxa form a monophyletic group (tribe Arini), among those, is the parakeet genus *Aratinga*. This genus has an unresolved systematics, with few morphological studies and some molecular phylogenies suggest that it is not monophyletic. However, these phylogenies did not include a representative sample of species of the genus. To better understand the evolutionary history of genus *Aratinga*, we conducted a phylogenetic analysis that included 21 of 22 species of the genus, the monospecific taxon *Nadayus nenday* that is closely related to some *Aratinga* species, plus various taxa from tribe Arini. We sequenced five mitochondrial (12S, 16S, cytochrome b, NADH2, COIII) and one nuclear (RAG-1) genes. The phylogenies were reconstructed based on maximum likelihood analysis and Bayesian inference. Relaxed molecular clock estimates were conducted under a Bayesian analysis for inferring the divergence times of the phylogeny and to study the biogeographic history of these species. The phylogenies recovered by both methods were highly congruent and support the absence of monophyly for genus *Aratinga*. The majority of the species from the genus *Aratinga* was placed in three highly supported clades that did not group in a monophyletic clade. These three clades match previously suggested groups based on morphological characters. *Nandayus nenday* was included in one of these clades, that is closely related to a clade that contains four other Arini genera. The only species that was not included in any of these clades was *Aratinga acuticaudata*, that seems to be more closely related to the genera *Diopsittaca* and *Guarouba* with high support values. Most of the speciation within the *Aratinga* clades may have occurred during the last 5 Mya., but the divergence times between these clades seems to have occurred during the early Miocene. The biogeographic pattern of the diversification of the *Aratinga* clades was complex, possibly related to the history of the Andes, multiple colonization of Central America before and after the closure of the Panama Isthmus and also Pleistocene glacial cycles. These results further refute the monophyly of genus *Aratinga* and a taxonomical revision may be necessary for the taxon.

1. Introdução

1.1 Sistemática Filogenética

A idéia central da biologia evolutiva, introduzida por Darwin em 1859 em sua obra *The Origins of Species*, é que todas as espécies, apesar de suas diferenças, são geradas por descendência com modificação a partir de ancestrais comuns (Baum *et al.*, 2005). A árvore filogenética, ou filogenia, é o diagrama ramificado que representa as relações de ancestralidade entre diferentes espécies (Ridley, 2004) e o método usado na inferência dessas árvores, assim com a interpretação da informação que essas árvores nos trazem, é de suma importância. Para a sistemática filogenética, a classificação biológica deve refletir relações de parentesco entre as espécies, evidenciadas por uma hipótese filogenética explícita, uma filogenia (Amorim, 2002).

O grande marco do pensamento evolutivo da sistemática filogenética se deu com a publicação do livro *Phylogenetic Systematics* por Willi Hennig em 1966, em que o autor propõe um método de inferência de árvores filogenéticas, assim como uma base teórica para a interpretação das relações obtidas nas árvores inferidas (Amorim, 2002). Nesse contexto, o autor definiu o conceito de grupo monofilético, que é “um conjunto de espécies incluindo uma ancestral e todas as suas espécies descendentes”, que pode ser definido também como um agrupamento de espécies descendentes de uma espécie ancestral comum e exclusiva (Amorim, 2002), ou seja, uma linhagem evolutiva única, que possui uma história exclusiva. Logo, diversos tipos de agrupamentos taxonômicos feitos com base em morfologia, levaram à formação de diversos grupos não monofiléticos, que não refletem uma relação de parentesco mais próxima entre as espécies agrupadas. Por exemplo: “Pisces” representa um grupo não monofilético, visto que pelas análises filogenéticas mais recentes, os Sarcopterygii incluem os Tetrapoda, sendo a inclusão de Tetrapoda no táxon “Pisces” necessária para tornar este monofilético; “Reptilia” também é um grupo não monofilético, visto que Crocodylomorpha forma um grupo monofilético com Aves, os Archosauria, o que faria a inclusão de Aves em “Reptilia” necessária para tornar este monofilético (Amorim, 2002). Atualmente na sistemática filogenética, devem ser aceitos preferencialmente grupos monofiléticos na classificação e por causa disso, diversos trabalhos de

sistemática filogenética têm proposto alterações na classificação, com base nas filogenias encontradas (Helbig *et al.*, 2005; Amaral *et al.*, 2009; Benz e Robbins, 2011).

Em um artigo de 2008, Omland e colaboradores discutem a importância do pensamento evolutivo filogenético para toda a biologia. Deve-se tomar um cuidado especial no momento de interpretar uma análise filogenética com a noção de uma escala do progresso da vida. Os autores apontam que isso é verificado praticamente para todos os campos da biologia, em muitos trabalhos nos mais diversos tipos de revistas científicas, inclusive de alto impacto, o que torna esse um problema global da biologia. Os autores defendem que nenhum táxon vivo pode ser considerado ancestral ou derivado, pois isso inevitavelmente reflete à escala do progresso. Esses táxons são todos contemporâneos, logo, podemos somente definir estados ancestrais e derivados dos caracteres com base na filogenia, o que não implica que um organismo com um caractere ancestral ser “menos evoluído” que um organismo com a forma derivada, pois todas as espécies viventes são formadas por um misto de caracteres derivados e ancestrais.

A inferência filogenética foi feita inicialmente com base em dados morfológicos de espécies viventes e fósseis, porém atualmente emprega-se cada vez mais a análise de dados moleculares na construção de filogenias, com diversos métodos para encontrar a hipótese que melhor explica a história evolutiva de um determinado grupo de organismos (Ridley, 2004).

1.2 Métodos de Sistemática Molecular

Diversos métodos podem ser empregados na inferência filogenética a partir de um conjunto de dados. Dentre os principais métodos utilizados, estão a parcimônia, os métodos de distância e os métodos estatísticos (Nei e Kumar, 2000). Esses métodos podem ser aplicados a dados moleculares (sequências de DNA e de aminoácidos) e a dados morfológicos. Aqui vamos abordar somente o uso dessas metodologias com dados de sequências de DNA.

Os primeiros métodos de inferência de hipóteses filogenéticas foram os métodos de máxima parcimônia, devido a seu princípio simples e aplicável a sistemas biológicos em geral e também de sua rápida computação. Ele se baseia no princípio da parcimônia, pela qual a explicação mais aceita é a que

necessita do menor número de mudanças, ou seja, o menor número de alterações (no nosso caso, mudanças nucleotídicas; Felsenstein, 2004). Logo, quando utilizamos o método de parcimônia para inferir relações filogenéticas, o objetivo é encontrar a árvore com menor número de passos (mudanças nucleotídicas).

Nos métodos de distância, inicialmente as distâncias entre cada par de táxons analisados são calculadas assumindo um modelo evolutivo de substituição nucleotídica. Essa matriz de distância é então utilizada na obtenção da árvore (Nei e Kumar, 2000). Existem diversos métodos de agrupamento baseados em distância e, em geral, são relativamente eficientes na reconstrução de árvores (Felsenstein, 2004).

Há vários modelos de substituição nucleotídica que podem ser organizados hierarquicamente com o aumento de parâmetros considerados. Dentre os mais simples, está o de Jukes e Cantor (1969) que considera que a taxa de substituição nucleotídica é a mesma para todas as alterações possíveis, havendo a mesma probabilidade de ocorrência para todos os nucleotídeos (Pereira *et al.*, 2001). Outros modelos, como o de Hasegawa e colaboradores (1984, 1985) e o de Felsenstein (1981), consideram que taxas de transição e transversão podem ser diferentes e que a frequência das bases não é igual, o que, em geral, é mais próximo da realidade (Pereira *et al.*, 2001). O modelo mais complexo é o Modelo Geral de Reversão ao Longo do Tempo (Rodriguez *et al.*, 1990), que considera taxas de substituição nucleotídica independentes para cada alteração, de acordo com a frequência e a taxa de substituição encontradas. O uso desses modelos pode ajudar a diminuir o efeito negativo de altas taxas de substituição nucleotídica que podem resultar em múltiplas substituições em um mesmo sítio. Assim, métodos de inferência filogenética que modelam substituições nucleotídicas podem superar esses problemas (Huelsenback *et al.*, 2001).

Os métodos estatísticos para inferência filogenética mais utilizados atualmente são: o de máxima verossimilhança e a análise Bayesiana. No método de máxima verossimilhança, é definido *a priori* um modelo evolutivo de substituição nucleotídica ao qual os dados melhor se adéquam, o que acomoda a variação encontrada na matriz de dados (Felsenstein, 2004). Esse método utiliza o cálculo da verossimilhança (L) segundo a fórmula: $L = \text{Prob}(D/T)$, que

calcula a probabilidade de os dados (D) explicarem a hipótese testada (a árvore, T), de acordo com o modelo de substituição nucleotídica selecionado. A análise é feita para cada um dos sítios separadamente, sendo que a somatória desses valores de toda a matriz corresponde à verossimilhança da árvore analisada. A árvore que maximiza a verossimilhança é então selecionada com base em buscas heurísticas, que utilizam rearranjos a partir de uma árvore inicial aleatória para acelerar o procedimento (Nei e Kumar, 2000). Como o número de árvores possíveis cresce de maneira exponencial com os táxons analisados (por exemplo, o número aproximado de árvores enraizadas bifurcantes para 20 táxons é de 10^{22} ; Felsenstein, 2004), inferir a árvore mais provável analisando todas as árvores possíveis é um procedimento matematicamente impraticável atualmente, principalmente quando são analisados muitos táxons, o que torna necessário o uso de algoritmos que aceleram o processo, com aproximações das estimativas que reduzem muito o tempo de computação (Felsenstein, 2004).

Além da reconstrução da hipótese filogenética, é necessário estimar o suporte estatístico das relações encontradas na árvore inferida. Uma maneira de avaliar o suporte de ramos de topologias obtidas por máxima parcimônia, distância e máxima verossimilhança é o uso de *bootstrap* não paramétrico (Felsenstein, 1985). O *bootstrap* se baseia na reamostragem aleatória dos sítios da matriz de sequência de dados original, sendo que alguns sítios podem ser amostrados mais de uma vez e outros podem não ser amostrados. A nova matriz de dados gerada, com o mesmo tamanho da matriz original, é então utilizada para inferir uma nova árvore filogenética, utilizando o mesmo método de inferência. Esse processo é repetido centenas de vezes, sendo que a cada repetição a árvore produzida é armazenada e com base nessas árvores é calculada a porcentagem de vezes que um ramo da árvore original se manteve nas réplicas. Esse é o valor de *bootstrap*, que indica o suporte estatístico da relação sustentada pelo nó, de acordo com a matriz de dados (Felsenstein, 2004). O processo de reamostragem por *bootstrap* não-paramétrico requer bastante tempo computacional, principalmente no caso do método de máxima verossimilhança, já que todo o processo de inferência da árvore que maximiza a verossimilhança é repetido centenas de vezes. Diversos métodos para acelerar o processo de inferência da árvore de máxima verossimilhança, assim

como as análises de *bootstrap* foram desenvolvidos nos últimos anos (*PHYML*: Guindon e Gascuel, 2003; Guindon *et al.*, 2010; e *RAxML* Stamatakis *et al.* 2005; Stamatakis, 2006). Um método de inferência rápida muito utilizado atualmente é o *Randomized Axelerated Maximum Likelihood* (RAxML), que utiliza um algoritmo com diversos mecanismos que aceleram em muito a inferência da árvore, sem prejudicar a precisão da análise (Stamatakis *et al.*, 2005). Para resolver o problema do tempo necessário para realizar o *bootstrap*, os autores desenvolveram um *bootstrap* heurístico (*rapid bootstrap*), que acelera até em 500 vezes o processo de reamostragem, quando comparado a métodos tradicionais (Stamatakis *et al.*, 2008). Esse algoritmo de inferência mais rápida de verossimilhança (RAxML) e o seu método de *rapid bootstrap* associado, também tem vantagens sobre outros métodos de inferência rápida, não só por ser mais rápido, mas também por executar uma análise mais exaustiva nas regiões com árvores mais prováveis do espaço probabilístico de árvores, o que resulta em uma árvore final com valores mais altos de verossimilhança (Stamatakis *et al.*, 2005).

O método Bayesiano de análise filogenética leva em conta os conceitos estatísticos de probabilidade primária e probabilidade posterior. A probabilidade primária é a probabilidade anterior à coleta dos dados de cada árvore ser a melhor. Como em geral não se conhece qual seria a melhor árvore, se assume a mesma probabilidade para todas as possíveis árvores. Já a probabilidade posterior é calculada baseada na probabilidade primária e na verossimilhança das árvores encontradas (Huelsenbeck *et al.*, 2001). A análise de cada árvore inclui o cálculo de todas as combinações de tamanho de ramo e valores de parâmetros do modelo de substituição nucleotídica ao qual os dados melhor se adequam e definido *a priori*.

Atualmente é impossível realizar esse processo analiticamente, logo é realizada uma aproximação da probabilidade posterior usando métodos como o a Cadeia Markov de Monte Carlo (MCMC), que utiliza o principal algoritmo utilizado para análises Bayesianas atualmente, o algoritmo Metropolis. Esse algoritmo inicia a análise com uma árvore aleatória (T_i), em seguida é sorteada uma árvore vizinha (T_j) no espaço probabilístico de árvores. As probabilidades de cada árvore são calculadas e a razão dessas probabilidades é estimada (T_j/T_i). Se esta razão for maior ou igual a 1, a nova árvore é aceita como árvore

atual. Caso o valor seja menor que 1, é sorteado um número entre 0 e 1, e se este for inferior ao valor da razão, a nova árvore é aceita como árvore atual. Caso o valor seja maior que a razão, a árvore vizinha é rejeitada e a árvore inicial é considerada novamente a árvore sob análise. A partir dessa árvore atual novamente se escolhe uma árvore vizinha no espaço de probabilístico de árvores e o processo se reinicia. A tendência desse processo é que árvores com probabilidades cada vez maiores serão escolhidas, porém, por eventualmente aceitar árvores com menores probabilidades, o processo não fica preso a em uma região subótima de probabilidade no espaço de árvores possíveis, o que permite que o método selecione com maior precisão as melhores árvores no espaço de árvores possíveis (Felsenstein, 2004).

Esse processo é infinito e segue em cadeia com milhões de gerações, até que um platô de árvores igualmente prováveis seja atingido. É preciso lembrar que as condições da análise são definidas pelo pesquisador: o número de gerações da cadeia, assim como o intervalo entre essas em que as árvores amostradas serão armazenadas para o universo de árvores finais selecionadas (por exemplo, normalmente se define uma análise com 10 milhões de gerações, em que a cada mil gerações as estatísticas da árvore analisada e a topologia da árvore são armazenadas, resultando em um universo de árvores finais de 10 mil árvores). Outro ponto importante é que geralmente a análise é feita em duas ou mais corridas independentes, cada uma com um número de cadeias de Markov executadas. É verificada se há uma convergência entre essas corridas independentes, que se originaram de diferentes pontos do espaço probabilístico de árvores possíveis, o que é um forte indicativo de que o platô de árvores de maior probabilidade foi atingido na análise. A partir desse universo de árvores selecionadas, é feito um *burnin* para excluir as primeiras árvores armazenadas (que correspondem ao início do processo, quando as probabilidades ainda não atingiram o platô) e, com o restante das árvores, é construída uma árvore consenso (Felsenstein, 2004).

A proporção de vezes (gerações) que um determinado ramo da árvore é observado no universo de árvores após a remoção do *burnin* é considerada como uma aproximação válida de sua probabilidade posterior. Essa probabilidade posterior, também encontrada para cada ramo da árvore consenso, é uma medida da sustentação dos ramos internos de uma filogenia

inferida pelo método Bayesiano, sendo assim, análoga à reamostragem de árvores pelo método de *bootstrap* (Huelsenbeck *et al.*, 2001).

Comparações entre os diferentes métodos de inferência filogenética mostram que, em geral, quando são utilizadas sequências de DNA longas (acima de 1000 pb) os resultados de todos os métodos de inferência filogenética tendem a convergir (Nei e Kumar, 2000). Porém, é preciso destacar que, para sequências curtas, com muitas amostras analisadas, o método de máxima parcimônia muitas vezes reconstrói a árvore incorretamente, problema este menos comum utilizando métodos de distância e estatísticos (Nei e Kumar, 2000). Possivelmente o fato de esses dois tipos de métodos de inferência permitirem incorporar modelos de substituição nucleotídica, pode corrigir diversos tipos de problemas (ex. substituições múltiplas; Huelsenbeck *et al.*, 2001).

1.3 Métodos de Datação Molecular

A sistemática molecular não apenas permite a inferência de árvores filogenéticas com base nas sequências moleculares, como também estimar os tempos de divergência entre linhagens dessas árvores, quando uma calibração está disponível para os táxons analisados. O princípio básico utilizado na datação molecular é a hipótese do relógio molecular, que propõe que a taxa de substituição de aminoácidos ou nucleotídeos é aproximadamente constante durante o período evolutivo das linhagens (Zuckerkandl e Pauling, 1962). A presença de uma taxa aproximadamente constante de evolução foi inicialmente encontrada em estudos com hemoglobina, citocromo c e fibrinopeptídeos (Zuckerkandl e Pauling, 1962; Margoliash, 1963; Doolittle e Blombäck, 1964; respectivamente).

O relógio molecular mais amplamente utilizado é a taxa de substituição de 2% de nucleotídeos por milhão de anos no DNA mitocondrial, que foi proposta inicialmente para mamíferos (Brown *et al.*, 1979). Essa taxa foi testada em aves (Shields e Wilson, 1987) e é muito utilizada em estudos filogenéticos (Ribas e Miyaki, 2004; Garcia-Moreno, 2004; Lovette, 2004). Em um teste feito para calibração do relógio molecular de aves, Weir e Schluter (2008) verificaram que apesar da taxa de 2% ter sido corroborada para diversas ordens de aves, em alguns grupos como Psittaciformes, ela foi

refutada e encontrar um relógio universal para esses grupos seria algo mais difícil.

Antes de aplicar uma taxa fixa de substituição para datar as divergências em uma filogenia é necessário testar se as sequências moleculares analisadas apresentam uma taxa homogênea e constante. O teste de razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*) permite verificar se a hipótese de relógio molecular é rejeitada ou não estatisticamente, com base na comparação entre uma topologia sem relógio e uma topologia com relógio forçado, caso a diferença de probabilidade entre as duas árvores for significativa, a hipótese de existência de relógio molecular é rejeitada (Posada e Crandall, 1998).

Métodos mais recentemente desenvolvidos conseguem lidar com heterogeneidade na evolução de sequências, como o método de *penalized likelihood* (Sanderson, 2002) e os métodos Bayesianos (Thorne *et al.*, 1998; Kishino *et al.*, 2001; Drummond e Rambaut, 2007). Os métodos mais utilizados atualmente são os Bayesianos, principalmente executados no programa BEAST (*Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*, Drummond e Rambaut, 2007), pois permitem estimar e incorporar diversos parâmetros como relógios moleculares estritos com taxa fixa definida, diferentes opções de relógios moleculares relaxados, que lidam com a heterogeneidade na evolução dos diferentes ramos, assim como calibração fóssil na análise. O programa utiliza cadeias Markov de Monte Carlo (MCMC) para estimar os parâmetros das árvores e testar hipóteses com as sequências moleculares analisadas (Drummond e Rambaut, 2007).

1.4 Família Psittacidae

Uma das mais antigas ordens de aves, Psittaciformes caracteriza-se pelo formato curvado do bico, em que a maxila superior apresenta-se curvada, envolvendo a maxila inferior, que apresenta uma curvatura para cima (Forshaw, 1989). A ordem Psittaciformes possui duas famílias, Cacatuidae e Psittacidae. Psittacidae é uma das mais importantes e diversas famílias de aves, representada pelas araras, periquitos, maracanãs, papagaios e afins. A família possui 332 espécies descritas, organizadas em 78 gêneros que ocorrem na região neotropical, na África, sul da Ásia e Oceania (Collar, 1997). De acordo com a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2009),

atualmente há 94 espécies da família Psittacidae sob algum nível de ameaça de extinção. Muitas das espécies ameaçadas da família Psittacidae sofreram com a perda de habitat (Collar, 1997) e, associado à isso, há captura por traficantes de animais silvestres (Sigrist, 2006), por causa da grande popularidade desses animais, com plumagens maravilhosas e a habilidade de imitar a voz humana.

Dentro da família Psittacidae há duas subfamílias, Loriinae (com distribuição na região da Australásia) e Psittacinae (que possui nove tribos de psitacídeos globalmente distribuídos). As relações entre os grupos da família Psittacidae foram estudadas em diversas filogenias, que indicam uma história complexa do grupo, sendo que diversas tribos não são monofiléticas e a subfamília Loriinae está relacionada em um clado com representantes da África, Australásia e Indo-Malásia de tribos da subfamília Loriinae (Wright *et al.*, 2008; Schweizer *et al.*, 2010; Schweizer *et al.*, 2011).

O táxon mais diverso da família Psittacidae é a tribo Arini, da subfamília Psittacinae, com 148 espécies descritas, representando todas as espécies neotropicais de psitacídeos (Collar, 1997). O estudo filogenético mais detalhado da tribo Arini incluiu 29 espécies, de 25 dos 30 gêneros da tribo (Tavares *et al.*, 2006), indicando sua monofilia, também encontrada em estudos com maior amostragem de psitacídeos não Arini (Wright *et al.*, 2008; Schweizer *et al.*, 2011). Nesse estudo a tribo apareceu dividida em três clados com alto suporte (figura 1): um clado de pequenos periquitos (*parrotlets*: Clado A), um clado com espécies de papagaios, caturritas curicas e afins (Clado B) e um clado com espécies de araras, marianinhas, tiribas e afins (Clado C). Nessa análise, três gêneros da tribo Arini apresentaram-se não monofiléticos, *Aratinga*, *Pionopsitta* e *Amazona*.

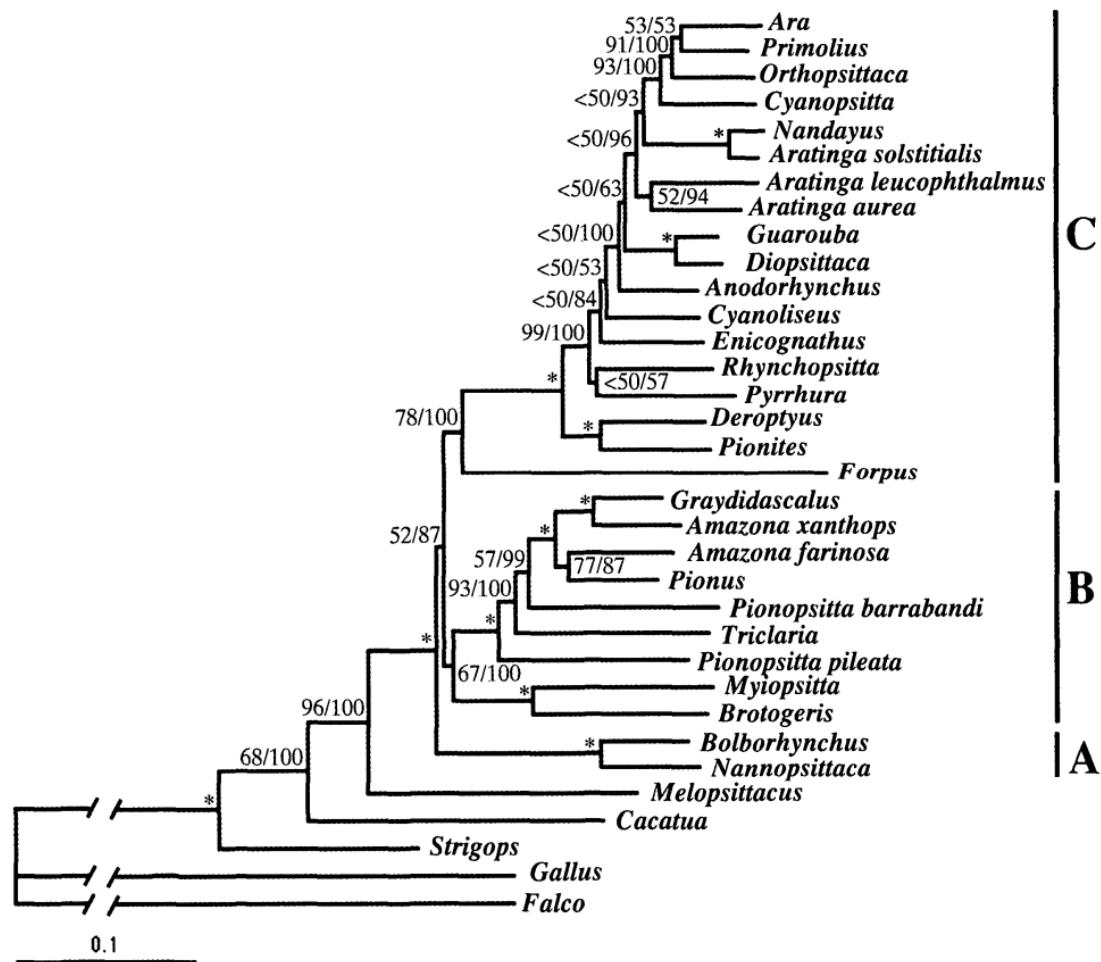


Figura 1: Análise Bayesiana de gêneros da tribo Arini. Valores ao lado dos nós referentes aos *bootstrap* da análise de verossimilhança e probabilidades posteriores da análise Bayesiana. Modificado de Tavares *et al.* (2006).

1.5 Gênero *Aratinga*

O gênero *Aratinga*, pertencente à tribo Arini e presente no registro fóssil há ao menos dois milhões de anos (Collar, 1997), tem distribuição neotropical e engloba atualmente 22 espécies (para detalhes morfológicos de cada espécie, ver abaixo), sendo o táxon *Nandayus nenday* considerado proximamente relacionado às espécies do gênero *Aratinga* (Collar, 1997):

***Aratinga acuticaudata*:** Descrita originalmente como *Psittacus acuticaudatus* Vieillot, 1818, Paraguai. Possui distribuição ampla e disjunta na América do Sul (nordeste da Colômbia; norte da Venezuela; interior do nordeste, sul e sudoeste do Brasil; leste da Bolívia; Paraguai; norte da Argentina e oeste do Uruguai). Encontrada em habitats secos em geral, como cerrado, savanas,

chaco, florestas não inundáveis e florestas de galeria. Distribui-se de 400 a 2650 metros de altitude, alimenta-se de frutos e sementes, inclusive invadindo cultivares de milho e leguminosas. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga aurea: Descrita originalmente como *Psittacus aureus* J. F. Gmelin 1788, Bahia. Essa espécie, segundo alguns autores, forma uma super-espécie com *A. canicularis*, tem distribuição ampla na América do Sul (sul do Suriname; norte, centro e interior do sul do Brasil; sudeste do Peru; leste da Bolívia; Paraguai e norte da Argentina). Ocorre em geral em habitats secos, como savanas, cerrado, palmerais, florestas de galeria, campos rupestres com muitos arbustos, se movendo de áreas campestres e florestadas para forragear. Distribui-se de 0 a 600 metros de altitude, alimentando-se de sementes, folhas, ocasionalmente de cupins e larvas de insetos. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga auricapilla: Descrita originalmente como *Psittacus auricapillus* Kuhl, 1820, Bahia, geralmente considerada formando uma super-espécie com *A. maculata*, *A. solstitialis* e *A. jandaya*, endêmica do Brasil (da Bahia ao Paraná). Comum em bordas de florestas semi-decíduas, forrageando em regiões de vegetação mais aberta, explorando até pastos e campos agrícolas. Distribui-se de 0 a 2180 metros de altitude, alimentando-se de frutos e sementes, peste agrícola durante o século XIX, quando era mais comum. Considerada vulnerável pelo CITES II, devido à degradação de seus habitats e possivelmente o tráfico de animais silvestres (Collar, 1997).

Aratinga brevipes: Descrita originalmente como *Conurus holochlorus* var. *brevipes* Lawrence, 1871, Ilha de Socorro. É endêmica dessa ilha do oeste do México. Proximamente relacionada e muitas vezes considerada como subespécie de *A. holochlora*. Presente em florestas de *Bumelia socorrensis*, *Ilex socorrensis* e *Guettarda insularis*, geralmente acima de 500 metros de altitude. Alimenta-se de sementes e da polpa dos frutos dessas espécies de plantas, considerada vulnerável pelo CITES II, devido à sua distribuição restrita (Collar, 1997).

Aratinga cactorum: Descrita originalmente como *Psittacus cactorum* Kuhl, 1820, sudeste do Brasil. Geralmente considerada como parte de uma super-espécie com *A. pertinax* e como sendo um representante de regiões áridas desse táxon. É endêmica do Brasil (nordeste do Brasil). Reside em vegetações secas da caatinga, ricas em arbustos e plantas suculentas, matas abertas e também regiões agrícolas e pastos abandonados. Há pouca informação sobre sua dieta, porém, pode eventualmente causar danos a certos cultivares da região, como arroz e milho. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga canicularis: Descrita originalmente como *Psittacus canicularis* Linnaeus, 1789, noroeste da Costa Rica. É considerada como parte de uma super-espécie com *A. aurea*. Distribui-se na costa oeste da América Central (oeste do México a oeste da Costa Rica). Reside em bordas de florestas, florestas decíduas, pântanos do Pacífico, savanas e áreas de vegetação aberta árida. Distribui-se principalmente em regiões de baixa altitude, porém chegando até 1500 metros de altitude, alimenta-se de frutos, flores e sementes. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga chloroptera: Descrita originalmente como *Psittacara chloroptera* Souancé, 1856, Ilha de São Domingos. É morfológicamente similar a *A. leucophthalmus*, possivelmente forma uma super-espécie com *A. euops*, é endêmica da Ilha de São Domingos. Habita desde planícies áridas até formações montanhosas úmidas, onde é mais comum. Há pouca informação sobre sua dieta, com indícios de consumo de frutos como figo e relatos de ser uma praga de plantações de milho. Considerada vulnerável pelo CITES II, devido à sua distribuição limitada e perda de habitat (Collar, 1997).

Aratinga erythrogenys: Descrita originalmente como *Psittacara (psittacus) erythrogenys* Lesson, 1844, Guayaquil. Distribui-se a oeste dos Andes (oeste do Equador e noroeste do Peru). Reside principalmente em florestas decíduas e habitats adjacentes, encontrada em terras cultivadas e bordas de cidades, e também explora florestas mais úmidas e mesmo desertos com vegetação

esparça. Com alimentação bastante variável, principalmente de frutos e flores. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga euops: Descrita originalmente como *Sittace euops* Wagler, 1832, Cuba. É endêmica de Cuba e, segundo alguns autores, forma uma super-espécie com *A. chloroptera*. Habita principalmente savanas, também explorando áreas cultivadas com árvores e bordas de florestas, aparentemente necessita da proximidade de áreas grandes de floresta original. Alimenta-se de frutos e sementes, tendo sido considerada uma peste agrícola no passado. Considerada uma das mais abundantes espécies endêmicas da ilha no passado, sofreu perseguição por ser uma peste agrícola e também por perda de habitat, o que fez sua população cair drasticamente no século XX. Atualmente é considerada vulnerável pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga finschi: Descrita originalmente como *Conurus finschi* Salvin, 1871, Bugaba, Chiriquí, Panamá. É considerada por alguns autores como parte de uma super-espécie com *A. leucophthalmus*. Distribui-se pela América Central (sudeste da Nicarágua; Costa Rica e oeste do Panamá), habitando principalmente matas abertas e bordas de florestas, também explorando regiões agrícolas com árvores esparsamente distribuídas e também entrando em cidades. Distribui-se de 0 a 1650 metros de altitude e se alimenta de frutos e sementes, por vezes sendo uma peste agrícola de plantações de milho e leguminosas. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga holochlora: Descrita originalmente como *Conurus holochlorus* P. L. Sclater, 1859, Jalapa, Vera Cruz. Por vezes considerada coespecífica com *A. brevipes* e *A. rubritorquis*. Apresenta uma distribuição disjunta com duas populações, uma no noroeste e outra no nordeste do México. Seus principais habitats são florestas decíduas, semi-decíduas, perenes e de galeria, também pântanos do Pacífico, vegetações tropicais rasteiras áridas e bordas de florestas de pinheiros, distribuindo-se de 0 a 2000 metros de altitude. Há poucos detalhes da alimentação dessa espécie, como sementes e frutos, por

vezes sendo pestes agrícolas. Ambas as espécies não são consideradas globalmente ameaçadas pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga strenua: A espécie *A. strenua* é muitas vezes considerada uma subespécie de *A. holochlora*, como em Collar (1997). No entanto, no presente estudo estamos adotando a nomenclatura de Clements (2000), que considera esse táxon como uma espécie diferente de *A. holochlora*. *A. strenua* é morfologicamente muito similar a *A. holochlora*, tendo um tom mais oliváceo nas penas e um bico geralmente maior. *A. strenua* distribui-se do sul do México até o norte da Nicarágua. Seus principais habitats são florestas decíduas, semi-decíduas, perenes e de galeria, também pântanos do Pacífico, vegetações tropicais rasteiras áridas e bordas de florestas de pinheiros. Essa espécie atinge até 2600 metros de altitude na Guatemala. Há poucos detalhes da alimentação dessa espécie, como sementes e frutos, por vezes sendo pestes agrícolas. Ambas as espécies não são consideradas globalmente ameaçadas pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga jandaya: Descrita originalmente como *Psittacus jandaya* J. F. Gmelin, 1788, Brasil. É considerada parte de uma super-espécie contendo *A. maculata*, *A. solstitialis* e *A. auricapilla*. É endêmica do Brasil (nordeste do Brasil, do leste do Pará e Goiás até Alagoas). Necessita de cobertura florestal, habitando regiões como bordas de florestas úmidas, vegetações do topo de morros, plantações de coqueiros, florestas não inundáveis e áreas abertas adjacentes, como áreas agropastoris, evitando vegetações mais áridas. Alimenta-se de frutos como manga e caraná, além de milho e arroz cultivados. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga leucophthalmus: Descrita originalmente como *Psittacus leucophthalmus* P. L. S. Müller, 1776, Guiana. É considerada por alguns autores como parte de uma super-espécie com *A. finschi*. Tem ampla distribuição na América do Sul (leste e sudeste da Colômbia; leste do Equador; Noroeste do Peru; leste da Venezuela; Guianas; norte e leste da Bolívia; Paraguai; norte da Argentina; norte do Uruguai e praticamente todo o Brasil). Habita bordas de florestas e savanas adjacentes, matas abertas, florestas de

crescimento secundário, florestas decíduas e de galeria, florestas de várzea, até em mangues. Distribui-se principalmente em baixas altitudes, mas chega até 2500 metros na Bolívia. Alimenta-se de diversos frutos, algumas flores, sementes e inclusive alguns insetos. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga maculata: Descrita originalmente como *Psittacus maculatus* Statius Müller, 1776, Brasil. Foi considerada como um sinônimo mais recente de *A. solstitialis* devido a uma série de erros históricas da posição taxonômica dessa espécie. Em 2005 *A. pintoi* foi descrita por Silveira e colaboradores e considerada a vigésima segunda espécie do gênero *Aratinga*, porém, como sugerido por Nemésio e colaboradores (2009), essa espécie corresponde à anteriormente descrita *Psittacus maculatus*, sendo posicionada dentro do gênero *Aratinga*, com uma nova nomenclatura, *A. maculata*. A espécie é endêmica do Brasil (noroeste do Pará). Habita áreas abertas com solo arenoso e com época moderadamente seca, vegetação com árvores esparsamente distribuídas e arbustos. Alimenta-se de frutos e sementes, também com registros de flores não identificadas. É uma espécie muito comum na região e não sofre nenhuma pressão aparente, porém ainda são necessários estudos detalhados para determinar o estado de conservação dessa espécie (Silveira *et al.*, 2005).

Aratinga mitrata: Descrita originalmente como *Conurus mitratus* Tschudi, 1844, Peru. É considerada como possível coespecífica com *A. wagleri*. Distribui-se pela região sul dos Andes (centro do Peru; centro da Bolívia e noroeste da Argentina). Reside em florestas perenes de montanhas, bordas de florestas decíduas, florestas secundárias, matagais semi-úmidos ou úmidos de montanha, nas regiões do interior serrano árido. Distribui-se de 1000 a 3000 metros de altitude, sem informação detalhada sobre a dieta. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga nana: Descrita originalmente como *Psittacara nana* Vigors, 1830, Jamaica. Possui populações com distribuição disjunta na Jamaica e na América Central continental, o que levou alguns autores a considerá-las como

espécies distintas. Distribui-se pela América Central (do nordeste do México até o oeste do Panamá e Jamaica), principal habitat são florestas decíduas, residindo também em florestas densas e úmidas e suas bordas, florestas de pinheiros, vegetação ribeirinha, matagais, plantações, áreas abertas com árvores, planícies costeiras e encostas de morros. Alimenta-se de frutos como figos, flores de *Cannabis sativa*, também causando danos em cultivares na Jamaica, principalmente de milho. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II, porém com reduções locais, como na subespécie da América Central, perseguida por ser peste agrícola e por perda de habitat com a remoção de cobertura vegetal (Collar, 1997).

Aratinga pertinax: Descrita originalmente como *Psittacus pertinax* Linnaeus, 1758, Curaçao. Alguns autores consideram que ela forma uma super-espécie com *A. cactorum*. É a espécie com maior variação geográfica do gênero, com 14 subespécies reconhecidas. Distribui-se pela região norte da América do Sul (Panamá; Colômbia; Venezuela; Antilhas; Guianas; Brasil), residindo em savanas e matagais abertos áridos com cactos e acácias, encontradas em mangues também, florestas tropicais decíduas, bordas de florestas úmidas perenes, explorando plantações e pastos com árvores como palmeiras presentes. Distribui-se de 0 a 1200 metros de altitude, se alimentando principalmente de sementes cultivadas, sendo uma peste agrícola de milho. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga rubritorquis: Descrita originalmente como *Conurus rubritorquis* P. L. Sclater, 1887, América Central. Por vezes considerada coespecífica com *A. holochlora*, apesar de apresentar morfologia, habitat e comportamento distintos. Distribui-se pela América Central (leste da Guatemala; El Salvador; Honduras e norte da Nicarágua), residindo em habitats semi-áridos e semi-úmidos como florestas de pinheiro e carvalho de planaltos e florestas adjacentes semi-decíduas. Distribui-se de 600 a 1800 metros de altitude, ou elevações superiores, sem informações específicas sobre a alimentação. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga solstitialis: Descrita originalmente como *Psittacus solstitialis* Linnaeus, 1758, Cayenne. É considerada por alguns autores formando uma super-espécie com *A. jandaya*, *A. auricapilla* e *A. maculata*. Distribui-se pelo norte da América do Sul (Guiana, Suriname e norte do Brasil), habitando savanas abertas e matas de savanas, vales florestados, florestas de várzea e vegetação secundária. Há pouca informação sobre a alimentação, algumas frutas leguminosas, cactos, entre outros. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga wagleri: Descrita originalmente como *Conurus wagleri* G. R. Gray, 1845, Bogotá. É considerada como possivelmente coespecífico com *A. mitrata*. Distribui-se na região norte dos Andes (Colômbia; Venezuela; Equador e Peru). Reside em bordas de florestas perenes de montanhas, florestas decíduas tropicais, florestas de galeria, matagais de montanha úmidos e semi-úmidos, inclusive formações com cactos e parques de cidades, aparentemente necessita de proximidade de encostas de montanhas para nidificar. Distribui-se de 350 a 3000 metros de altitude, sem informações detalhadas sobre a alimentação, apenas relatos de danos a plantações de milho. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Aratinga weddellii: Descrita inicialmente como *Conurus weddellii* Deville, 1851, Pebas. Se distribui a leste do norte dos Andes (sudeste da Colômbia; leste do Equador; leste do Peru; noroeste do Brasil e nordeste da Bolívia). Habita floresta de várzea, vegetação ribeirinha, matas pantanosas secundárias, matagais e áreas abertas, evitando florestas de terra firme. Distribui-se de 0 a 750 metros de altitude, com pouca documentação de sua alimentação, como frutos de palmeiras e algumas flores. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Nandayus nenday: Gênero monotípico, descrito inicialmente como *Psittacus nenday* Vieillot, 1823, Paraguai. É considerado próximo de espécies do gênero *Aratinga*, por vezes posicionado dentro do gênero. Distribui-se ao sul da América do Sul (sudeste da Bolívia; sudoeste do Brasil; Paraguai até o norte da Argentina), habitando florestas de galeria, matas decíduas isoladas e

palmeirais no Pantanal, também em savanas abertas, pastos, chaco úmido e matagais rasteiros e secos. Distribui-se até 800 metros de altitude, ou mais, alimentando-se de sementes de plantas como palmeiras, frutos, geralmente obtidos no chão. Não é considerada globalmente ameaçada pelo CITES II (Collar, 1997).

Nenhuma filogenia morfológica foi realizada com as espécies do gênero *Aratinga* e o estudo das relações filogenéticas entre os táxons foi realizado em trabalhos moleculares, com amostragem incompleta do gênero (Ribas e Miyaki, 2004; Tavares *et al.*, 2004, 2006). O trabalho mais detalhado com um grupo do gênero foi um estudo realizado por Ribas e Miyaki (2004), no qual foram amostradas sete espécies do gênero *Aratinga*, o táxon monoespecífico *Nandayus nenday* e outros sete gêneros de psitacídeos relacionados (figura 2). Nesta análise, baseada em sequências de genes mitocondriais (12S, 16S, citocromo B, região controladora, total de 2029 pb) *Nandayus nenday* se apresentou dentro de um grupo monofilético bem suportado, sendo grupo-irmão de um clado com três espécies do gênero *Aratinga* (*A. solstitialis*, *A. jandaya* e *A. auricapilla*), sendo que *A. weddellii* seria a espécie irmã desse grupo (figura 2). Esse resultado apontou para a inclusão de *Nandayus nenday* no gênero *Aratinga*, além de ter levantado uma forte evidência contra a monofilia do gênero devido ao posicionamento filogenético de *Nandayus nenday* e pela longe posição de *A. leucophthalmus*.

Em outro trabalho feito com uma amostragem menor do gênero *Aratinga* (Tavares *et al.*, 2006), porém com uma grande amostragem de gêneros da tribo Arini e uma matriz de dados maior com cinco genes mitocondriais e um nuclear (6388 pb), foi encontrado um alto suporte para a relação entre *Nandays nenday* e *A. solstitialis*, relação já encontrada em Ribas e Miyaki (2004). O posicionamento de outras espécies do gênero foi incerto, porém com forte evidência de ausência de monofilia do gênero *Aratinga* (figura 1).

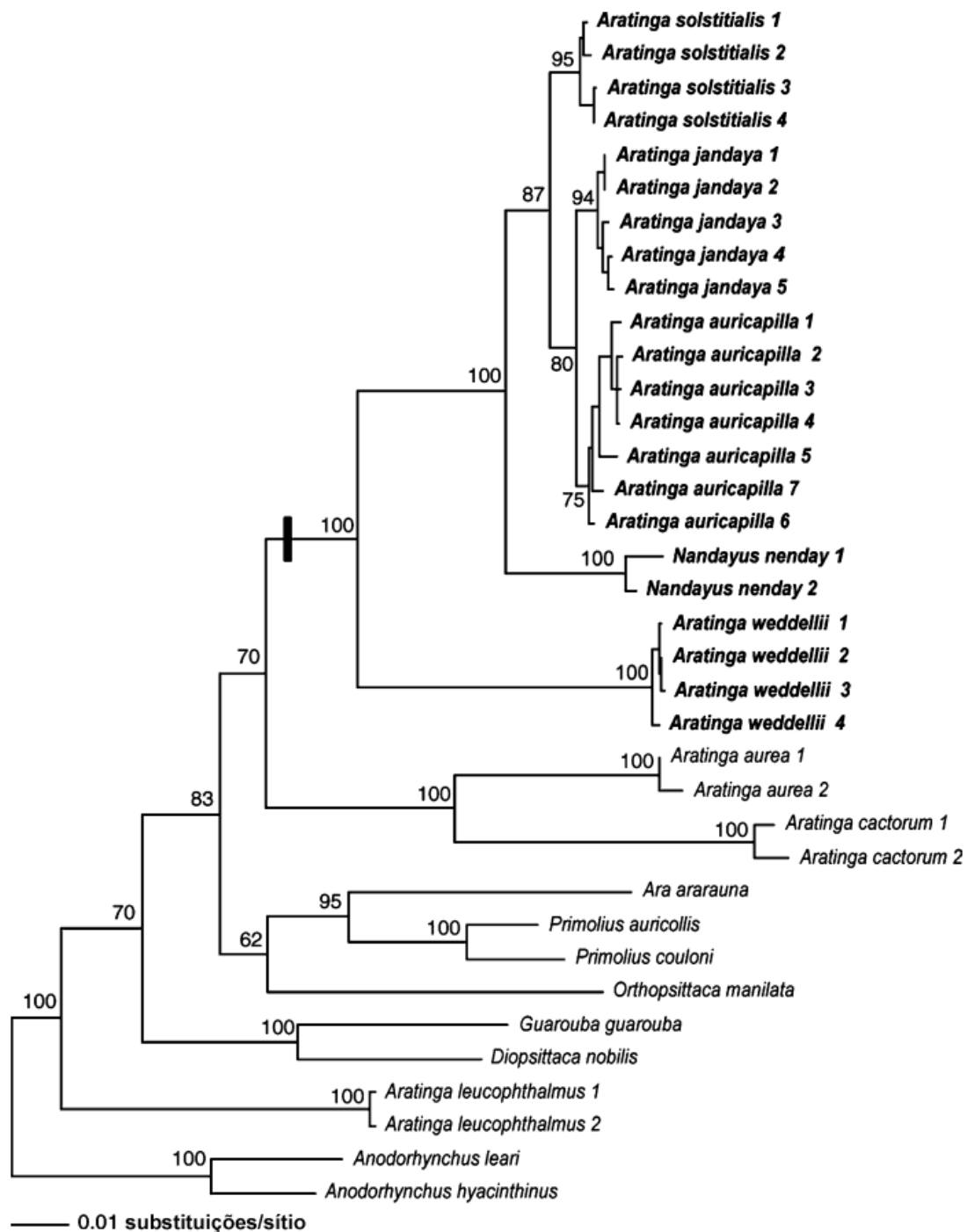


Figura 2: Análise filogenética feita por máxima verossimilhança de espécies do gênero *Aratinga*. Valores ao lado dos nós referentes aos *bootstrap*. Modificado de Ribas e Miyaki, 2004.

Em um estudo com caracteres morfológicos de plumagem, Silveira e colaboradores (2005) descreveram uma nova espécie do gênero *Aratinga* (*A. pinto*, depois verificada como sinônimo mais recente de *A. maculata*) e propuseram três grupos de espécies para o gênero:

1) Grupo *Aratinga solstitialis*: Inclui as espécies *A. solstitialis*, *A. maculata*, *A. jandaya*, *A. auricapilla*, *A. weddellii* e o táxon monoespecífico *Nandayus nenday* (figura 3). Espécies de tamanho mediano (de 28 a 30 cm) com bico preto. As rêmiges são dorsalmente verdes, com a porção média azul e a distal preta; ventralmente são pretas, sendo as maiores das asas geralmente azul marinho. As rectrizes apresentam coloração na porção dorsal geralmente verde, com a ponta em azul marinho; sendo a porção ventral de coloração predominantemente preta.

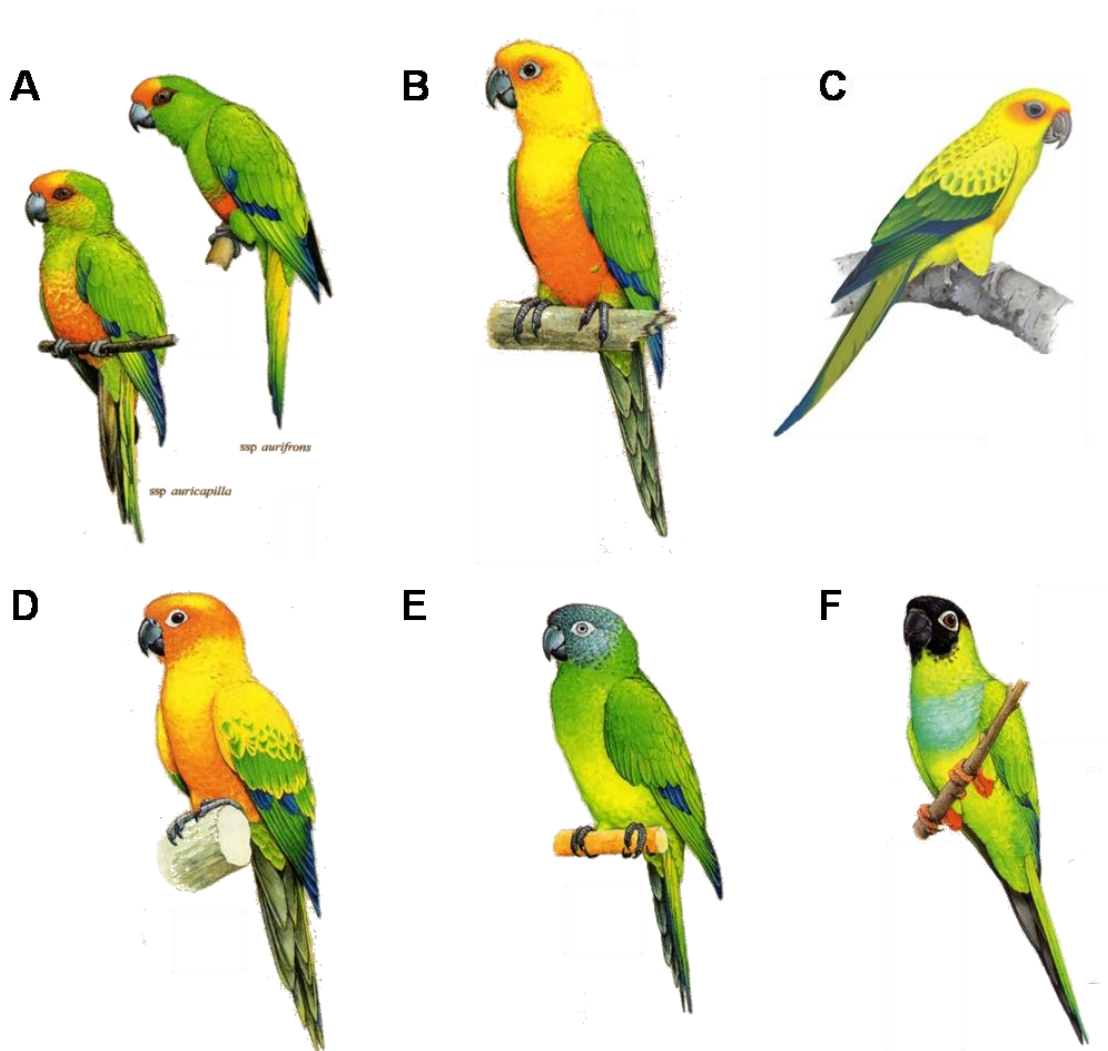


Figura 3: Espécies do grupo *Aratinga solstitialis*. A- *A. auricapilla*, B- *A. jandaya*, C- *A. maculata*, D- *A. solstitialis*, E- *A. weddellii* e F- *Nandayus nenday*. Figuras modificadas de Collar (1997) e Silveira *et al.* (2005). Fora de escala.

2) Grupo *Aratinga pertinax*: Inclui as espécies *A. pertinax*, *A. aurea*, *A. nana*, *A. canicularis* e *A. cactorum* (figura 4). Espécies com tamanho

relativamente pequeno (de 23 a 26 cm); bico com coloração amarelada ou cinza; coloração das penas da parte superior do peito marrom oliva ou acinzentada; rêmiges dorsalmente verde-azuladas e ventralmente cinza-escuro, retrizes dorsalmente verdes, com a ponta azulada e ventralmente oliváceas.

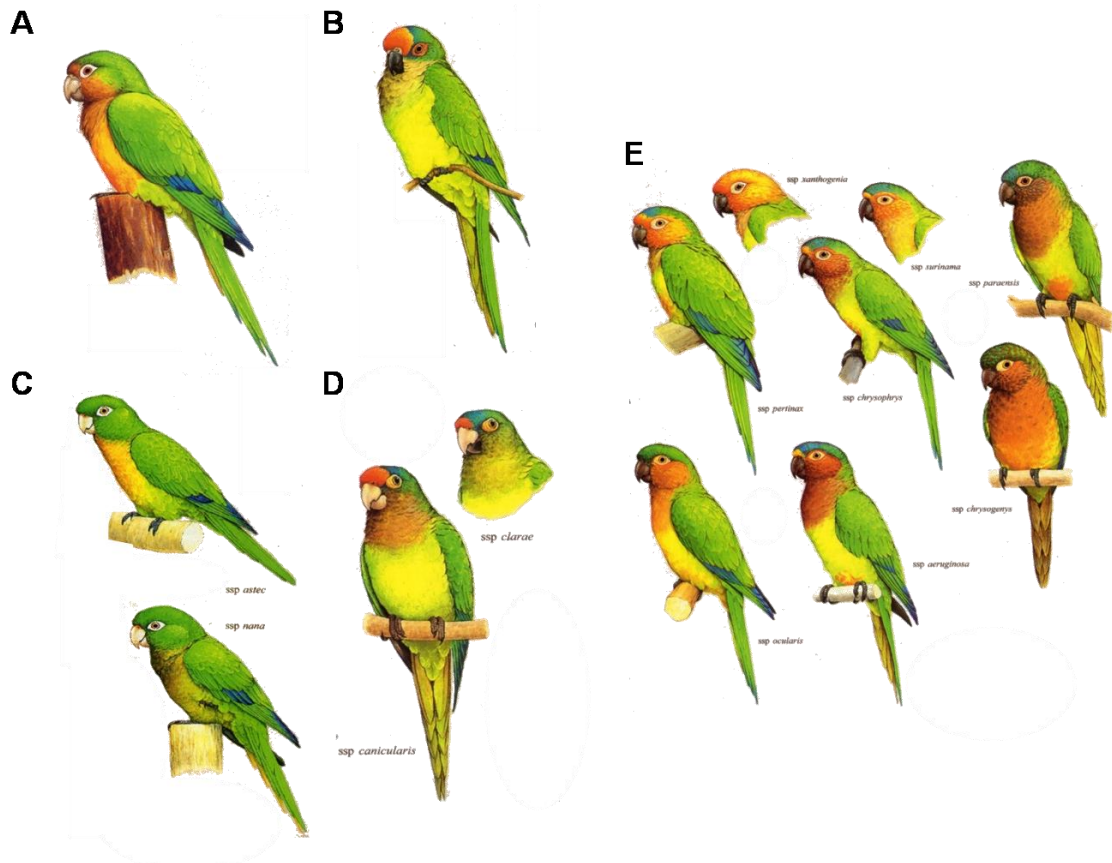


Figura 4: Espécies do grupo *Aratinga pertinax*. A- *A. cactorum*, B- *A. aurea*, C- *A. nana*, D- *A. canicularis* e E- *A. pertinax*. Figuras modificadas de Collar (1997). Fora de escala.

3) Grupo *Aratinga leucophthalmus*: Inclui as espécies *A. leucophthalmus*, *A. acuticaudata*, *A. mitrata*, *A. wagleri*, *A. erythrogenys*, *A. finschi*, *A. euops*, *A. chloroptera*, *A. holochlora*, *A. rubritorquis* e *A. brevipes* (figura 5). Espécies com tamanho relativamente grande (de 25 a 38 cm); bico com coloração amarelada; plumagem predominantemente verde, geralmente com traços vermelhos no rosto, pescoço e na parte ventral das asas; anel periorbital branco conspícuo; rêmiges ventralmente amareladas e retrizes dorsalmente verdes e ventralmente oliváceas. *A. strenua* foi considerada como subespécie de *A. holochlora* no trabalho de Silveira e colaboradores (2005).

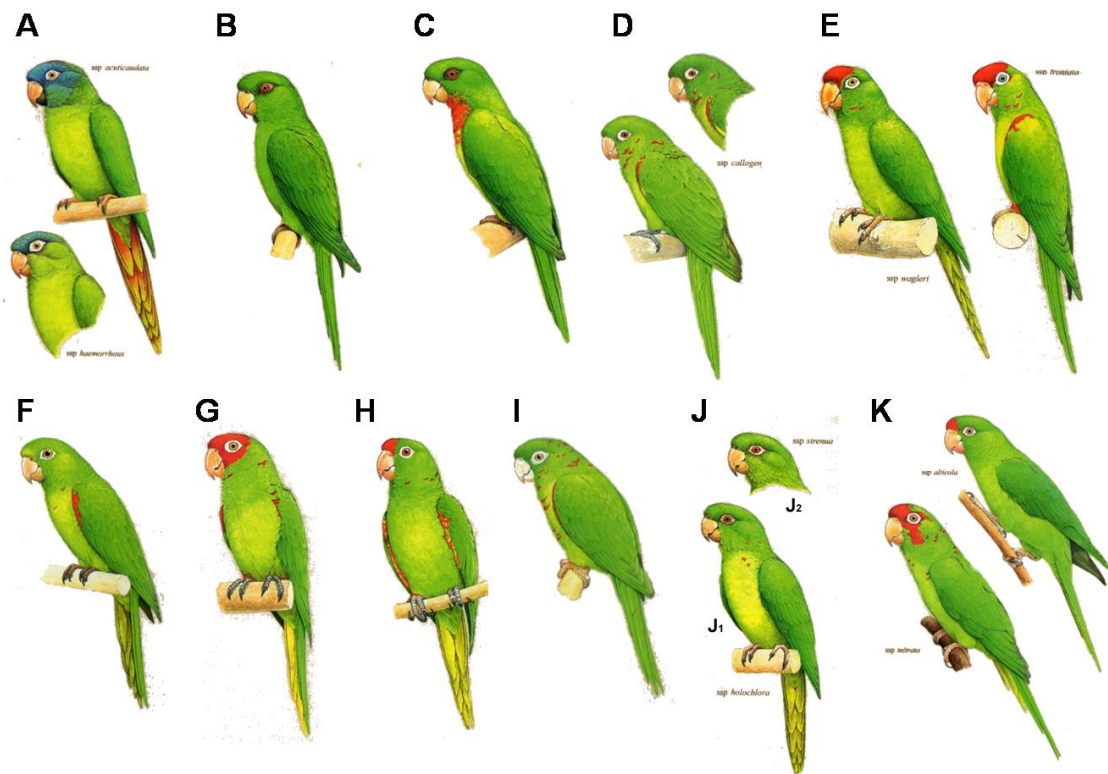


Figura 5: Espécies do grupo *Aratinga leucophthalmus*. A- *A. acuticaudata*, B- *A. brevipes*, C- *A. rubritorquis*, D- *A. leucophthalmus*, E- *A. wagleri*, F- *A. chloroptera*, G- *A. erythrogegens*, H- *A. finschi*, I- *A. euops*, J₁- *A. holochlora*, J₂- *A. strenua*. e K- *A. mitrata*. Figuras modificadas de Collar (1997). Fora de escala.

1.6 Origem e biogeografia de Psittaciformes

A origem da ordem Psittaciformes e a história evolutiva de seus grupos têm sido alvos de bastante discussão. Baseando-se na distribuição das espécies viventes e no registro fóssil, Glenny (1954) sugeriu a origem de Psittaciformes no continente Antártico após o limite Cretáceo/Terciário, com subsequentes eventos de dispersão para a América do Sul, Nova Zelândia e Austrália, sendo que a colonização da África se deu por múltiplas migrações trans-oceânicas. Assumindo uma data de origem mais antiga para o grupo e também com base no registro fóssil e na distribuição atual de Psittaciformes, Cracraft (1973 e 2001) propôs que o grupo originou-se ainda no Cretáceo, no continente da Gondwana. Além disso, ele propôs que a tectônica de placas que levou à separação dos continentes teve um papel importante nas primeiras diversificações de Psittaciformes, assim como outras ordens de aves com distribuição similar.

O registro fóssil de Psittaciformes não é congruente com esse cenário, visto que a maior parte dos fósseis data do Terciário e do Quaternário, inclusive com representantes modernos, como em depósitos de 2 milhões de anos atrás (Ma.) que continham representantes dos gêneros *Aratinga* e *Cyanoliseus*. O fóssil mais antigo conhecido, atribuído a um psitacídeo é uma maxila inferior que data de aproximadamente 65 Ma. (Stidham, 1998), porém houve críticas sobre sua identificação (Dyke e Mayr, 1999).

Mais recentemente, diversos estudos que incluem datação molecular têm suportado uma origem antiga da ordem, congruente com a hipótese de origem na Gondwana, no Cretáceo entre 110 e 80 Ma. (Hedges *et al.*, 1996; Cooper e Peny, 1997; van Tuinen e Hedges, 2001; Paton *et al.*, 2002). Filogenias moleculares de Psittaciformes mais recentemente inferidas têm suportado uma separação inicial entre a linhagem que inclui os gêneros da Nova Zelândia e a linhagem que contém o restante dos grupos da ordem, sendo que a diversificação de grande parte destes grupos se deu de forma relativamente congruente com o padrão de separação dos continentes, o que reforça a possível origem na Gondwana (Barrowclough *et al.*, 2004; de Kloet e de Kloet, 2005; Wright *et al.*, 2008; Schweizer *et al.*, 2010).

Um dos estudos que destacamos abrange grande parte dos gêneros da tribo Arini assim como outros gêneros de Psittaciformes (Tavares e colaboradores, 2006). Nesse artigo foi encontrado um padrão concordante com a origem na Gondwana e vicariância subsequente. Nesse trabalho, a análise de datação das divergências entre as espécies da tribo Arini (figura 6) foi calibrada com a data do isolamento da Nova Zelândia (82 Ma.) correspondendo à divergência entre o gênero *Strigops*, endêmico dessa região e incapaz de voar, como o restante dos Psittaciformes. Nesse cenário, a divergência entre as linhagens que originaram a tribo Arini (neotropical) e o grupo australasiático data entre 67-51 Ma., o que sugere que a separação da Austrália da Antártica ocorrida nesse período pode ter tido alguma influência. A divergência entre os três principais clados da tribo Arini ocorreu em um intervalo de tempo relativamente curto, por volta 50 Ma., sendo que na época da separação entre a América do Sul e a Antártica, os três principais clados já haviam sofrido divergência. A diversificação do clado B ocorreu praticamente de maneira constante após a sua formação (figura 6), porém, a grande diversificação do

clado C ocorreu de maneira abrupta entre 30-20 Ma, o que corresponde à formação de diversos ambientes secos na América do Sul.

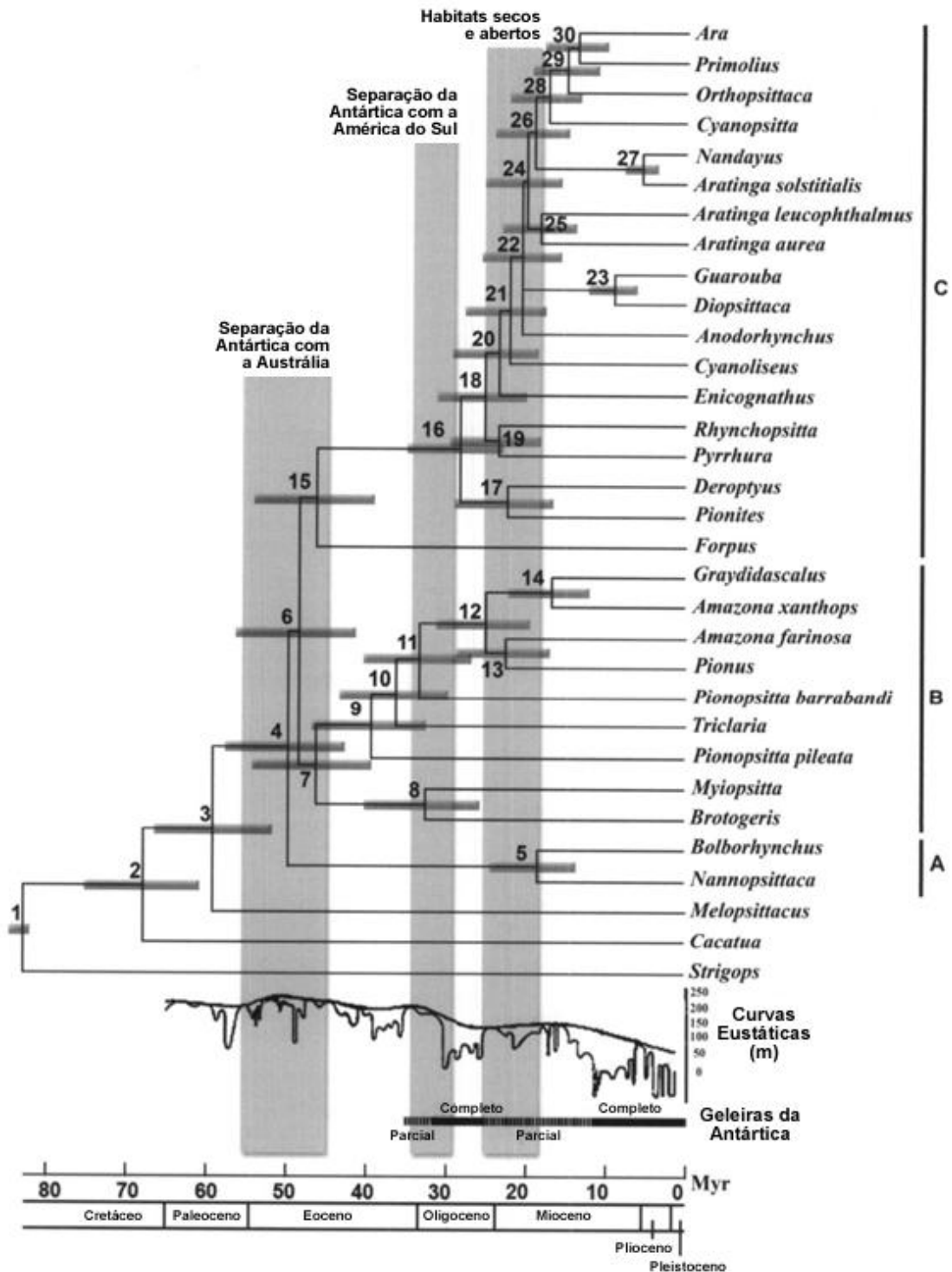


Figura 6: Cronograma mostrando as datas de divergência estimadas entre as linhagens de psitacídeos da tribo Arini. Modificado de Tavares *et al.* (2006).

Em geral, outros autores que analisaram a origem dos Psittaciformes e seus táxons atuais (Barrouclough *et al.*, 2004; de Kloet e de Kloet, 2005) utilizaram o mesmo tipo de calibração usada em Tavares e colaboradores (2006). Porém, alguns estudos sugeriram uma origem mais recente para Neoaves, e, conseqüentemente, para Psittaciformes (Mayr, 2002; Feducia, 2003) com base no registro fóssil tanto da ordem, quanto de outros táxons de Neoaves. Em um estudo de 2008, Wright e colaboradores, testaram duas hipóteses de origem da ordem: 1) origem no Cretáceo (Figura 7b) com a separação do ramo de gêneros endêmicos da Nova Zelândia (*Nestor* e *Strigops*) causada por um evento vicariante há cerca de 82 Ma., que corresponde à data mínima do isolamento da Nova Zelândia da Gondwana (McLoughlin, 2001); 2) origem mais recente e de acordo com o registro fóssil (Mayr, 2002) no Terciário (Figura 7a), ou seja, os Psittaciformes modernos se originaram há no mínimo 50 Ma.. As datas de divergência obtidas com a calibração baseada na hipótese de origem no Cretáceo (Figura 7b) são concordantes com as datas encontradas por Tavares e colaboradores (2006) e sustentam uma história evolutiva marcada por vicariâncias devido à deriva continental, seguidas por dispersões, principalmente da Ásia para a África. As datas de divergência obtidas com a hipótese de origem no Terciário sugerem diversos eventos de dispersão entre continentes, com grandes deslocamentos por oceanos, o que foi considerado pouco provável pelos autores, apesar de ser um padrão encontrado em outro trabalho mais recente (Schweizer *et al.*, 2011). Seja qual for a origem do grupo, a história evolutiva dos Psittaciformes foi complexa e envolveu eventos de vicariância e também alguns casos de dispersão trans-oceânica, principalmente na origem dos psitacídeos do continente africano (Wright *et al.*, 2008).

1.7 Biogeografia da região neotropical

A história da região neotropical é complexa e envolve diversos eventos tectônicos, separações e conexões. Depois da inicial quebra da Gondwana, a separação do bloco continental América do Sul/Antártica da Austrália ocorreu no Eoceno, entre 55 e 45 Ma. (Woodbourne e Case, 1996). Já a separação da América do Sul em relação à Antártica ocorreu no início do Oligoceno, quando essa última foi coberta por gelo (entre 35 e 30 Ma.; Dingle e Lavelle, 1998; Shevenall *et al.*, 2004). A partir daí, a América do Sul se tornou um “continente ilha”, completamente isolado do restante das massas continentais por um longo período de tempo, até a conexão com a América do Norte por volta de 3,1 Ma. com o fechamento do Istmo do Panamá (Coates e Obando, 1996). Esse isolamento parece ter permitido a diversificação de diversos grupos de organismos por um grande intervalo de tempo, o que foi denominado para mamíferos de “isolamento explêndido” por Simpson (1980).

Durante seu isolamento, a América do Sul passou por grandes transformações, devido a mudanças climáticas e principalmente à tectônica de placas. O soerguimento dos Andes alterou drasticamente a dinâmica dos rios e o clima e influenciou a distribuição atual de espécies, assim como parece ter sido responsável por diversos eventos de especiação em diversos táxons (Antonelli *et al.*, 2009, Chaves *et al.*, 2011). Talvez a região mais afetada pelo soerguimento dos Andes foi a Amazônia, que durante o Paleoceno e o Eoceno (65 a 33 Ma.) tinha seus principais rios fluindo do leste para o oeste com um baixo regime sedimentar, denominado de Amazônia “Cratônica” (Hoorn *et al.*, 2010). A região central dos Andes começou a soerguer no Paleogeno (65 a 34 Ma.) devido à subducção da margem da placa do Pacífico (Poulsen *et al.*, 2010). O soerguimento da região norte dos Andes se intensificou a por volta de 23 Ma., coincidente com diversificações de gêneros de animais e plantas (Hoorn *et al.*, 2010). Paralelamente ao soerguimento do norte dos Andes, no oeste da Amazônia se formou uma grande região pantanosa com lagos rasos, denominada “Sistema Pebas”, com grande diversidade de invertebrados, crocodilianos e tartarugas (Wesselingh e Salo, 2006; Riff *et al.*, 2010). Porém o soerguimento de montanhas mais intenso ocorreu durante o Mioceno médio (12 Ma.) e o Plioceno inicial (4,5 Ma.; Hoorn *et al.*, 2010). Durante esse período a Amazônia oeste mudou de um sistema lacustre para um sistema fluvial, a

dinâmica dos rios foi alterada e a partir de 10 Ma. os rios passaram a fluir do oeste para o leste com consequente entrada de nutrientes dos Andes e o atual rio Amazonas se torna completamente estabelecido a partir de 7 Ma. (Figueiredo *et al.*, 2009). Essas modificações da topografia e do ambiente amazônico causaram uma grande diversificação em toda a região, porém com altos níveis de diversidade concentrados na região oeste da Amazônia, que sofreu grande influência do soerguimento dos Andes (Hoorn *et al.*, 2010).

Outro evento que certamente foi importante na diversificação neotropical foi o fechamento do Istmo do Panamá, estimado entre 4 Ma. e 3 Ma. (Kirby *et al.*, 2008; Coates e Obando, 1996; respectivamente). Essa conexão que surgiu entre a América do Sul e a América do Norte levou ao evento conhecido como “*Great American Biotic Interchange*” (GABI), que foi uma grande troca de organismos entre os dois continentes, que gerou grande diversificação na região neotropical (Weir *et al.*, 2009; Hoorn *et al.*, 2010). Estudos indicam que a presença da conexão entre os continentes facilitou a dispersão de diversos grupos de aves como Passeriformes (Weir *et al.*, 2009) e Columbiformes (Johnson e Weckstein, 2011), o que gerou muitas especiações trans-istmo nesses grupos, com a maior frequência após o fechamento do Istmo, por volta de 3,1 Ma. (Coates e Obando, 1996; Johnson e Weckstein, 2011). Aparentemente a dispersão de aves foi assimétrica entre as regiões neártica e neotropical, visto que a fauna neártica pôde se adaptar na América Central a condições similares às da América do Sul antes de a conexão se completar, o que facilitou a entrada de espécies do norte para o sul. Porém, o contrário não foi verificado, sendo que a avifauna da América do Sul conseguiu colonizar efetivamente regiões da América Central, mas não na América do Norte, pois aparentemente não teve tempo de se adaptar às novas condições (Johnson e Weckstein, 2011).

As oscilações climáticas do Pleistoceno também parecem ter papel importante na formação da biota atual da América do Sul. A redução da umidade devido ao resfriamento durante os máximos glaciais do Pleistoceno causou retração em diversos ambientes florestais úmidos, gerando fragmentação destes, o que causaria a redução da área de distribuição de populações de espécies dependentes de florestas e o isolamento dessas populações, que poderia acarretar em diversificação (Haffer, 1997; Newton,

2003). Essa hipótese dos refúgios pleistocênicos foi inicialmente postulada por Haffer (1969) e Vanzolini e Willians (1970) para explicar a grande diversidade da região amazônica. Estudos recentes têm indicado que a maioria das especiações na Amazônia é mais antiga que os ciclos glaciais do Pleistoceno (Nores, 1999; Santos *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011), o que torna a explicação dos refúgios insuficiente para explicar a grande diversificação nesse ambiente, que tem uma história bastante complexa. Porém a hipótese dos refúgios é bastante consistente com muitas diversificações na Mata Atlântica, que possui três regiões de possíveis refúgios florestais identificadas, com base no padrão de estruturação das populações de diversas espécies, assim como em modelagens de nicho ecológico (Carnaval e Moritz, 2008; Carnaval *et al.*, 2009).

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi obter uma filogenia bem sustentada do gênero *Aratinga* (Aves, Psittacidae) com base em dados moleculares. Essa filogenia e a datação dos eventos de diversificação permitiram discutir aspectos biogeográficos da história evolutiva do grupo. Com essas informações procuramos contribuir para a caracterização do complexo processo de origem da tão exuberante biodiversidade no neotrópico. Dentro desse contexto, foi testada a monofilia do gênero, dos grupos de espécies propostos por Silveira e colaboradores (2005) e as relações filogenéticas tanto dentro dos grupos como entre eles.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras utilizadas

O DNA de representantes de 13 espécies do gênero *Aratinga* foi extraído a partir de amostras estocadas no acervo de sangue e tecidos do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Amostras de DNA de outras seis espécies do gênero *Aratinga* endêmicas da América Central foram obtidas por colaboração com Michael Braun e o professor Michael Wink da “Universitaet Heidelberg”, Alemanha. Sequências de outras três espécies do gênero *Aratinga*

foram obtidas no GenBank (Tabela 2). A única espécie com sequências de dois indivíduos utilizada nesse trabalho foi *Aratinga solstitialis*, com um indivíduo sequenciado neste trabalho e outro cujas sequências foram obtidas do GenBank (ver Discussão).

Assim, foram amostradas 21 das 22 espécies do gênero *Aratinga* (Tabela 1), além de *Nandayus nenday*, considerada relacionada com o gênero. Para testar a monofilia do gênero, sequências de outros 14 gêneros de psitacídeos da tribo Arini foram obtidas no GenBank (Tabela 2; Tavares *et al.*, 2006; Ribas e Miyaki, 2004). Baseado em um estudo filogenético multigênico (Clado C da figura 1; Tavares *et al.*, 2006), utilizamos *Forpus crassirostris* como grupo externo mais adequado para nossas análises, totalizando 36 táxons nas análises filogenéticas. Outros 14 gêneros de Psittaciformes foram adicionados nas análises de datação molecular (ver seção Datação Molecular) e também estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 1: Espécies do gênero *Aratinga* amostradas com os números de identificação (Id) e procedência.

Gênero	Epíteto	Id	Procedência
<i>Aratinga</i>	<i>acuticaudata</i>	5958*	Criadouro Stanislau - RJ (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>auricapilla</i>	7881*	Criadouro de Aluísio - Araçatuba, SP (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>brevipes</i>	8873*	African Safari Zoo - Puebla, México (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>cactorum</i>	4624*	Colina dos Aragaris - SP (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>erythrogenys</i>	9166*	Rio Zoo - RJ (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>holochlora</i>	7321*	Zoológico de Sorocaba - SP (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>jandaya</i>	11632*	Apreensão em Jacunda - PA (Natureza)
<i>Aratinga</i>	<i>maculata</i>	9158*	Monte Alegre - PA (Natureza)
<i>Aratinga</i>	<i>mitrata</i>	7326*	Zoológico de Sorocaba - SP (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>pertinax</i>	9350*	Parque Zoológico Quinzinho de Barros - RR (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>solstitialis</i>	7527*	Zoológico de Sorocaba - SP (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>wagleri</i>	9162*	Rio Zoo - RJ (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>weddellii</i>	4950*	Vila Bela da Santíssima Trindade - MT (Natureza)
<i>Aratinga</i>	<i>canicularis</i>	34417**	Loro Parque, Tenerife (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>chloroptera</i>	34422**	Loro Parque, Tenerife (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>euops</i>	34430**	Loro Parque, Tenerife (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>finschi</i>	34432**	Loro Parque, Tenerife (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>nana</i>	34452**	Loro Parque, Tenerife (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>rubritorquis</i>	34461**	Loro Parque, Tenerife (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>aurea</i>	3978***	Criadouro Carlos Isoldi (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>leucophthalmus</i>	5722***	Seringal Aliança, rio Itimari, Acre (Cativeiro)
<i>Aratinga</i>	<i>solstitialis</i>	5674***	Edislane Barreiros de Souza (Cativeiro)

*: LGEMA-USP, **: laboratório do Prof. Michael Wink; ***: Sequências do GenBank (ver também Tabela 2).

Tabela 2: Sequências do GenBank utilizadas nas análises filogenéticas e de datação molecular. As espécies que não apresentam sequências do gene 16S não foram utilizadas nas análises filogenéticas, apenas nas análises de datação molecular.

Espécie	12S	16S	NADH2	Cit B	COIII, ATP6, ATP8	RAG-1
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	DQ143208.1	EU197120.1	DQ143311.1	DQ143286.1	DQ143250.1	DQ143329.1
<i>Ara ararauna</i>	U70739.2	U70750.2	DQ143315.1	DQ150994.1	DQ143280.1	DQ143340.1
<i>Aratinga aurea</i>	U70740.2	U70751.2	DQ143321.1	DQ150993.1	DQ143255.1	DQ143341.1
<i>Aratinga leucophthalmus</i>	AF362919.2	AF365412.2	DQ143298.1	AY281253.2	DQ143254.1	DQ143331.1
<i>Aratinga solstitialis</i>	DQ143212.1	AF143229.1	DQ143317.1	DQ143285.1	DQ143270.1	DQ143330.1
<i>Cyanoliseus patagonos</i>	DQ143209.1	DQ143233.1	DQ143306.1	DQ143283.1	DQ143251.1	DQ143334.1
<i>Cyanopsitta spixii</i>	U70742.2	DQ143232.1	DQ143310.1	DQ150989.1	DQ143259.1	DQ143336.1
<i>Deropterus accipitrinus</i>	DQ143214.1	U70754.2	DQ143305.1	DQ150992.1	DQ143269.1	DQ143338.1
<i>Diopsittaca nobilis</i>	AF362922.2	AF365415.2	DQ143308.1	AF370769.1	DQ143252.1	DQ143335.1
<i>Enicognathus leptorhynchus</i>	DQ143216.1	DQ143235.1	DQ143314.1	DQ143287.1	DQ143256.1	DQ143332.1
<i>Forpus crassirostris</i>	DQ143215.1	DQ143236.1	DQ143300.1	DQ143294.1	DQ143263.1	DQ143325.1
<i>Guarouba guarouba</i>	AY286198.2	AY286215.2	DQ143309.1	DQ150990.1	DQ143253.1	DQ143333.1
<i>Nandayus nenday</i>	AY274019.1	U70757.2	DQ143299.1	AY219915.2	DQ143257.1	DQ143326.1
<i>Orthopsittaca manilata</i>	AF362924.2	AF365417.2	DQ143301.1	DQ150991.1	DQ143273.1	DQ143337.1
<i>Pionites leucogaster</i>	DQ143213.1	DQ143245.1	DQ143312.1	DQ143288.1	DQ143274.1	DQ143342.1
<i>Primolius auricollis</i>	AF362926.2	AF365419.2	DQ143302.1	DQ150995.1	DQ143258.1	DQ143343.1
<i>Pyrrhura leucotis</i>	DQ143210.1	DQ143230.1	DQ143307.1	DQ143289.1	DQ143277.1	DQ143353.1
<i>Rhynchopsitta pachyrhyncha</i>	DQ143211.1	DQ143234.1	DQ143303.1	DQ143297.1	DQ143278.1	DQ143339.1
<i>Amazona farinosa</i>	DQ143219.1	-	AY194461.1	DQ143282.1	DQ143260.1	DQ143346.1
<i>Amazona xanthops</i>	DQ143218.1	-	DQ143316.1	DQ143293.1	DQ143261.1	DQ143345.1
<i>Bolborhynchus lineola</i>	DQ143224.1	-	DQ143319.1	DQ143291.1	DQ143266.1	DQ143350.1
<i>Brotogeris chiriri</i>	DQ143226.1	-	DQ143313.1	DQ143281.1	DQ143271.1	DQ143348.1
<i>Cacatua goffini</i>	DQ143228.1	-	DQ143323.1	DQ143284.1	DQ143265.1	DQ143355.1
<i>Graydidascalus brachyurus</i>	DQ143217.1	-	DQ143324.1	DQ143296.1	DQ143279.1	DQ143344.1
<i>Melopsittacus undulatus</i>	DQ143227.1	-	DQ143322.1	DQ143295.1	DQ143264.1	DQ143354.1
<i>Myiopsitta monachus</i>	AF362932.2	-	DQ143318.1	DQ150996.1	DQ143276.1	DQ143328.1
<i>Nannopsittaca dachilleae</i>	DQ143225.1	-	DQ143320.1	DQ143292.1	DQ143225.1	DQ143352.1
<i>Pionopsitta barrabandi</i>	DQ143223.1	-	-	-	DQ143275.1	DQ143349.1
<i>Pionopsitta pileata</i>	DQ143221.1	-	AY669481.1	AY669437.1	DQ143262.1	DQ143351.1
<i>Pionus maximiliani</i>	DQ143220.1	-	DQ143304.1	DQ143290.1	DQ143272.1	DQ143347.1
<i>Strigops habroptilus</i>	NC_005931.1	-	NC_005931.1	NC_005931.1	NC_005931.1	-
<i>Tricharia malachitacea</i>	DQ143222.1	-	HQ629747.1	EF104143.1	DQ143268.1	DQ143327.1

Referências: de DQ143208 a DQ143324 e de DQ150989 a DQ150996 (Tavares *et al.*, 2006); de U70739 a U70757 (Miyaki *et al.*, 1998); de AF362919 a AF370769 e de AY219915 a AY286215 (Tavares e Miyaki, 2004); NC.005931 (Harrison *et al.*, 2004); HQ629747 (Schirtzinger *et al.*, 2011, dados não publicados); EF104143.1 (Tavares, 2005).

3.2 Genes analisados

Foram selecionados para a análise filogenética deste gênero os genes RAG-1 (nuclear) e os mitocondriais: citocromo b, NADH2, ATPase 6, ATPase 8, COIII, DNAr 12S e 16S. Essa seleção foi feita baseada no resultado do trabalho de Tavares e colaboradores (2006). As sequências foram obtidas por amplificação do DNA por PCR (ver a seguir) utilizando os mesmos *primers* desse artigo, em conjunto com *primers* já presentes no laboratório e outros *primers* desenhados nesse estudo (Tabela 3). Assim, fomos capazes de alinhar as sequências que produzimos com aquelas dos representantes já sequenciados da tribo Arini.

Tabela 3: *Primers* utilizados para a amplificação e sequenciamento.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Referência	
RAG-1	R13	TCTGAATGGAAATTCAGCTGTT	1	
	R17	CCCTCCTGCTGGTATCCTTGCTT		
	R18	GATGCTGCCTCGGTCCGCCACCTTT		
	R21	GGATCTTTGAGGAAGTAAAGCCCAA		
	R24	GCCTCTACTGTCTCTTTGGACAT		
	R2B	GAGGTATATAGCCAGTGATGCTT		
	R1	GACAAACATCTCAGGAAGAAGAT		
	R11	GGACCAGTAGATGATGAAACTCT		
	R14	TTCCTGTGGATAATACTCCAGCA		
	R19	GTCCTGGGAGGCAGATCTTCCA		
	R20	CCATCTATAATTCCCATTCTGT		
	R22	GAATGTTCTCAGGATGCCTCCCAT		
	RA1F1	AAAAGGCAGGCACTTGAGAA	Esse trabalho	
	RA1R1	GCTGGAGAGGTGTTGACCAT		
	RA1FI1	AAAAAGTCAGCCACCCAGTG		
	RA1RI1	CAAGAAGCTTGGTGCTGAGA		
	RA3F1	GGCCTCAGGTTCCACTTACA		
	RA3R1	CCAATGGACCCATCTCTTTC		
	RA3FI1	GCTCCGTGACAGAGTGAAGG		
	RA3RI1	CCACACTGGCTTCATCTTCA		
	citocromo b	b1	CCATCCACCATCTCAGGATGATGAAA	2
		b52	GNAATCYCACCCNCTWCTHAAAAT	
b6		GTCTTCAGTTTTGGTTTACAAGAC		
ND5L		GGACCAGAAGGACTTGCCGACCTA	3	
HThr		TCTTTTGGTTTACAAGACCAATG	4	
CBL int L2		CGGAGCCTCATTCTTCTTCA	Esse trabalho	
CBL int H2		CCCCTAATTTGTTGGGGATT		
NADH 2	Lmet	GGCCCATACCCCGAAAATGA	5	
	H6313 trp	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	6	
	ND2 (L5602)	GATTCCCAGAAGTTCTTCAAGG	7	
	ND Int L1	GCCTTCTCATCCATCTCCCATA	Esse trabalho	
	ND Int L2	GGAAAATCATGGCCTTCTCA		
	ND Int L3	CCTTCTACATCTACATCCTAAT		

(continuação da tabela 3)

NADH 2	ND Int L4	CACATTACTCACCTTCATGTCC	
	ND H1	TTGAAGCCTTTGGGTTTGAT	
COIII	LysL	CAGCACTAGCCTTTTAAGCT	
	COIIIRH	ATTATTCCGTATCGNAGNCCYTTTTG	8
	A5	TAGGAGTGTGCTTGGTGTGCCATT	
	ATP6L	AAAYATYTAATGGCACACCAAGC	
12S	Lphe 1248	AAAGCATGGCACTGAAGAYGCCAAG	
	Hval 2294	CTTTCAGGTGTAAGCTGARTGC	
	12SL 1735	GGATTAGATACCCCACTATGC	10
	12SH 1843	CCGCCAAGTCCTTAGAGTTT	11
16S	16SL 2702	CCTACCGAGCTGGGTGATAGCTGGTT	10
	Hleu 4017	GCTAGGGAGAGGATTTGAACCTC	6
	16SL 2477	TTGTACCGTAAGGGAAAGATG	12
	16SL 3312	CAATTGTCCATAAATCGAGACTTG	
	16SH 3447	AAGTTCCACAGGGTCTTCTCGTC	
	16Sa	AAGCCWANCGAGCYGGGTGATAGCTGG	8
	16Sc	TTCTTCAAGGTCCGCCCAACC	

Referências: 1- Groth e Barrowclough, 1999; 2- Kocher *et al.*, 1989; 3- Ribas, 2004; 4- Tavares *et al.*, 2004; 5- Ribas *et al.*, 2005; 6- Sorenson *et al.*, 1999; 7- Camila Ribas, comunicação pessoal; 8- Tavares *et al.*, 2006; 9- Amaral *et al.*, 2006; 10- Miyaki *et al.*, 1998; 11- Eberhard *et al.*, 2001; 12- Fábio S.R. Amaral, comunicação pessoal.

3.3 Extração e purificação do DNA

A extração do DNA total a partir de cada amostra de sangue [modificado de Bruford *et al.* (1992)] foi realizada em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, utilizando as seguintes soluções para a lise das células: 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, 8 µl de SDS 25%, 20 µl de proteinase K (25 mg/ml). Essa mistura foi incubada por 18 horas à 37°C. Em seguida, foi adicionado a cada tubo um volume igual de uma solução de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1) para a remoção das proteínas e dos restos celulares. O material foi então misturado e centrifugado a 12.000 rpm por 30 minutos para ter a separação das fases que contém o DNA e as proteínas. Após a centrifugação, a fase superior foi retirada com ponteiros com ponta cortada (o que diminui a quebra do DNA) e transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Para a precipitação do DNA, foram adicionados três volumes de Etanol 100% e feita uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante o DNA foi purificado utilizando Etanol 70% e ressuspendido em uma solução de TE (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0).

Após a extração, a qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, e também foi feita a quantificação por comparação com padrões de concentração conhecida (DNA lambda). O DNA foi visualizado com corante não tóxico GelRed (Biotium). Diluições de 5 a 20 ng/μl do DNA foram preparadas para posterior uso nas amplificações. Algumas amostras degradadas foram testadas sem serem diluídas e foi possível produzir sequências com elas.

3.4 Amplificação do DNA

As amplificações foram feitas por PCR com os *primers* apresentados na tabela 3, modificadas a partir das condições descritas por Tavares (2005): as reações de 25 μL foram montadas em tubos de microcentrífuga de 200 μl com solução tampão 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM), 2 μM de cada dNTP, 1 μM de cada iniciador 10 μM, 1 U de *Taq* polimerase (GE Healthcare) e 25-50 ng de DNA. As reações de PCR foram colocadas em termociclador TC9600 (Applied Biosystems) ou termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) nas condições descritas abaixo, dependendo do gene amplificado.

Para os genes 12S, 16S e citocromo B foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 60 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para o gene NADH2 foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 60 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 80 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para a região que contém fragmentos dos genes COIII, ATP6 e ATP8 foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 60 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 80 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

O gene nuclear RAG-1 é formado por um éxon de cerca de 2,7 kb, sem a presença de íntrons. Como esse segmento é grande demais para ser amplificado com apenas um par de *primers*, sua amplificação foi feita em três fragmentos de cerca de 1 kb cada (figura 8), seguindo Tavares e colaboradores

(2006). Para os fragmentos RA1 e RA3 do gene nuclear RAG-1 foi utilizado o seguinte programa *touch-down*: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de 95°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos, 72°C por 80 segundos, reduzindo em 1°C a cada ciclo que se seguia, seguido de 30 ciclos de 95°C por 40 segundos, 50°C por 40 segundos, 72°C por 80 segundos, e uma extensão final de 72°C por 20 minutos. Para o fragmento RA2 foi utilizado o seguinte programa *touch-down*: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de 95°C por 40 segundos, 65°C por 40 segundos, 72°C por 80 segundos, reduzindo em 1°C a cada ciclo que se seguia, seguido de 30 ciclos de 95°C por 40 segundos, 58°C por 40 segundos, 72°C por 80 segundos, e uma extensão final de 72°C por 20 minutos. Algumas amostras das espécies da América Central, obtidas por colaboração, não produziram bons produtos das porções RA1 e RA3 do gene RAG-1. Para resolver esse problema, foram desenhados novos *primers* para amplificar e sequenciar essas porções do gene (Tabela 3). Esses fragmentos amplificados com os *primers* desenhados foram denominados RA1x e RA3x (figura 8), amplificados nas mesmas condições do fragmento RA2, com a mesma eficiência dos fragmentos originais.

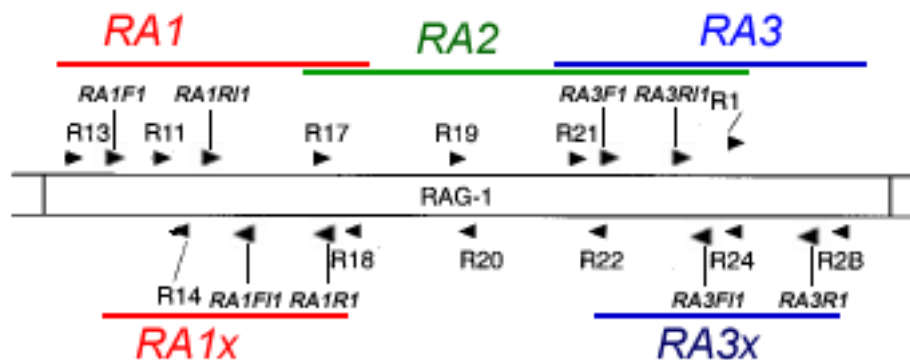


Figura 8: Esquema das ampliações do gene RAG-1 e demais *primers* utilizados no sequenciamento. Segmentos amplificados e seus respectivos *primers* são: segmento RA1 - *primers* R13 e R18, RA2 - R17 e R24, RA3 - R21 e R2B, RA1x - RA1F1 e RA1R1, e RA3x - RA3F1 e RA3R1. A orientação dos *primers* com números ímpares (R13, R17, e R21) segue a polaridade do gene (5' – 3', produzindo sequências denominadas proximais, 5') e a orientação dos *primers* com números pares (R18, R24 e R2B) é contrária à polaridade do gene (3' – 5', produzindo sequências denominadas distais, 3'). Os demais *primers* apresentados foram utilizados no sequenciamento. Figura modificada de Groth e Barrowclough (1999).

Cerca de 5 μ L do produto de cada reação foi usado na eletroforese em gel de agarose 1% contendo marcador de peso molecular (*DNA 1kb ladder*, GE Healthcare) para verificar se as bandas encontradas possuíam tamanhos esperados para cada gene e se havia produtos inespecíficos. Os segmentos amplificados foram purificados por precipitação com polietileno glicol 20% (Dunn e Blattner, 1987), ou utilizando as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 Sequenciamento do DNA amplificado

O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos amplificados e purificados de cada gene utilizando o *Kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), em placas contendo 0,5 μ L de solução Big Dye, 1 μ L de *primer* 10 μ M, 1,5 μ l de tampão 5X, de 10 a 400 ng de DNA dependendo do tamanho do produto e volume de água mili-Q para completar 10 μ l de reação total.

A reação de sequenciamento foi colocada em termociclador (TC9600, Applied Biosystems ou Mastercycler Gradient, Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos, e extensão final de 60°C por 10 minutos. Após a reação, os produtos foram precipitados utilizando Isopropanol 75% e Etanol 70%.

As sequências foram analisadas em sequenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems). Ambas as fitas do DNA foram sequenciadas. As análises dos eletroferogramas e os *contigs* das sequências *forward* e *reverse* de um mesmo gene foram feitas no programa *Codoncode* (GeneCodes Corp., que permite verificar ambiguidades nas fitas complementares de DNA). Para confirmar a identidade das sequências foi realizada uma comparação com sequências do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST (megablast disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).

3.6 Alinhamento das sequências

Os alinhamentos foram feitos utilizando a ferramenta ClustalW, no programa Bioedit (Hall, 1999) e cada alinhamento foi editado manualmente. Os alinhamentos foram editados para que todas as sequências possuíssem o mesmo tamanho e as diferentes partições pudessem ser unidas na análise

concatenada. Segmentos curtos no início ou no fim de alguns dos genes analisados cujas sequências não foram obtidas foram tratados como *missing data*. As matrizes de sequências alinhadas foram concatenadas no programa Mesquite (Maddison e Maddison, 2010).

3.7 Seleção dos modelos evolutivos

Os modelos evolutivos mais adequados para cada um dos genes foram selecionados pelo teste de razão de verossimilhança (*hierarchical likelihood ratio test*, LRT), utilizando o critério de informação Bayesiano para seleção do modelo mais adequado, executado no programa jModeltest (Posada e Crandall, 1998).

3.8 Análises por Máxima Verossimilhança (MV)

As análises de MV foram realizadas no programa RAxML 7.2.8 (Stamatakis *et al.*, 2005), executado no cluster *Cipres Science Gateway* (Miller *et al.*, 2010) utilizando cada gene separadamente, todas as sequências mitocondriais concatenadas e todas as sequências mitocondriais e nuclear concatenadas. O *bootstrap* foi realizado utilizando o *Rapid Bootstrap*, ferramenta incorporada no programa que acelera muito o processo de reamostragem e foi definido para encerrar automaticamente quando réplicas suficientes são feitas. Essa reamostragem é encerrada após alguns critérios serem atingidos, definidos pelo programa, buscando a convergência dos valores de suporte estatístico da busca por *bootstrap* (Stamatakis *et al.*, 2008).

3.9 Análises Bayesianas

Análises Bayesianas da matriz com todos os genes concatenados (mitocondrial e nuclear) foram realizadas utilizando o programa MrBayes 3.0 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) também implementado no cluster *Cipres Science Gateway* (Miller *et al.*, 2010). O método de amostragem empregado foi o *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), que considerou diferentes partições, de acordo com os parâmetros definidos para cada análise. Uma análise foi feita apenas com o gene nuclear RAG-1, considerando uma única partição com o modelo HKY (Hasegawa *et al.*, 1984; 1985). Outra análise foi feita para a partição mitocondrial concatenada, considerando cinco partições, uma para

cada gene com seu modelo específico, o que permite um refinamento da análise por considerar as substituições de cada gene separadamente. Uma última análise foi feita para a matriz concatenada total, considerando seis partições, uma para cada gene com seu modelo específico. Todas as análises foram feitas com duas corridas, que apresentavam quatro cadeias independentes, em 10 milhões de gerações, com amostragem a cada 1000 gerações. Ao final da análise foi aplicado um *burning* de 0.25 das árvores e os parâmetros amostrados foram verificados no programa Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond, 2009) para verificar a convergência dos parâmetros e das corridas.

3.10 Datação Molecular

Para a datação foi usada uma amostragem de taxons maior, com a adição das espécies *Amazona farinosa*, *Amazona xanthops*, *Bolborhynchus lineola*, *Brotogeris chiriri*, *Cacatua goffini*, *Graydidascalus brachyurus*, *Melopsittacus undulatus*, *Myiopsitta monachus*, *Nannopsittaca dachilleae*, *Pionopsitta barrabandi*, *Pionopsitta pileata*, *Pionus maximiliani*, *Strigops habroptilus* e *Trichilaria malachitacea*. Essa adição foi feita devido à calibração adotada, explicada a seguir. As análises de datação molecular foram executadas no programa BEAST 1.6.2 (Drummond e Rambaut, 2007), utilizando a abordagem de relógio molecular relaxado, que permite uma taxa de evolução não constante. Todas as análises com o BEAST foram rodadas no *cluster online Bioportal* (Kumar *et al.*, 2009). Utilizou-se programa BEAUTi 1.6.2 (Drummond e Rambaut, 2007) para definir as condições das análises. Para calibrar o relógio molecular foi adotado o mesmo procedimento de trabalhos anteriores (Tavares *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008) considerando a data de separação entre a Nova Zelândia e o restante da Gondwana (82 Ma.) como a data da divergência entre o gênero endêmico desta região, *Strigops*, do restante dos Psittaciformes. Para reduzir possíveis problemas como vieses na análise, o restante das sequências dos gêneros da tribo Arini amostrados em Tavares e colaboradores (2006) foram obtidas e analisadas apenas nas datações, assim como os gêneros de outros Psittaciformes *Melopsittacus*, *Cacatua* e *Strigops*. Os códigos de acesso do GenBank para essas sequências destes outros gêneros são apresentadas na Tabela 2. Como é possível verificar na tabela, não havia sequências disponíveis para os genes NADH2 e

citocromo B da espécie *Pionopsitta barrabandi*, assim como sequência do gene RAG-1 da espécie *Strigops habroptilus*. Como essa análise permite o uso de *missing data*, a datação foi feita utilizando essa matriz completa, procedimento semelhante ao adotado por Tavares e colaboradores (2006). O gene 16S não foi utilizado nessa análise, pois seus parâmetros não atingiam a convergência necessária após a adição das novas sequências à matriz, o que prejudicava as análises feitas na presença do gene, devido à sua heterogeneidade. Por ser o gene com menor tamanho e com menos sítios informativos que os codificantes mitocondriais, sua remoção não foi considerada um problema para as análises.

As análises foram feitas considerando modelos de substituição e relógios moleculares para cada um dos genes separadamente, utilizando quatro genes mitocondriais e o gene nuclear. O aumento do número de parâmetros, com o acréscimo de modelos de substituição e diferentes relógios, resultou em maior tempo de computação necessário e também dificultou a convergência dos parâmetros, que foi verificada no programa Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond, 2009). Para resolver o problema da convergência dos parâmetros, seguimos as orientações dos autores do programa BEAST (Drummond e Rambaut, 2007), aumentando o número de gerações da análise e reduzindo o intervalo entre a amostragem de parâmetros. Sendo assim, as nossas análises finais foram realizadas com 100 milhões de gerações, os parâmetros foram amostrados a cada mil gerações e as árvores a cada 10 mil gerações, o que resultou em 100 mil parâmetros amostrados e 10 mil árvores. A partir dessas 10 mil árvores foi obtida uma árvore consenso com o programa TreeAnnotator (Drummond e Rambaut, 2007), aplicando *burnin* de 10%.

3.11 Análises de Reconstrução de Área Ancestral

Análises Bayesianas de reconstrução de área ancestral foram realizadas no programa *RASP* (Yu *et al.*, 2011), com base no cronograma produzido na análise de datação molecular. Essa análise permite inferir as probabilidades de distribuição geográfica dos nós de uma árvore filogenética, com base na topologia da árvore e na distribuição atual dos táxons analisados, utilizando de análises Bayesianas. As análises foram feitas nas condições *default* do programa, porém com 500 mil ciclos e permitindo uma distribuição ampla ao ancestral comum a todos os táxons analisados. As áreas geográficas

consideradas na análise são: América Central, Caribe, Andes (e arredores), Amazônia, leste e sudeste da América do Sul, sul da América do Sul, Indonésia, Austrália e Nova Zelândia (áreas das Américas modificadas de Antonelli *et al.*, 2009; áreas fora das Américas são correspondentes aos dos grupos externos utilizados na datação).

4. Resultados

4.1 Análise das Sequências

As sequências parciais dos genes estudados foram produzidas a partir de produtos de 500 a 1500 pb, sendo a maioria em torno de 1000 pb. As únicas sequências que apresentaram *indels* em seus alinhamentos foram as dos genes rDNA 12S e rDNA 16S, os sítios que possuíam esses *indels* foram removidos dos alinhamentos finais, utilizados para as análises filogenéticas. O tamanho de cada sequência após a remoção dos *indels* dos genes 12S e 16S está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Comprimento das sequências (pb) de *Aratinga* e de *Nandays nenday* utilizadas nas matrizes finais. As sequências dos genes 12S e 16S tiveram seus sítios com *indels* removidos dos alinhamentos finais. Para alguns sítios das sequências mais curtas foi considerado *missing data* (*).

Espécie	12S	16S	NADH2	Cit B	COIII, ATP6, ATP8	RAG-1
<i>Aratinga acuticaudata</i>	990	641	894	888	899*	2620*
<i>Aratinga aurea</i> GB	990	603*	894	888	923	2703
<i>Aratinga auricapilla</i>	990	641	894	888	913*	2703
<i>Aratinga brevipes</i>	977*	641	894	888	923	2703
<i>Aratinga cactorum</i>	970*	641	894	746*	923	2703
<i>Aratinga canicularis</i>	990	641	894	888	923	2671*
<i>Aratinga chloroptera</i>	939*	641	894	888	923	2551*
<i>Aratinga erythrogenys</i>	974*	641	894	888	831*	2703
<i>Aratinga euops</i>	990	554*	894	888	923	2609*
<i>Aratinga finschi</i>	990	552*	894	888	923	2620*
<i>Aratinga holochlora</i>	990	641	894	888	923	2703
<i>Aratinga jandaya</i>	990	641	894	888	914*	2703
<i>Aratinga leucophthalmus</i> GB	826*	641	894	888	923	2703
<i>Aratinga maculata</i>	974*	641	894	888	923	2703
<i>Aratinga mitrata</i>	976*	641	894	888	923	2703
<i>Aratinga nana</i>	990	641	894	888	923	2639*
<i>Aratinga pertinax</i>	953*	641	894	746*	923	2703
<i>Aratinga rubritorquis</i>	990	614*	894	888	923	2559*
<i>Aratinga solstitialis</i>	940*	641	894	876*	923	2703
<i>Aratinga solstitialis</i> GB	913*	641	894	888	923	2703
<i>Aratinga wagleri</i>	990	641	894	888	923	2703
<i>Aratinga weddellii</i>	974*	641	894	888	865*	2675*
<i>Nandayus nenday</i> GB	953*	641	894	888	923	2703

Não foi encontrado nenhum códon de parada inesperado no quadro de leitura das sequências dos genes codificantes, o que sugere que não se tratam de pseudogenes dos genes-alvo. Os genes que apresentaram maior variação foram o NADH2 e o fragmento com porções do ATP8, ATP6 e COIII, seguidos pelo citocromo B, pelos genes ribossomais e o gene nuclear RAG-1 (Tabela 5). Isso era esperado, pois genes mitocondriais apresentam taxa de evolução maior que a de genes nucleares (Brown *et al.*, 1979, Quinn, 1997), e, como a porção do RAG-1 aqui sequenciada é um éxon, sua velocidade de evolução é ainda mais lenta.

Tabela 5: Características das matrizes de sequências alinhadas obtidas, com um total de 37 táxons. Modelo evolutivo e seus parâmetros e números de caracteres, de sítios variáveis e de sítios informativos para parcimônia. Intervalo de valores de distância-p entre pares de táxons.

Gene	Modelo evolutivo	Caracteres	Sítios variáveis	Sítios informativos	Distância-p
rDNA 12S	TN93 + G (0,6790) + I (0,4750)	990	325	202	0 a 14,4%
rDNA 16S	TN93 + G (0,4450) + I (0,4120)	641	221	126	0 a 13,6%
citocromo B COIII, ATP6, ATP8	TN93 + G (0,7790) + I (0,4770)	888	369	266	0,1 a 16,1%
	TN93 + G (0,2270) GTR + G (1,0380)	923	421	317	0,2 a 18,5%
NADH2	+ I (0,3750)	894	464	323	0,3 a 18,2%
RAG-1	HKY	2703	174	31	0 a 3,4%

TN93 – Modelo de Tamura-Nei 93 (Tamura e Nei, 1993); GTR – Modelo Geral de Reversão ao Longo do Tempo (Rodrigues *et al.*, 1990); HKY – Modelo de Hasegawa Kishino e Yano (Hasegawa *et al.*, 1985); G – Valor do parâmetro alfa que determina a distribuição Gamma; I – Valor relativo a proporção dos sítios invariáveis.

4.2 Análises filogenéticas

A matriz dos genes mitocondriais concatenados possuía 4336 caracteres e a matriz concatenada de todos os genes apresentou 7039 caracteres. Há alguns táxons com *missing data* no início ou no final das sequências de alguns genes (tabela 4) devido a dificuldades no sequenciamento, ou por serem sequências do GenBank mais curtas. A quantidade de *missing data* (extremidades de alguns genes de alguns táxons) não deve ter prejudicado as análises, visto que em estudos de simulação com quantidades variadas de

missing data (analisando de valores mínimos até 50% de *missing data*) a influência nos resultados foi insignificante quando baixos valores de *missing data* eram testados (Wiens, 2003; 2006; Wiens e Moen, 2008). Ainda assim, foram feitas as mesmas análises apresentadas a seguir para matrizes em que os sítios com *missing data* foram removidos e os resultados (dados não apresentados) foram congruentes com as filogenias apresentadas a seguir.

4.2.1 Análises de Máxima Verossimilhança

As análises filogenéticas por máxima verossimilhança baseadas em cada gene mitocondrial resultaram em topologias congruentes (dados não apresentados) com a da análise baseada na matriz mitocondrial concatenada, porém com menores valores de suporte estatístico para as relações dentro e entre os clados que continham espécies do gênero *Aratinga*. A árvore da matriz mitocondrial concatenada (figura 9) apresentou alto suporte estatístico para quatro clados contendo espécies do gênero *Aratinga*, porém não houve resolução suficiente para estabelecer a relação entre esses clados. Os suportes dos nós que sustentam as relações dentro desses clados são em geral altos. Foi observada grande divergência entre o grupo interno e o gênero *Forpus*, o que já havia sido encontrado em Tavares e colaboradores (2006).

A árvore obtida baseada na análise do gene nuclear (figura 10) apresentou resolução menor e valores de *bootstrap* mais baixos. No entanto, foram recuperados os mesmos quatro clados que contêm espécies do gênero *Aratinga* baseados nos dados mitocondriais. A única exceção é que *A. weddellii* não se agrupa com as espécies do grupo *solstitialis*, possivelmente devido à grande divergência dessa espécie com o restante do clado *solstitialis*, como é possível verificar na árvore baseada na partição mitocondrial (figura 9).

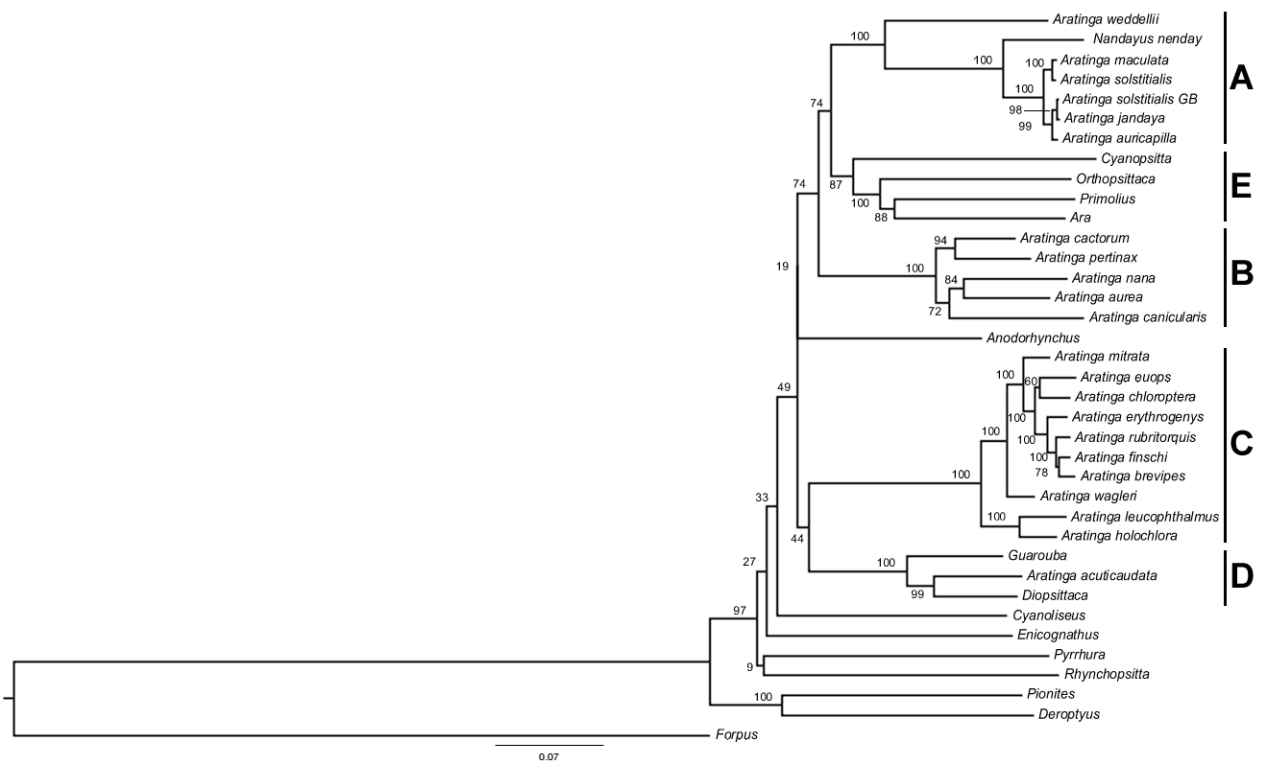


Figura 9: Análise de máxima verossimilhança baseada em 4336 pb dos genes mitocondriais concatenados (12S, 16S, cit B, COIII, ATP6, ATP8 e ND2). Clados A a D contém espécies do gênero *Aratinga*. Valores de *bootstrap* são apresentados nos nós.

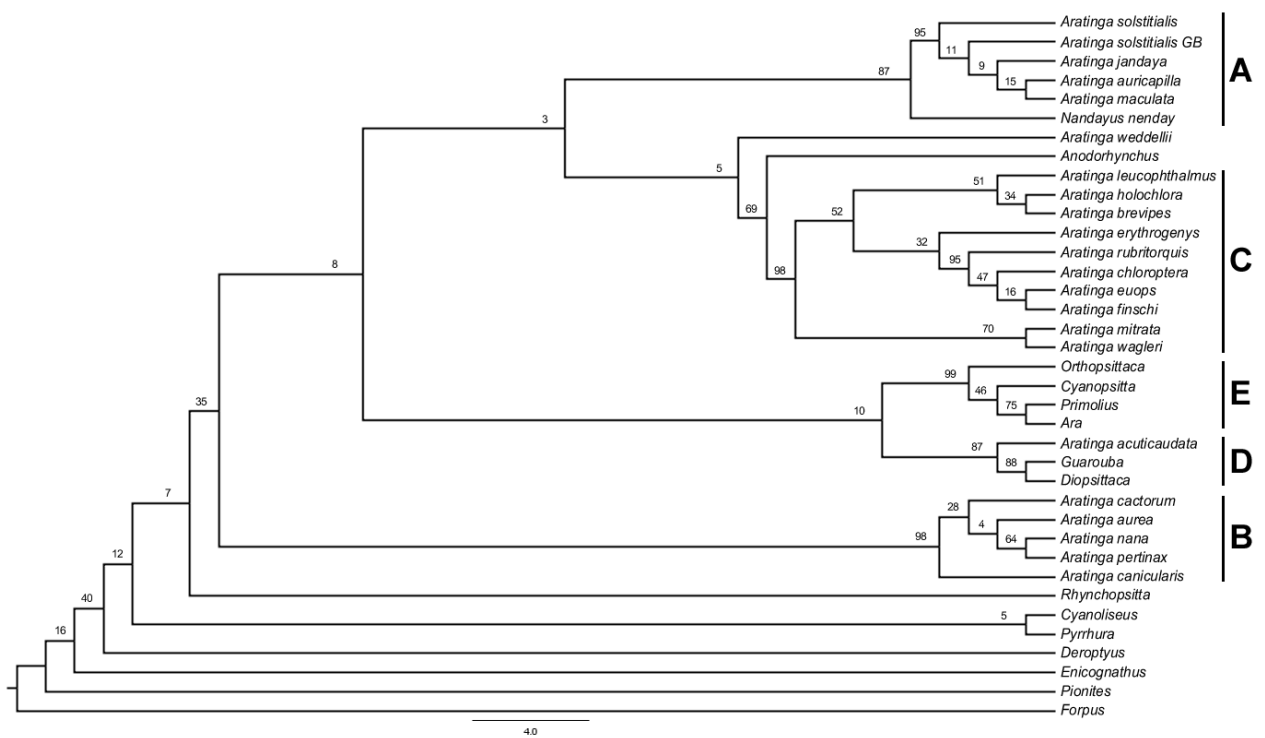


Figura 10: Análise de máxima verossimilhança baseada em 2703 pb do gene nuclear RAG-1. O tamanho do ramo de *Forpus* foi diminuído para permitir que coubesse na figura. Clados A a D contém espécies do gênero *Aratinga*. Valores de *bootstrap* são apresentados nos nós.

4.2.2 Análises Bayesianas

A análise Bayesiana baseada na matriz mitocondrial concatenada resultou em uma topologia muito similar à análise por máxima verossimilhança (figura 11). Os mesmos quatro clados com espécies do gênero *Aratinga* foram encontrados com suporte estatístico máximo (probabilidade posterior 1.0) e suporte estatístico alto para as relações entre a maioria dos clados (probabilidade posterior superior ou igual a 0.95).

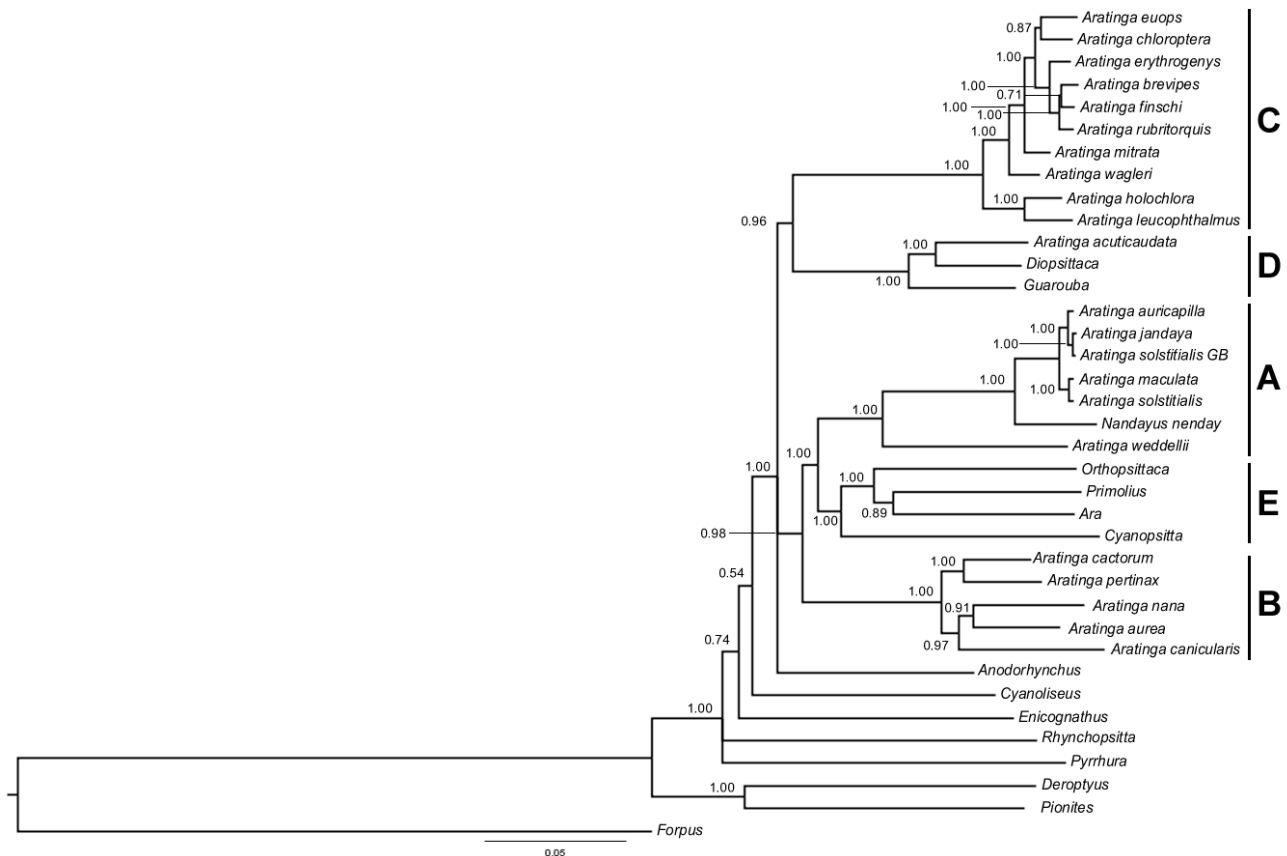


Figura 11: Análise Bayesiana baseada em 4336 pb dos genes mitocondriais concatenados (12S, 16S, cit B, COIII, ATP6, ATP8 e ND2). Clados A a D contém espécies do gênero *Aratinga*. Valores de probabilidades posteriores são apresentados nos nós.

Devido à grande divergência do gênero *Forpus* em relação aos demais táxons analisados e como foram encontrados altos suportes estatísticos tanto para o nó que sustenta a relação de grupo-irmão dos gêneros *Deroptyus* e *Pionites*, como para o nó que sustenta o restante das espécies do grupo interno, foi realizada uma análise sem o gênero *Forpus*, mas considerando o clado (*Deroptyus*, *Pionites*) como grupo externo (figura 12). A análise sem

Forpus resultou em uma árvore com topologia muito similar, com suportes estatísticos quase idênticos aos clados encontrados.

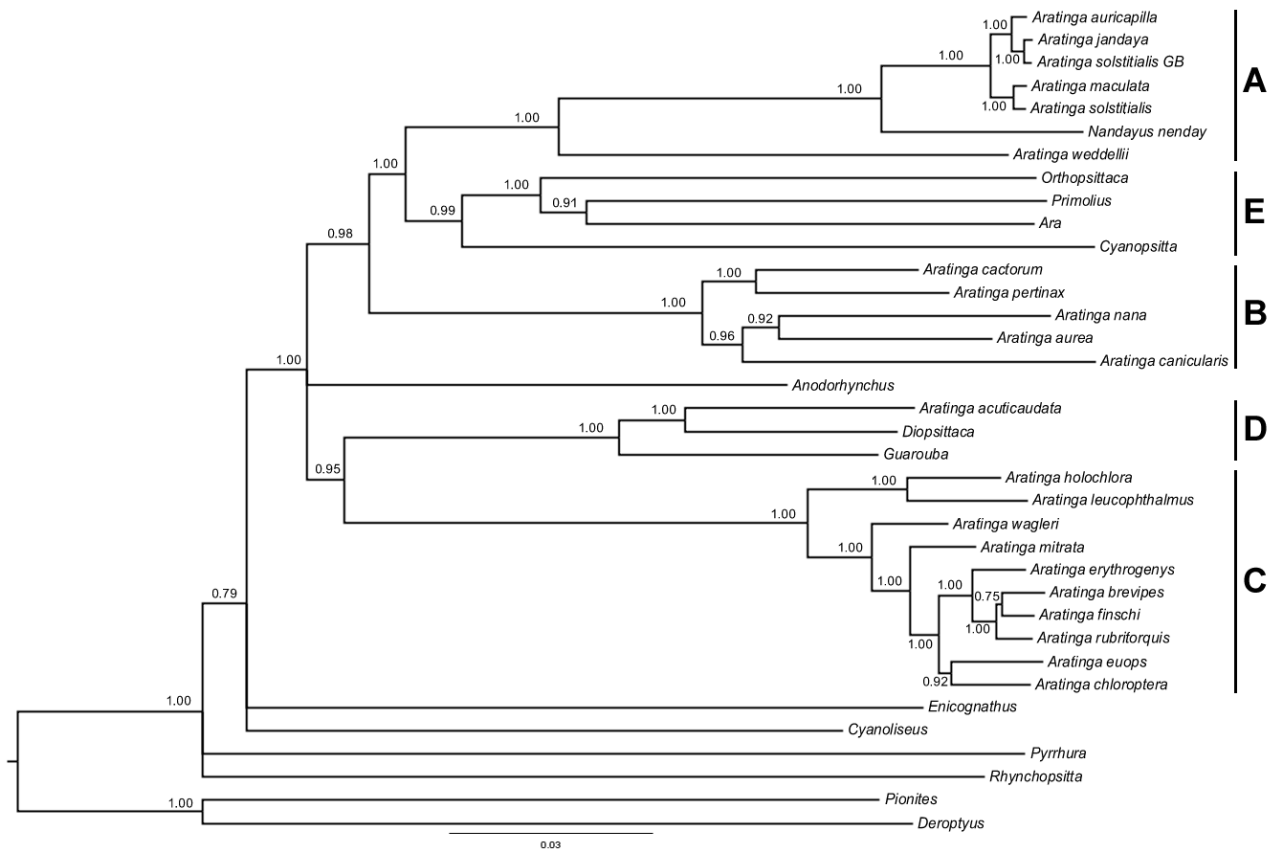


Figura 12: Análise Bayesiana baseada em 4336 pb dos genes mitocondriais concatenados (12S, 16S, cit B, COIII, ATP6, ATP8 e ND2) sem *Forpus*. Clados A a D contém espécies do gênero *Aratinga*. Valores de probabilidades posteriores são apresentados nos nós.

A análise Bayesiana baseada nos dados do gene nuclear RAG-1 (figura 13) resultou em uma topologia similar à encontrada na análise de máxima verossimilhança, porém com um pouco mais de resolução e de suporte dos nós. Os quatro clados que contêm espécies do gênero *Aratinga* também foram encontrados com altos suportes estatísticos, porém, novamente *A. weddellii* não foi posicionada no clado em que foi encontrada na análise da matriz mitocondrial. O restante das relações dentro dos clados e entre os clados segue mal resolvida.

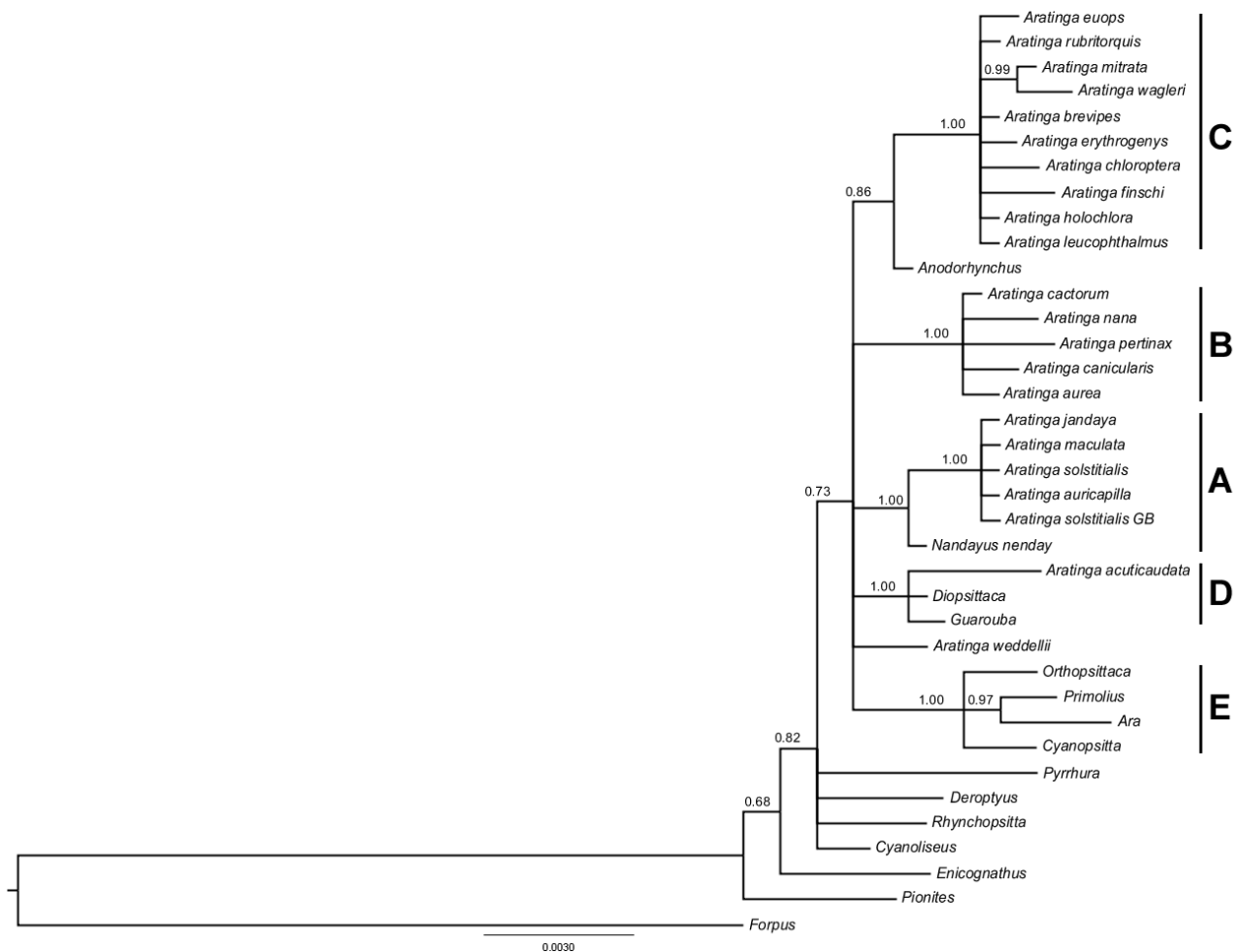


Figura 13: Análise Bayesiana baseada em 2703 pb do gene RAG-1. Clados A a D contém espécies do gênero *Aratinga*. Valores de probabilidades posteriores são apresentados nos nós.

A análise da matriz concatenada total (figura 14) resultou em uma topologia muito similar àquela obtida baseada na matriz mitocondrial, com alto suporte para praticamente todos os mesmos nós. Os quatro clados que apresentam espécies do gênero *Aratinga* possuem probabilidades posteriores máximas e foram nomeados A a D (figura 14). A maioria das relações dentro e entre alguns dos clados foi bem resolvida. O único nó que apresentou incongruência com a topologia baseada na matriz mitocondrial (figura 11) foi o que sustenta a relação entre os clados C e D (prob. posterior de 0.95) que não foi encontrado na análise baseada na matriz concatenada total (figura 14). Porém, como na análise baseada na matriz mitocondrial esse suporte é limítrofe, a relação de proximidade entre esses clados deve ser considerada com cautela.

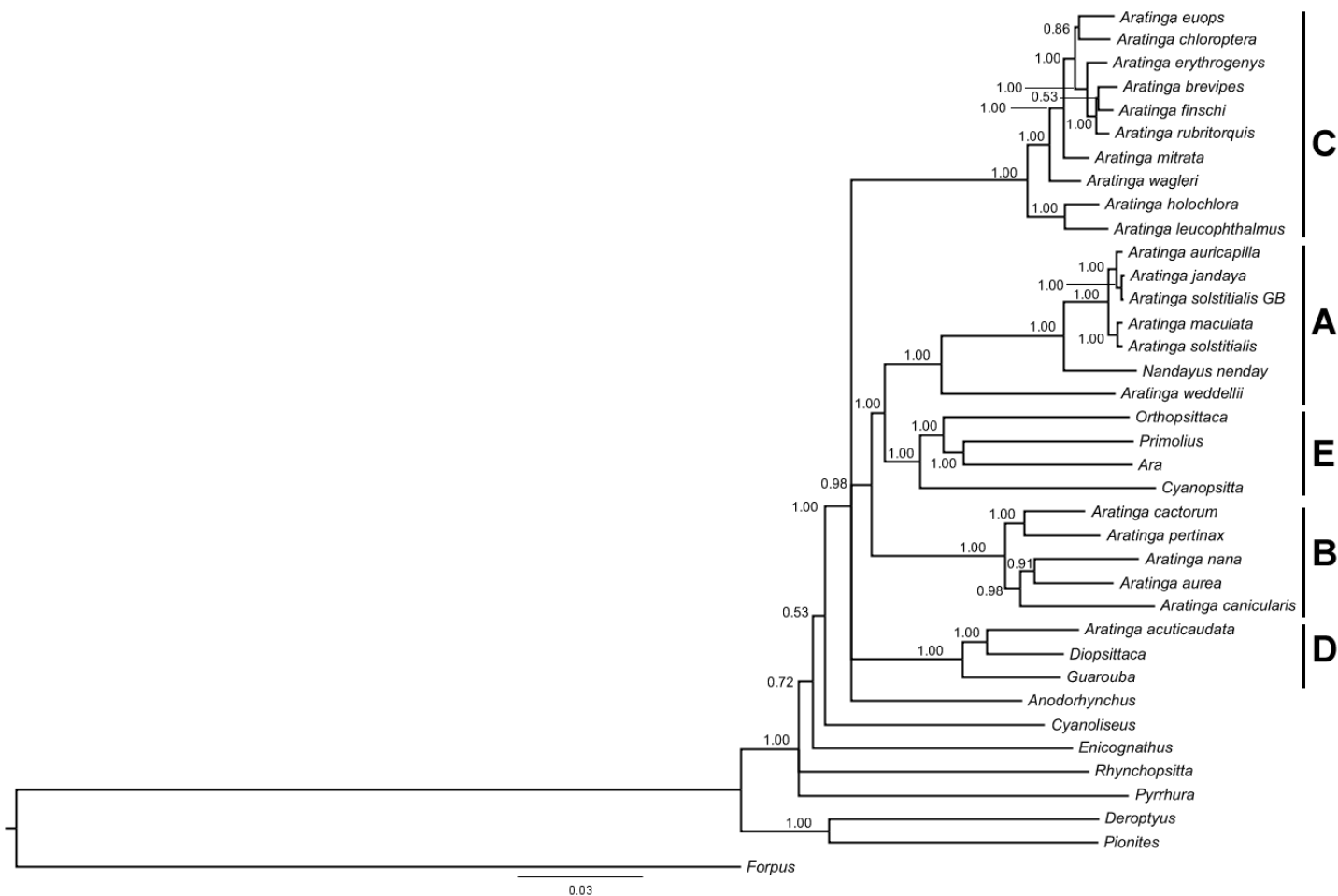


Figura 14: Análise Bayesiana baseada em 7039 pb da matriz concatenada dos genes mitocondriais (12S, 16S, cit B, COIII, ATP6, ATP8 e ND2) e nuclear RAG-1. Clados A a D contém espécies do gênero *Aratinga*. Valores de probabilidades posteriores são apresentados nos nós.

4.3 Datação Molecular

A convergência dos parâmetros das análises no BEAST foi boa, atingindo o limiar estabelecido pelos autores para considerar a análise confiável (Drummond e Rambaut, 2007). Como os cronogramas resultantes das análises nesse programa são obrigatoriamente bifurcantes, deve-se ter cautela na sua interpretação. No presente estudo a maioria dos nós do cronograma obtido (figura 15) apresenta baixo valor de probabilidade posterior e esses nós deveriam ser considerados como politomias. Assim, foram considerados apenas os nós com probabilidade posterior mínima de 0.5 que é considerada como aceitável na análise do TreeAnotator (Drummond e Rambaut, 2007). As datas médias encontradas para esses nós (ver figura 15), assim como seus intervalos de 95% de confiança, são apresentados na Tabela 6.

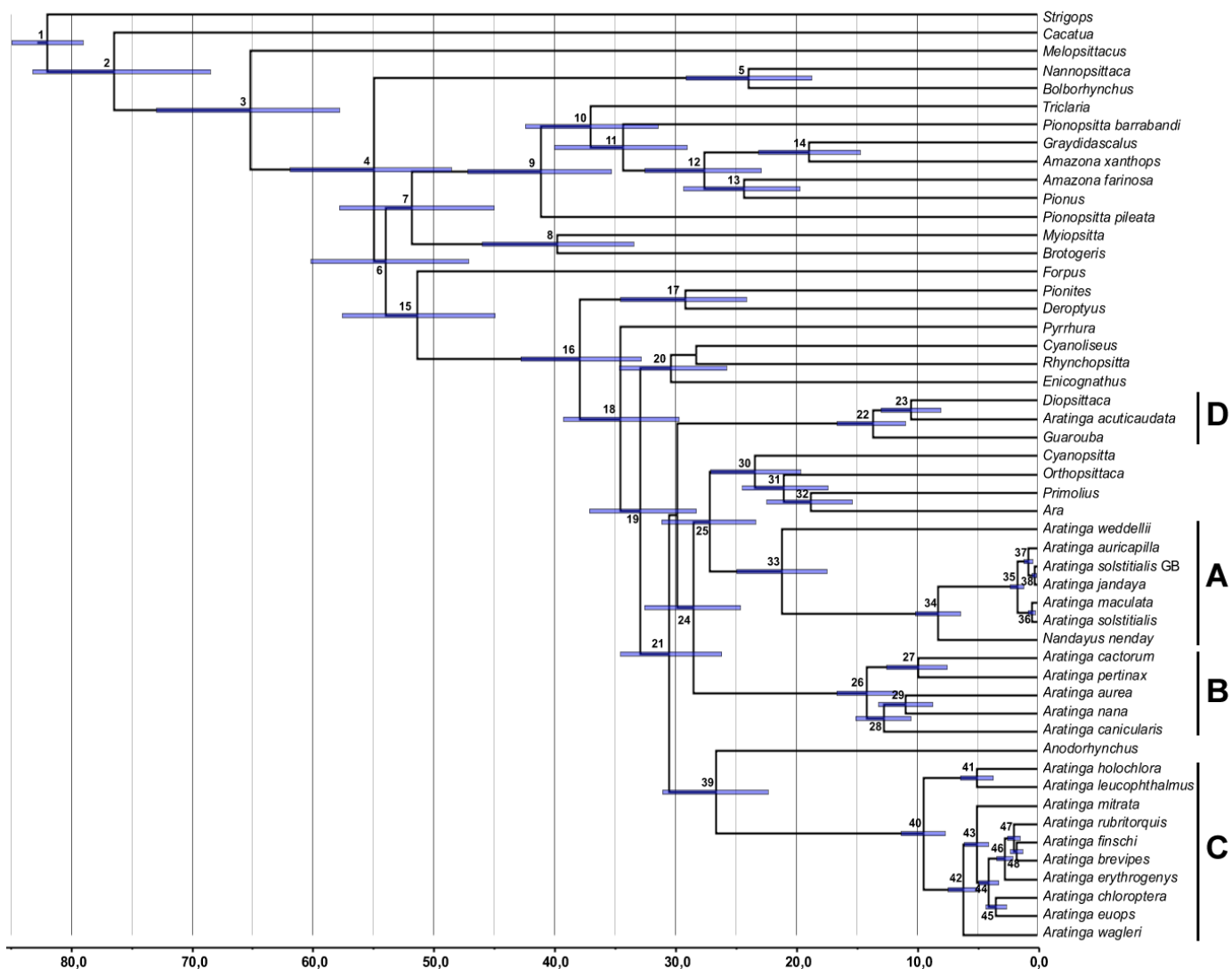


Figura 15: Cronograma com as datas de divergência encontradas para todos os táxons analisados. Idades em milhões de anos atrás (Ma.). À direita estão indicados os clados que contêm espécies do gênero *Aratinga*.

O cronograma mostra certa variação nas datas de início de divergência dentro dos diferentes clados que incluem representantes do gênero *Aratinga*. O início das diversificações nos clados B e D parece coincidente, mas o do clado A parece ser mais antigo e o do clado C, mais recente. A diversificação da tribo Arini parece indicar uma irradiação entre 40 e 20 Ma., o que também foi encontrado por Tavares e colaboradores (2006). Vale ressaltar que as datas encontradas em nossa análise foram mais antigas. Com base no cronograma encontrado foi feita uma análise de reconstrução de área ancestral (figura 16), com o objetivo de estudar a biogeografia das espécies do gênero *Aratinga*.

Tabela 6: Datas de divergência de nós com suporte aceitável (ver figura 15) e seus respectivos intervalos de 95% de confiança (95% HPD).

Nó	Data média (Ma.)	95% HPD (Ma.)	Nó	Data média (Ma.)	95% HPD (Ma.)
1	81,98	79,03 - 84,94	25	27,16	23,35 - 31,14
2	76,46	68,50 - 83,21	26	14,17	11,59 - 16,65
3	65,22	57,79 - 72,95	27	9,87	7,48 - 12,51
4	54,92	48,53 - 61,96	28	12,76	10,50 - 15,08
5	23,93	18,71 - 29,13	29	10,95	8,68 - 13,18
6	53,97	47,11 - 60,18	30	23,39	19,65 - 27,07
7	51,80	44,99 - 57,82	31	21,01	17,36 - 24,44
8	39,77	33,45 - 45,98	32	18,79	15,37 - 22,43
9	41,10	35,27 - 47,20	33	21,21	17,45 - 24,92
10	37,05	31,44 - 42,42	34	8,29	6,40 - 10,15
11	34,32	29,02 - 40,01	35	1,71	1,17 - 2,30
12	27,59	22,87 - 32,51	36	0,5	0,22 - 0,81
13	24,34	19,69 - 32,52	37	0,76	0,43 - 1,13
14	18,90	14,70 - 23,09	38	0,27	0,08 - 0,48
15	51,38	44,9 - 57,58	39	26,61	22,33 - 31,07
16	37,95	32,82 - 42,80	40	9,48	7,67 - 11,30
17	29,20	24,13 - 34,52	41	5,08	3,67 - 6,42
18	34,56	29,69 - 39,28	42	6,19	4,89 - 7,40
19	32,91	28,25 - 37,12	43	5,07	4,08 - 6,10
20	30,34	25,77 - 34,62	44	4,05	3,22 - 4,89
21	30,51	26,16 - 34,53	45	3,46	2,61 - 4,29
22	13,67	10,96 - 16,60	46	2,75	2,08 - 3,40
23	10,49	8,02 - 12,99	47	1,97	1,46 - 2,52
24	28,51	24,61 - 32,57	48	1,73	1,26 - 2,26

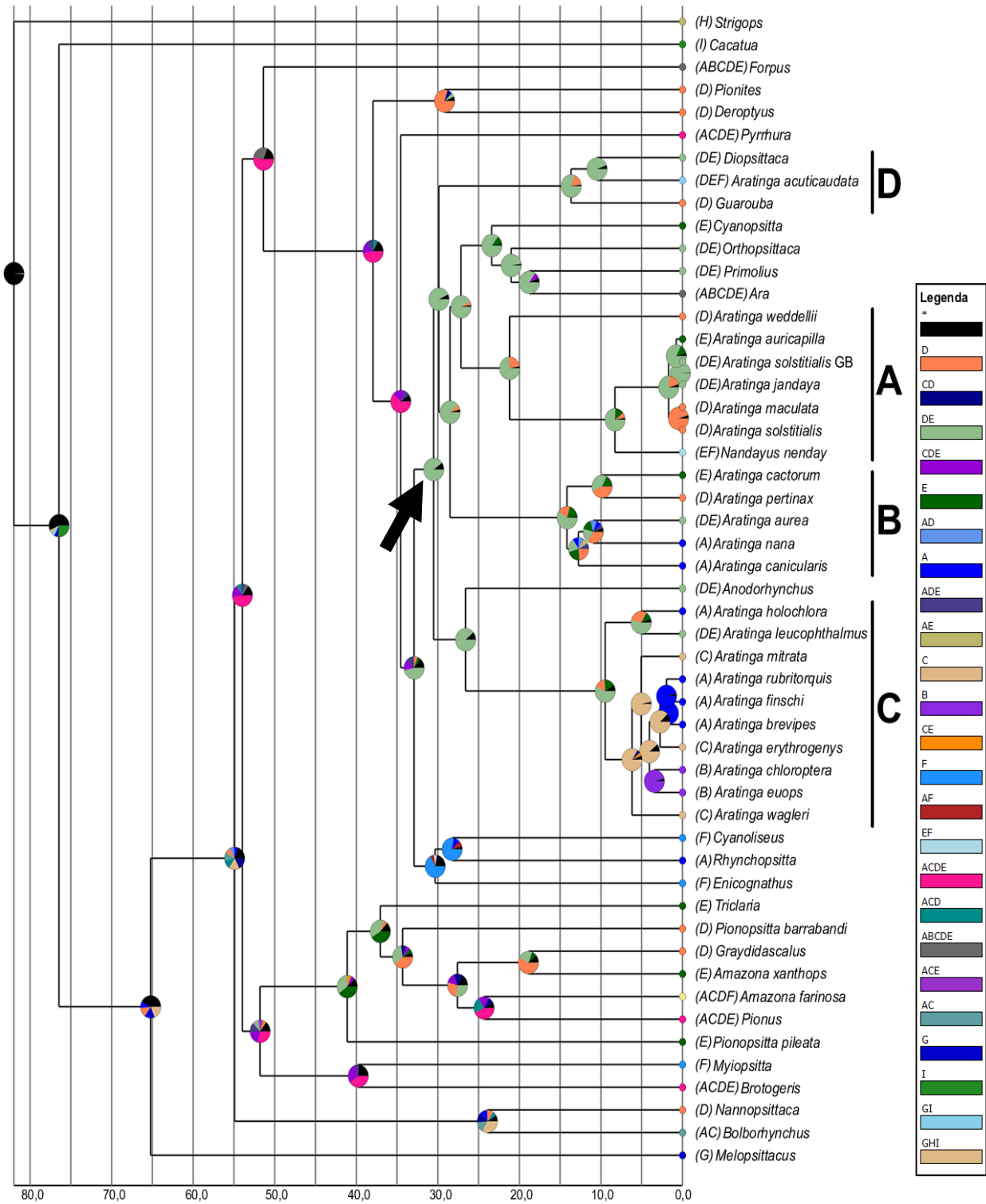


Figura 16: Cronograma da análise de reconstrução de área ancestral. Gráficos nos nós mostram as probabilidades das áreas ancestrais. Idade em milhões de anos atrás (Ma.). As áreas de distribuição foram definidas como: A- América Central, B- Caribe, C- Andes, D- Amazônia, E- leste e sudeste da América do Sul, F- sul da América do Sul, G- Austrália, H- Nova Zelândia, I- Indonésia (com base em Antonelli *et al.*, 2009). O asterisco se refere a áreas ancestrais incertas. A flecha indica o nó que delimita o grupo que será discutido a seguir.

5. Discussão

5.1 Sistemática do gênero *Aratinga*

A monofilia do gênero *Aratinga* não foi corroborada em nenhuma de nossas análises, porém as espécies do gênero apresentaram-se agrupadas em quatro clados bem suportados. A discussão a seguir terá como base a filogenia inferida pelo método Bayesiano, com base na matriz concatenada completa (7039 pb de todos os genes mitocondriais e do gene nuclear, figura 14). Três dos clados obtidos (A, B e C; figura 1) apresentam certa congruência com os grupos morfológicos propostos por Silveira e colaboradores (2005). A única incongruência é a sugestão de Silveira e colaboradores (2005) de posicionar *A. acuticaudata* no grupo *A. leucophthalmus*, enquanto no nosso estudo *A. acuticaudata* se encontra no clado D, proximoamente relacionada com os gêneros monoespecíficos *Diopsittaca* e *Guarouba*.

O clado A é congruente com o grupo *A. solstitialis* (*A. solstitialis*, *A. maculata*, *A. jandaya*, *A. auricapilla*, *A. weddellii* e *Nandayus nenday*) de Silveira e colaboradores (2005). Este clado apresentou as mesmas relações filogenéticas encontradas em Ribas e Miyaki (2004). *A. solstitialis* (não “*A. solstitialis* GB” com possível erro de identificação, ver a seguir) aparece como espécie irmã de *A. maculata* (figura 14). Isso era esperado, visto que essas duas espécies possuem grande semelhança morfológica e o táxon *A. maculata* já foi considerado como sinônimo mais recente de *A. solstitialis*. O grupo-irmão desse clado é o que contém as espécies irmãs *A. auricapilla* e *A. jandaya* (figura 14). Porém, é possível notar que o espécime obtido no GenBank identificado como *A. solstitialis* apresentou sequências praticamente idênticas às de *A. jandaya* (distância-p de 0,2% baseada nos genes mitocondriais concatenados, ver anexo I) e distância-p maior com *A. solstitialis* e *A. maculata* (0,8% e 0,9%, respectivamente). Isso poderia ser uma evidência de fluxo gênico entre as duas espécies, retenção de polimorfismo ancestral ou mesmo um erro de identificação do espécime depositado no GenBank. Nos parece mais plausível o erro de identificação do espécime, visto que a monofilia dessas espécies foi verificada anteriormente em um trabalho com maior amostragem de cada espécie (Ribas e Miyaki, 2004). O táxon monotípico *Nandayus nenday* aparece como grupo-irmão do clado que contém essas

espécies já mencionadas (figura 14). Finalmente, *A. weddellii* parece ser grupo-irmão relativamente distante de todo esse clado (clado *A. solstitialis*, figura 14).

O clado B é congruente com o grupo *A. pertinax* (*A. pertinax*, *A. cactorum*, *A. aurea*, *A. canicularis*, *A. nana*) de Silveira e colaboradores (2005). A espécie *A. pertinax* aparece como irmã de *A. cactorum* e esse clado parece ser grupo irmão do clado com as demais espécies do grupo (figura 14). As relações entre *A. aurea*, *A. nana* e *A. canicularis* não foram bem resolvidas devido ao baixo suporte estatístico do nó que sustenta uma possível relação de espécies-irmãs entre *A. aurea* e *A. nana* (figura 14).

O clado C é congruente com o grupo *A. leucophthalmus* (*A. leucophthalmus*, *A. holochlora*, *A. wagleri*, *A. mitrata*, *A. euops*, *A. chloroptera*, *A. erythrogegens*, *A. rubritorquis*, *A. finschi*, *A. brevipes*) de Silveira e colaboradores (2005), com exceção da ausência de *A. acuticaudata*, que, pelos resultados obtidos no presente estudo, parece estar proximamente relacionada com espécies de outros gêneros. No trabalho de Silveira e colaboradores (2005) a nomenclatura das espécies do gênero *Aratinga* foi baseada em Collar (1997) que considera *A. strenua* como subespécie de *A. holochlora* devido à similaridade morfológica. Assim, no presente trabalho assumimos que *A. strenua*, considerada como espécie plena por Clements (2000), deve fazer parte do grupo *A. leucophthalmus*. Em nossas análises *A. holochlora* aparece como irmã de *A. leucophthalmus* e esse clado parece ser irmão do clado que contém as demais espécies do grupo (figura 14). Esse clado com as demais espécies do grupo apresenta um nó com suporte máximo que sustenta a relação entre *A. brevipes*, *A. finschi* e *A. rubritorquis*, porém sem resolução nas relações dentro do grupo. *A. erythrogegens* aparece como irmão desse grupo, sendo esse clado relacionado a *A. euops* e *A. chloroptera*, porém não há resolução na relação entre essas três linhagens (figura 14). *A. mitrata* aparece como grupo-irmão do clado que inclui essas três linhagens e, por sua vez, *A. wagleri* parece ser irmã de todo esse clado (figura 14).

Em nenhuma das análises as 21 das 22 espécies do gênero *Aratinga* apresentaram-se reunidas em um clado monofilético. Além disso, a relação mais próxima de algumas espécies de *Aratinga* com outros gêneros (*Nandayus*, *Diopsittaca*, *Guarouba*) indica que monofilia do gênero deve ser rejeitada. O clado A aparece como grupo-irmão do clado E que contém os

gêneros *Ara*, *Primolius*, *Orthopsittaca* e *Cyanopsitta*, com suporte máximo (figura 14). Esse grupo (clado A, clado E), por sua vez, parece ser irmão do clado B, com um alto suporte (figura 14). A presença de *A. acuticaudata* no clado D, que contém os gêneros *Diopsittaca* e *Guarouba* (figura 14) é uma evidência que *A. acuticaudata* não apresenta relação próxima com nenhuma outra espécie do gênero, o que reforça a necessidade de uma revisão taxonômica ampla. Na análise baseada apenas na partição mitocondrial foi encontrado alto suporte para a relação de irmãos entre os clados C e D (figura 11), mas na análise concatenada total essa relação não foi encontrada (figura 14). O clado que contém todas as espécies de *Aratinga* e que possui alto suporte (no caso, o suporte é máximo), inclui representantes de outros gêneros e apresenta uma politomia basal com quatro ramos (figura 14): 1) clado C, 2) cladros A, E e B; 3) clado D, 4) *Anodorhynchus*. Esse resultado reforça ainda mais a ausência de monofilia do gênero.

5.2 Datas de divergência e Biogeografia

A data média estimada para a origem da tribo Arini no início do Eoceno (aproximadamente 55 Ma., figura 15) foi concordante com estimativas anteriores (Tavares *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008). As datas estimadas das divergências dentro da tribo Arini apresentaram valores um pouco mais antigos que os encontrados em Tavares e colaboradores (2006), o que pode estar relacionado ao fato de o método de análise Bayesiana empregado na nossa análise ser diferente do método empregado por Tavares e colaboradores (2006). Porém, as relações entre os táxons foram similares nos dois estudos. A divergência da tribo Arini em relação aos táxons de outras regiões do planeta parece congruente com a separação entre a Austrália e a Antártica, o que já havia sido encontrado em trabalhos anteriores (Tavares *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008). Como esperado, por se tratar do mesmo conjunto de dados de sequências, a diversificação do clado suportado pelo nó 7 da figura 15 é congruente com a diversificação do clado de papagaios, caturritas curicas e afins de Tavares e colaboradores (2006). Esses autores sugeriram que a diversificação encontrada poderia ser explicada pela colonização da América do Sul a partir da Antártica. Também foi proposto pelos autores que os ancestrais do clado de pequenos periquitos (clado suportado pelo nó 5, figura

15) e de parte das espécies do clado de araras, marianinhas, tiribas e afins (clado suportado pelo nó 15, figura 15) podem ter ficado isolados na Antártica (ou no sul da América do Sul) até o resfriamento do clima e o congelamento desta massa continental há cerca de 35 Ma. (Dingle e Lavelle, 1998; Shevenall *et al.*, 2004), colonizando a América do Sul neste período. Nossa análise é concordante com este cenário, visto que a grande diversificação de gêneros do clado suportado pelo nó 15 ocorreu entre 40 e 30 Ma., o que pode corresponder à colonização da América do Sul a partir da Antártida seguida de uma rápida diversificação. É preciso destacar que as análises de reconstrução de área ancestral devem ser consideradas com cautela, pois alguns táxons viventes com distribuições relativamente extensas estão relacionados com nós com distribuições inferidas muito inesperadas. Isso ocorreu em nós mais próximos a raiz da árvore, o que é relativamente comum nesse tipo de análise (Ronquist, 1997). Outro problema que devemos destacar é que alguns gêneros analisados na datação apresentam apenas um representante, logo a reconstrução das distribuições de seus nós ancestrais deveria ser discutida apenas em análises com amostragem mais representativa. A discussão a seguir tratará apenas dos clados com alto suporte em que estão inseridas espécies do gênero *Aratinga*.

O nó com alto suporte estatístico que contém os clados com espécies de *Aratinga* e outros gêneros relacionados (indicado por flecha na figura 16) foi estimado em cerca de 30 Ma., durante o Oligoceno. O ancestral desse clado apresentou alta probabilidade de ter possuído distribuição ampla na América do Sul: na Amazônia e no leste e sudeste da América do Sul (figura 16), assim como os seus descendentes diretos. Já os táxons contemporâneos, ocorrem em ambientes que podem ser mais restritos. A diversificação das linhagens que incluem representantes do gênero *Aratinga* foi relativamente complexa e envolveu eventos em diferentes períodos de tempo. A seguir comentamos os achados de cada clado observado.

Clado A

Dentre os grupos que contém espécies do gênero *Aratinga*, a divergência inicial mais antiga foi observada no clado A, com *A. weddellii* se

separando do restante do grupo (21 Ma.) e a maioria das demais diversificações tendo ocorrido durante o Pleistoceno (após 2 Ma., figura 17).

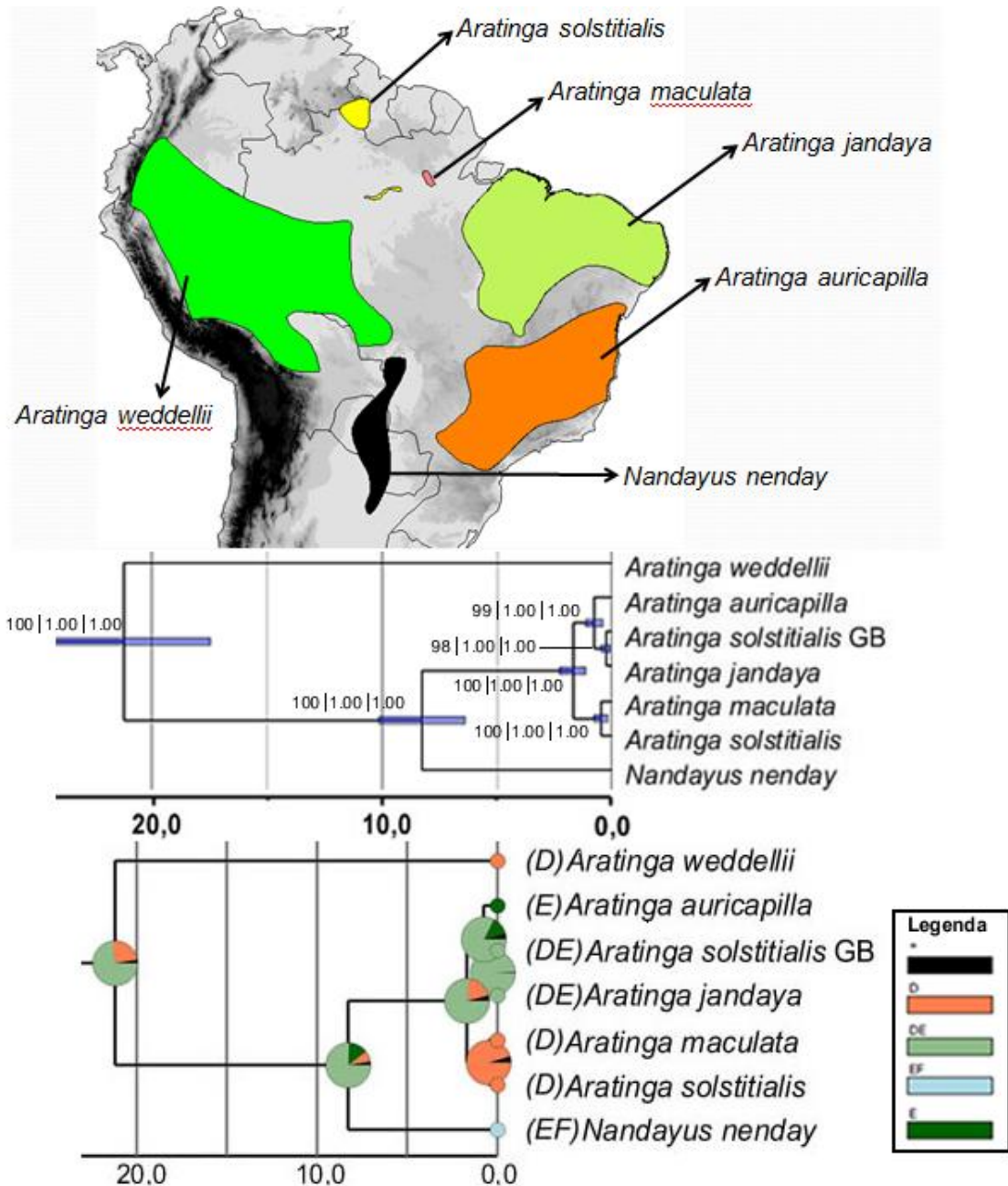


Figura 17: Distribuição geográfica das espécies do clado A, cronograma com as datas de divergência e reconstrução de área ancestral do clado. Valores ao lado dos nós do cronograma se referem ao *bootstrap* da análise mitocondrial de máxima verossimilhança e às probabilidades posteriores das análises Bayesianas (mitocondrial e nuclear) no MrBayes e no BEAST, respectivamente. Regiões: D- Amazônia, E- leste e sudeste da América do Sul, F- sul da América do Sul, *- distribuição incerta.

As datas de divergência entre representantes do clado A já haviam sido estimadas em outro trabalho utilizando uma metodologia de calibração diferente (Ribas e Miyaki, 2004). Nesse estudo anterior foram adotadas duas taxas fixas de substituição estimadas em diferentes trabalhos, uma utilizando a taxa geral para o DNA mitocondrial de 2% de substituição por milhão de ano (Randi, 1996) e outra utilizando uma taxa mais lenta de 1,6% (Fleischer *et al.*, 1998). As datas encontradas no presente estudo para as divergências dentro do clado A foram mais antigas do que aquelas publicadas anteriormente (Ribas e Miyaki, 2004). No entanto, não é tão simples comparar esses dois estudos, pois os objetivos deles foram diferentes. A amostragem da tribo Arini no presente trabalho foi mais completa, assim como a quantidade de genes analisados, além disso, a calibração foi feita com base em um evento geológico muito antigo (separação da Nova Zelândia do restante da Gondwana, 82 Ma.).

Com base na reconstrução de área ancestral (figura 17), o nó que representa o ancestral comum de todo o grupo tem uma alta probabilidade de ter uma distribuição ampla, possivelmente habitando regiões amazônicas e do leste da América do Sul, porém é possível também uma origem exclusivamente amazônica. A divergência entre *A. weddellii* e o clado que sustenta o restante do grupo data de 21 Ma., no início do Mioceno. Nessa época houve a formação do sistema Pebas no oeste da Amazônia, um sistema pantanoso com lagos rasos (Hoorn *et al.*, 2010), correspondente com o atual habitat da espécie de floresta de várzea, vegetação ribeirinha e matas pantanosas, evitando regiões de terra firme (Collar, 1997). A divergência de *Nandayus neday* com o restante do grupo data de 8 Ma., no fim do Mioceno, o que poderia corresponder à colonização da região leste da Amazônia no período da formação do atual rio Amazonas pela linhagem que deu origem às espécies *A. auricapilla*, *A. jandaya*, *A. solstitialis* e *A. maculata* (formação atual do rio consolidada por volta de 7 Ma., Figueiredo *et al.*, 2009; 2010). Um padrão biogeográfico similar da diversificação desse grupo já havia sido proposto por Ribas e Miyaki (2004). Nesse estudo sugere-se que a linhagem irmã de *A. weddellii* possivelmente se distribuía em regiões mais ao sul do Brasil e a colonização de áreas mais ao norte, relacionadas à Amazônia deu origem nessas regiões à linhagem que se diversificou em *A. solstitialis*, *A. maculata*, *A. jandaya* e *A. auricapilla*, sendo que *N. neday* teria mantido distribuição mais próxima da do ancestral. Porém,

é possível também que a divergência de *Nandayus nenday* se deu devido à colonização de regiões mais ao sul, em áreas como o chaco boliviano, visto que a distribuição de probabilidades de área ancestral do nó que sustenta o clado irmão de *A. weddellii* é muito similar à do nó ancestral do clado irmão de *Nandayus nenday*, o que indica que a mudança de área possivelmente ocorreu na linhagem desta espécie.

A diversificação do restante do clado ocorreu durante o Pleistoceno (entre 1,71 e 0,50 Ma.) e poderia estar relacionada às oscilações climáticas deste período, em que os máximos glaciais promoviam a fragmentação de florestas, isolando as populações de espécies relacionadas a ambientes florestais, assim como permitindo a expansão da distribuição de espécies relacionadas a climas mais secos, como acontece por exemplo com algumas espécies alpinas que expandem suas distribuições em épocas glaciais (Galbreath *et al.*, 2009). Essa hipótese já fora proposta anteriormente para explicar a divergência entre *A. jandaya* e *A. auricapilla*, separadas por regiões de vegetação seca do nordeste do Brasil, que em épocas de máximos glaciais possivelmente expandiu sua distribuição e isolou populações do ancestral dessas espécies (Ribas e Miyaki, 2004). Além disso, a data estimada da divergência entre essas espécies no presente trabalho (0,76 Ma.) corresponde a um período de máximo glacial do Pleistoceno (Bintanja e van de Wal, 2008). Já a divergência entre *A. solstitialis* e *A. maculata* (0,50 Ma.) pode estar relacionada a um período interglacial (Huybers e Wunsch, 2005) em que a floresta expande sua distribuição, visto que são espécies mais relacionadas a áreas abertas e secas e possivelmente a distribuição do ancestral de *A. solstitialis* e *A. maculata* retraiu com a expansão da floresta, o que pode ter isolado as populações. A reconstrução de área ancestral indica que o ancestral de *A. maculata* e *A. solstitialis* possui alta probabilidade de ocorrer exclusivamente na região amazônica. O restante das áreas ancestrais dos nós indica uma distribuição mais ampla para os ancestrais de *A. jandaya* e *A. auricapilla*.

Clado B

O clado B apresentou datas relativamente antigas de diversificação de todas as linhagens de espécies (entre 14 e 10 Ma.), durante o Mioceno. O

clado B possui ampla distribuição geográfica e quase todas as suas diversificações parecem ter ocorrido há mais de 10 Ma. (figura 18).

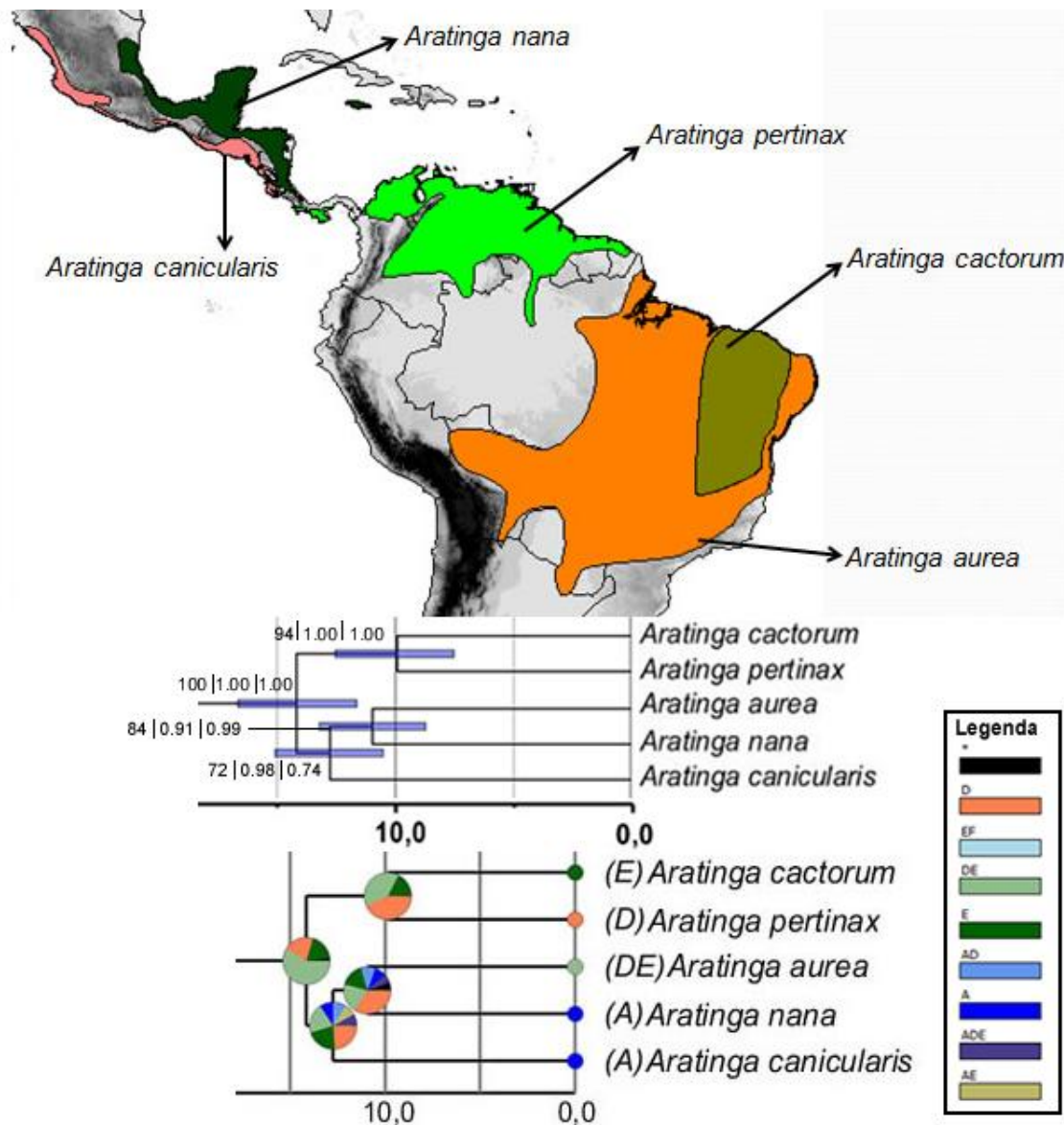


Figura 18: Distribuição geográfica do clado B, o cronograma com as datas de divergência e a reconstrução de área ancestral do clado. Valores ao lado dos nós do cronograma se referem ao *bootstrap* da análise mitocondrial de máxima verossimilhança e às probabilidades posteriores das análises Bayesianas (mitocondrial e nuclear) no MrBayes e no BEAST, respectivamente. Regiões: A- América Central, D- Amazônia, E- leste e sudeste da América do Sul, F- sul da América do Sul, *- distribuição incerta.

A diversificação deste clado foi complexa, possivelmente envolvendo eventos de dispersão e isolamento. Uma hipótese é que a distribuição do ancestral desse grupo era ampla por toda a América do Sul e uma possível

vicariância separou uma linhagem na porção leste (linhagem que originou *A. aurea*, *A. canicularis* e *A. nana*) e outra na porção oeste da América do Sul (linhagem que originou *A. cactorum* e *A. pertinax*). De acordo com a reconstrução de área ancestral esse cenário é plausível, visto que há uma maior probabilidade de uma ampla distribuição na Amazônia e no leste da América do Sul para o ancestral do grupo. O nó que sustenta o clado de *A. pertinax* e *A. cactorum* apresenta um acréscimo da probabilidade de uma distribuição mais restrita na Amazônia, sendo que o nó irmão deste (que agrupa *A. aurea*, *A. nana* e *A. canicularis*) apresenta maior incerteza na distribuição ancestral, porém consideramos que a distribuição ancestral deve corresponder ao leste da América do Sul, que também tem uma probabilidade alta na nossa análise. A divergência entre *A. cactorum* e *A. pertinax* poderia estar relacionada a uma colonização da região seca no nordeste do Brasil por volta de 10 Ma.

De acordo com a reconstrução de área ancestral há uma baixa probabilidade de origem do clado com espécies da América Central nesta região, além disso, as principais diversificações trans-istmo parecem ter ocorrido somente após o fechamento do Istmo do Panamá entre 4 e 3,1 Ma. (Kirby *et al.*, 2008; Coates e Obando, 1996). É interessante mencionar que diversificações trans-istmo foram especialmente raras até 8 Ma. em certas espécies de Columbiformes (Smith e Kicka, 2010). É preciso também destacar que o fechamento do Istmo do Panamá é um processo gradual que decorreu da colisão tectônica do arco da América Central com o norte da placa da América do Sul, evento cujas primeiras evidências de atividade tectônica datam de cerca de 12 Ma. (Coates *et al.*, 1992). Porém, a aproximação das duas massas continentais permitiu que migrações trans-istmo ocorressem de maneira mais comum apenas após 8 Ma., apesar de ainda serem raras (Smith e Kicka, 2010). Logo, parece ser mais plausível que a colonização da América Central por essas espécies ocorreu após o fechamento do Istmo, possivelmente em eventos independentes, sendo que a divergência entre as espécies já estava estabelecida há um longo período de tempo (entre 10 e 13 Ma.). Como não há resolução nem suporte para as relações dessas três espécies, só é possível especular sobre os eventos que levaram a suas divergências. Assim, uma possível explicação seria a colonização da região

oeste da América do Sul e subsequente colonização da América Central. Como a divergência de *A. nana* e *A. canicularis* é antiga (entre 15 e 10 Ma.) é possível que dois eventos separados de colonização da região oeste da América do Sul pelos ancestrais de cada espécie tenham levado a essas especiações, *A. aurea* possivelmente manteve a distribuição do ancestral desse grupo.

Clado C

O clado C parece ser o táxon de origem mais recente, há cerca de 10 Ma. e grande parte da diversificação ocorrendo no Plioceno (entre 5 e 2,4 Ma.). A distribuição geográfica ampla das espécies que compõem o clado C e as datas de divergência entre elas podem ser observadas na figura 19. Esse clado C iniciou sua diversificação no Mioceno há cerca de 10 Ma. que coincide com uma época de intenso soerguimento na região norte dos Andes (Hoorn *et al.*, 2010), o que pode ter gerado o isolamento entre uma linhagem que habitava em regiões de baixa altitude (que deu origem as espécies *A. holochlora* e *A. leucophthalmus*) e outra linhagem que passou a estar relacionada a ambientes montanhosos (que deu origem as espécies restantes do clado). A análise de reconstrução de área ancestral parece congruente com este cenário (figuras 16 e 19), pois o ancestral do grupo todo tem alta probabilidade de ter ocupado uma área ampla na América do Sul, não relacionada com os Andes. A linhagem de regiões de baixa altitude possivelmente teve sua especiação relacionada à colonização da América Central. A espécie *A. holochlora*, possivelmente se divergiu da linhagem de *A. leucophthalmus* devido à colonização dessa região há cerca de 5 Ma., em um evento envolvendo a travessia da faixa oceânica que separava a América do Sul da América Central antes do fechamento do Istmo do Panamá. Apesar de a grande maioria de eventos de especiação trans-istmo terem ocorrido após o fechamento do Istmo há 3,1 Ma. (Coates e Obando, 1996), já foram reportadas especiações de Columbiformes antes do fechamento do Istmo (Smith e Klicka, 2010).

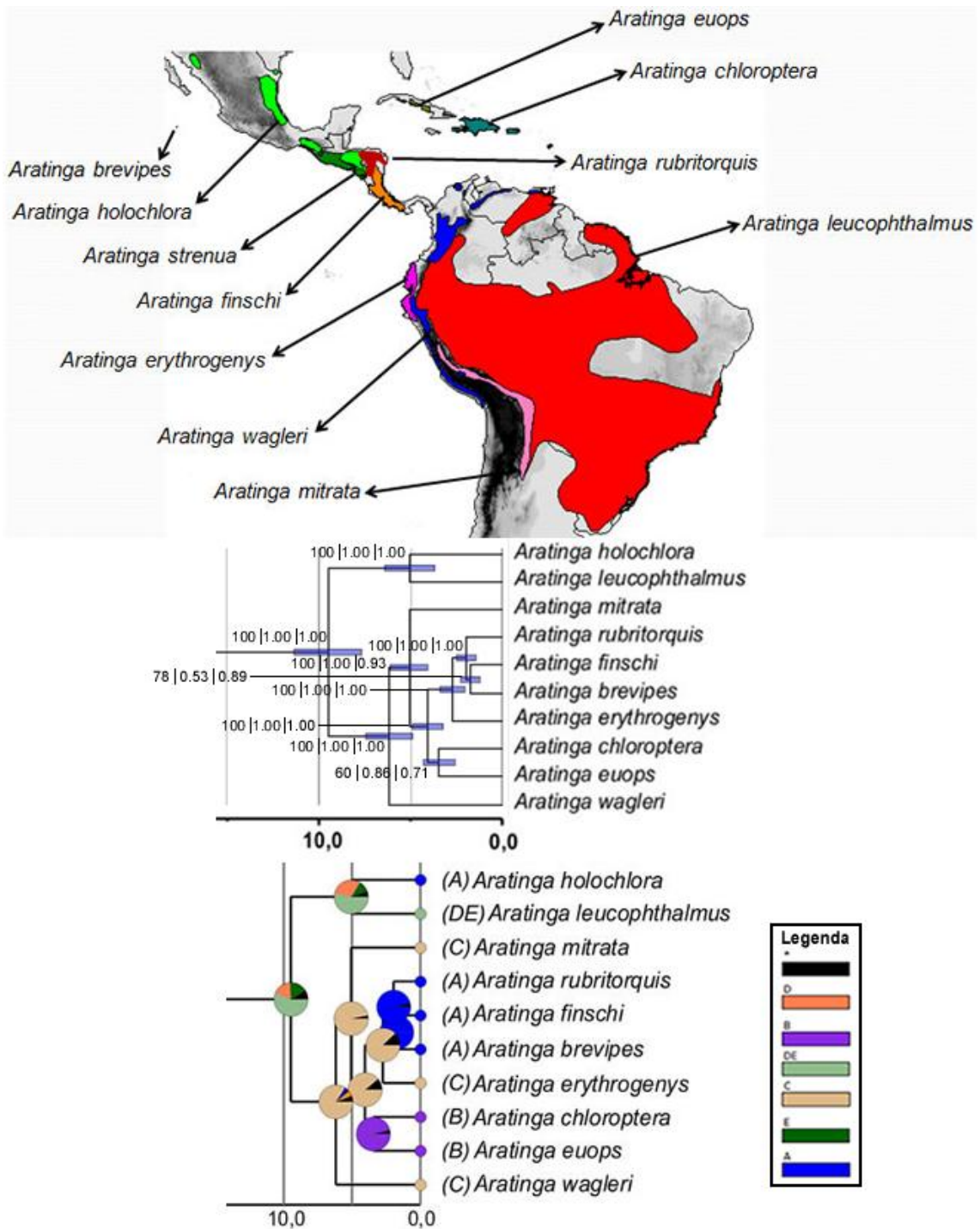


Figura 19: Distribuição geográfica do clado C, o cronograma com as datas de divergência e a reconstrução de área ancestral do clado. Valores ao lado dos nós do cronograma se referem ao *bootstrap* da análise mitocondrial de máxima verossimilhança e às probabilidades posteriores das análises Bayesianas (mitocondrial e nuclear) no MrBayes e no BEAST, respectivamente. Regiões: A- América Central, B- Caribe, C- Andes, D- Amazônia, E- leste e sudeste da América do Sul, *- distribuição incerta.

Dentro do grupo mais associado aos Andes, o intenso soerguimento do norte dos Andes até o Plioceno inicial (4,5 Ma., Mora *et al.*, 2010) pode estar relacionado com parte das especiações deste clado, que ocorreram por volta deste período. O clado que habita a região do Caribe (*A. chloroptera*, *A. euops*) apresentou baixos valores de suporte estatístico em todas as análises, com um ramo bastante curto sustentando seu nó, o que indica que essas espécies formam uma politomia com o clado (*A. erythrogegens*, (*A. rubritorquis*, (*A. finschi*, *A. brevipes*))). A colonização de Cuba pelo ancestral de *A. euops* e da Ilha de São Domingos pelo ancestral de *A. chloroptera* pode ter ocorrido durante um período em que oscilações do nível do mar levaram a eventos de diminuição do nível em diversos momentos, o que pode ter facilitado a dispersão da América do Sul para as ilhas do Caribe há 4 e 3,3 Ma., épocas com níveis do mar reduzidos, comparado aos atuais (Miller *et al.*, 2005). O fechamento do Istmo do Panamá há 3,1 Ma. (Coates e Obando, 1996) pode ter influenciado nas especiações do clado com distribuição na América Central (*A. rubritorquis*, (*A. finschi*, *A. brevipes*)), que teve origem estimada para logo após o estabelecimento da conexão entre os dois continentes (2,75 Ma.). Essa possível colonização de novos ambientes disponíveis pode ter resultado nessa radiação, visto o curto tamanho de ramos separando essas espécies e a baixa resolução de suas relações.

Clado D

O padrão biogeográfico do clado D, que contém *A. acuticaudata* e os gêneros monotípicos *Diopsittaca* e *Guarouba*, é bastante complexo, com distribuições amplas e disjuntas de *A. acuticaudata* e *D. nobilis* (figura 20). As divergências dentro desse clado [*G. guarouba* versus (*A. acuticaudata*, *D. nobilis*) há cerca de 13,5 Ma. e *A. acuticaudata* versus *D. nobilis* há cerca de 10,5 Ma.] ocorreram no Mioceno. Como *A. acuticaudata* e *D. nobilis* possuem populações disjuntas, seria necessário realizar estudos populacionais detalhados para permitir interpretar melhor os dados. Porém, é possível sugerir que a divergência de *G. guarouba* do restante do grupo pode estar relacionada com o habitat de regiões mais úmidas dessa espécie, em detrimento dos habitats tipicamente mais secos do restante do clado (Collar, 1997). A reconstrução de área ancestral apóia este cenário, visto que há uma maior

probabilidade de o ancestral do clado ter uma distribuição ampla na América do Sul, sendo que apenas *G. guarouba* possui ocorrência exclusiva na Amazônia. Isso pode ter ocorrido devido a mudanças na região amazônica decorrentes do soerguimento dos Andes, em que o fluxo de sedimentos passou do sentido leste-oeste, para oeste-leste, resultando na formação gradual do rio Amazonas (consolidado há cerca de 7 Ma.; Figueiredo *et al.*, 2009; 2010). A divergência entre *A. acuticaudata* e *D. nobilis* ocorreu possivelmente devido à dispersão para novas regiões, porém é necessário um estudo populacional mais detalhado para identificar as possíveis áreas originais de cada espécie.

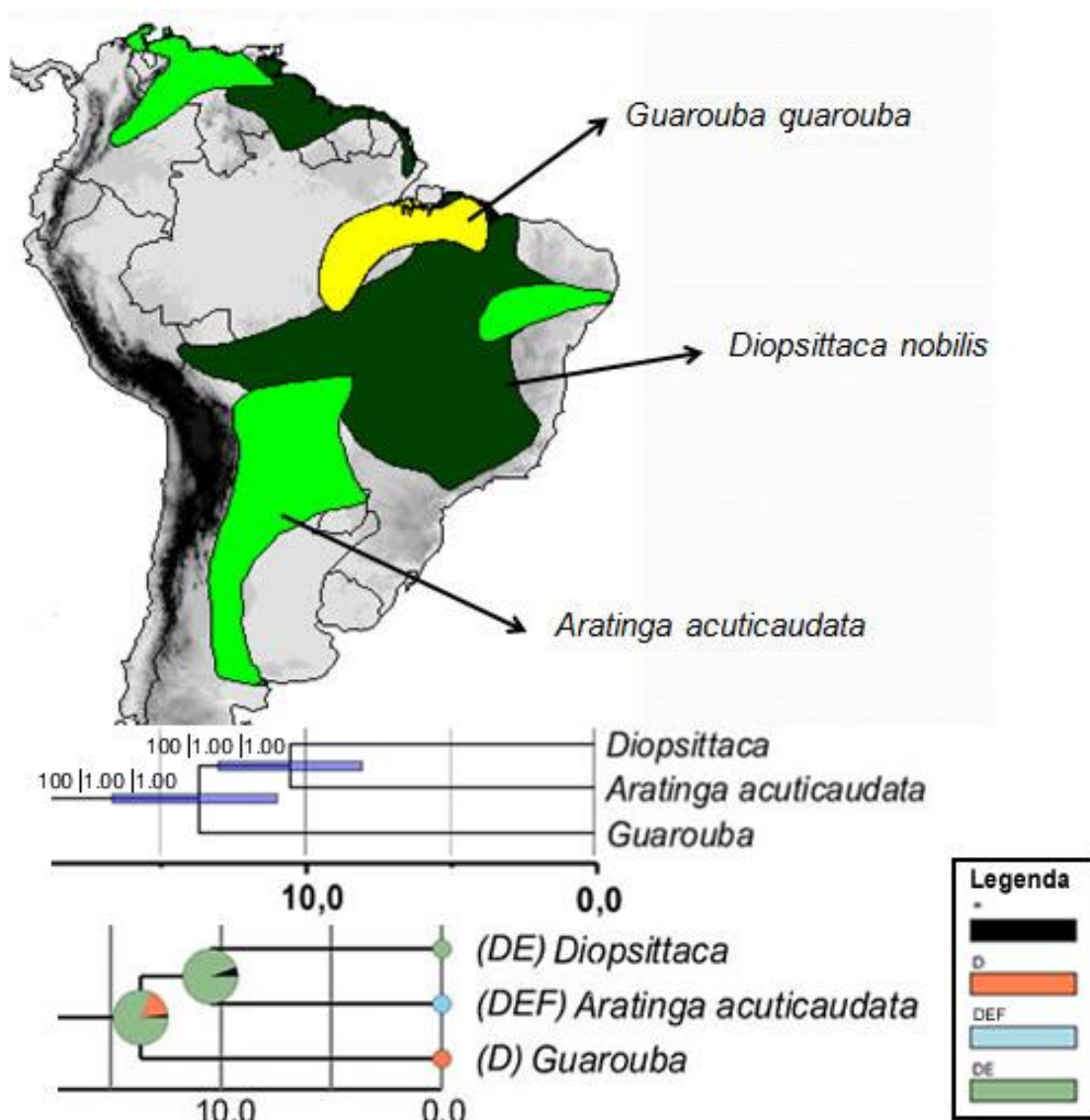


Figura 20: Distribuição geográfica do clado D, o cronograma com as datas de divergência e a reconstrução de área ancestral do clado. Valores ao lado dos nós do cronograma se referem ao *bootstrap* da análise mitocondrial de máxima verossimilhança e às probabilidades

posteriores das análises Bayesianas (mitocondrial e nuclear) no MrBayes e no BEAST, respectivamente. Regiões: D- Amazônia, E- leste e sudeste da América do Sul, F- sul da América do Sul, *- distribuição incerta.

6. Conclusões

As análises filogenéticas do presente estudo são as primeiras a indicarem que as espécies do gênero *Aratinga* estão organizadas em quatro clados, cada um deles com alto suporte estatístico; mas estes clados não se agrupam em um único grupo monofilético. O clado A do presente trabalho é completamente congruente com o grupo *A. solstitialis* proposto por Silveira e colaboradores (2005) baseado em dados morfológicos. O táxon monotípico *Nandayus nenday* faz parte deste grupo, tendo posição mais interna que *A. weddellii* que é irmã do restante do grupo (figura 14). O clado A é irmão de um clado que contém representantes dos gêneros *Ara*, *Primolius*, *Orthopsittaca* e *Cyanopsitta* (figura 14), com alto suporte estatístico em todas as análises, o que corrobora a ausência de monofilia do gênero *Aratinga*. O clado B também é completamente congruente com o grupo *A. pertinax* (Silveira *et al.*, 2005) e parece ser o grupo irmão do clado que contém o clado A e o clado dos representantes dos gêneros *Ara*, *Primolius*, *Orthopsittaca* e *Cyanopsitta* (figura 14). O clado C apresenta grande congruência com o grupo *A. leucophthalmus* (Silveira *et al.*, 2005), exceto pela exclusão da espécie *A. acuticaudata* (figura 14). Essa espécie parece ser irmã de *Diopsittaca nobilis* e, por sua vez, esse grupo deve ser irmão de *Guarouba guarouba*, compondo o clado D com suportes máximos (figura 14).

Essas evidências sugerem fortemente que o táxon *Aratinga* não seja monofilético, logo, consideramos necessária uma revisão taxonômica do gênero. A relação próxima de *Nandayus nenday* e espécies do complexo *Aratinga solstitialis* já havia sido sugerida anteriormente (Ribas e Miyaki, 2004). O Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos indicou que *Nandayus nenday* deveria ser denominada como *Aratinga nenday* (CBRO, 2010). A ausência de relação próxima entre *A. leucophthalmus* e *A. solstitialis* também já havia sido observada (Tavares *et al.*, 2006). No entanto, o resultado de que *A. acuticaudata* parece não ter relação próxima com nenhuma outra espécie do gênero só foi observado no presente estudo. A proximidade de relação entre *A.*

acuticaudata e *D. nobilis* nunca havia sido sugerida antes. Com base nas relações filogenéticas encontradas seria possível organizar as espécies do gênero *Aratinga* em pelo menos quatro táxons. Como tal proposta é relativamente ousada por envolver muitas mudanças, o ideal é que estudos baseados em dados independentes dos aqui apresentados (ex. filogenias baseadas em dados morfológicos e morfométricos) sejam realizados testando os mesmos táxons aqui analisados.

A análise da biogeografia dos clados com espécies de *Aratinga* encontrados sugere uma complexa história com eventos de colonização e vicariância, possivelmente relacionados a eventos como o soerguimento dos Andes, o fechamento do Istmo do Panamá e oscilações climáticas do Pleistoceno. A colonização da América Central parece ter ocorrido ao menos três vezes independentemente, com um evento possivelmente relacionado ao fechamento do Istmo do Panamá e outros anteriores a este, possivelmente devidos a oscilações no nível do mar. Estudos com amostragem populacional geográfica representativa, dentro desses clados encontrados, podem auxiliar a elucidar o padrão complexo de diversificação desses táxons de psitacídeos, assim como agregar mais detalhes à rica história da avifauna da região Neotropical.

7. Referências Bibliográficas

Amaral, F.S.R.; Miller, M.J.; Silveira, L.F.; Bermingham, E. e Wajntal, A. (2006) Polyphyly of the hawk genera *Leucopternis* and *Buteogallus* (Aves, Accipitridae): multiple habitat shifts during the Neotropical buteonine diversification. *BMC Evolutionary Biology*, 6: 10.

Amaral, F.R.; Sheldon, F.H.; Gamauf, A.; Haring, E.; Riesing, M.; Silveira, L.F. e Wajntal, A. (2009) Patterns and processes of diversification in a widespread and ecologically diverse avian group, the buteonine hawks (Aves, Accipitridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53: 703–715.

Amorin, D. S. (2002) *Fundamentos de Sistemática Filogenética*. Editora Holos, Ribeirão Preto.

Antonelli, A.; Nylander, J.A. A.; Persson, C. e Sanmartín, I. (2009) Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106: 9749–9754.

Barrowclough, G.F.; Groth, J.G. e Mertz, L.A. (2004) Phylogenetic relationships among parrots. One Hundred and Twenty-Second Stated Meeting of the American Ornithologist's Union. Laval, Quebec.

Baum, D.A.; Smith, S.D. e Donovan S.S.S. (2005) The tree-thinking challenge. *Science*, 310: 979-980.

Benz, B.W. e Robbins, M.B. (2011) Molecular phylogenetics, vocalizations, and species limits in *Celeus* woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 29-44.

Bintanja, R. e van de Wal, R.S.W. (2008) North American ice-sheet dynamics and the onset of 100,000-year glacial cycles. *Nature*, 14: 869-872.

BLAST disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>

Brown, W.M.; George, M.J. e Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 361: 119-134.

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

Carnaval, A.C. e Moritz, C. (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35: 1187-1201.

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

Chaves, J.A.; Weir, J.T. e Smith, T.B. (2011) Diversification in *Adelomyia* hummingbirds follows Andean uplift. *Molecular Ecology*, 20: 4564-4576.

Clements, J.F. (2000) *Birds of The World: A Checklist*. Fifth Edition. Ibis Publishing Company, Vista.

Coates, A.; Jackson, J.B.C.; Collins, L.S.; Cronin, T.M.; Dowsett, H.J.; Bybell, L.M.; Yung, P. e Obando, J. (1992) Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Buletin*, 104: 814-828.

Coates, A. e Obando, J. (1996) The geologic evolution of the Central American Isthmus. In: Jackson, J. *et al.*, *Evolution and Environment in Tropical America*. University of Chicago Press, Chicago.

Collar, N.J. (1997). Family Psittacidae (Parrots). In: del Hoyo, J; Elliot, A. e Sagartal, J. *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 04, Sandgrouse to Cuckoos. Lynx Edicions, Barcelona.

CBRO: Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2010) Listas das aves do Brasil. 9ª Edição. Disponível em: <http://www.cbro.org.br>.

Cooper, A. e Penny, D. (1997) Mass survival of birds across the Cretaceous-Tertiary boundary: molecular evidence. *Science*, 275: 1109-1113.

Cracraft, J. (1973) Continental drift, palaeoclimatology, and the evolution and biogeography of birds. *Journal of Zoology*, 169: 455-545.

Cracraft, J. (2001) Avian evolution, Gondwana biogeography and the Cretaceous–Tertiary mass extinction event. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 268: 459-469.

de Kloet, R.S. e de Kloet, S.R. (2005) The evolution of the spindlin gene in birds: sequence analysis of an intron of the spindlin W and Z gene revealed four major divisions of the Psittaciformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 706-721.

Dingle, R.V. e Lavelle, M. (1998) Late Cretaceous-Cenozoic climatic variations of the northern Antarctica peninsula: new geochemical evidence and review. *Paleogeography, Paleoclimatology and Paleoecology*, 141: 215-232.

Doolittle, R.F e Blombäck, B. (1964) Amino-acid sequence investigations of fibrinopeptides from various mammals: evolutionary implications. *Nature*, 202: 147-152.

Drummond, A.J. e Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214. Disponível em: <http://beast-mcmc.googlecode.com/>

Dunn, I.S. e Blattner, F.R. (1987) Charons 36 to 40: Multi enzyme, high capacity, recombinant deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*, 15: 2677.

Dyke, G.J. & Mayr, G. (1999) Did parrots exist in the Cretaceous? *Nature*, 399: 317-318.

Eberhard, J. R.; Wright, T. F. e Bermingham, E. (2001) Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1330–1342.

Feduccia, A. (2003) ‘Big bang’ for tertiary birds? *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 172-176.

Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 368-376.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

Felsenstein, J. (2004) *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland.

Figueiredo, J.; Hoorn, C.; van der Ven, P. e Soares, E. (2009). Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: evidence from the Foz do Amazonas basin. *Geology*, 37: 619-622.

Figueiredo, J.; Hoorn, C.; van der Ven, P. e Soares, E. (2010) Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: evidence from the Foz do Amazonas basin: Reply. *Geology*, 38: e213.

Fleischer, R.C.; McIntosh, C.E. e Tarr, C.L. (1998) Evolution on a volcanic conveyor belt: using phylogeographic reconstructions and K–Ar-based ages of the Hawaiian Islands to estimate molecular evolutionary rates. *Molecular Ecology*, 7: 533-545.

Forshaw, J. (1989) *Parrots of the World*. Third edition. Landsdowne Editions, Melbourne.

Fuchs, J.; Chen, S.; Johnson, J.A. e Mindell, D.P. (2011) Pliocene diversification within the South American forest falcons. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60: 398-407.

Galbreath, K.E.; Hafner, D.J. e Zamudio, K.R. (2009) When cold is better: Climate-driven elevation shifts yield complex patterns of diversification and demography in an alpine specialist (American Pika, *Ochotona princeps*). *Evolution*, 63: 2848–2863.

Garcia-Moreno, J. (2004) Is there a universal mtDNA clock for birds? *Journal of Avian Biology*, 35: 465-468.

Glenny, F.H. (1954) Antarctica as a center of origins of birds. *Ohio Journal of Science*, 54: 307-314.

Guindon, S. e Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.

Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W. e Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of phylml 3.0. *Systematic Biology*, 59: 307–321.

Groth, J.G. e Barrowclough, G.F. (1999) Basal divergence in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 115–123.

Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-137.

Haffer, J. (1997) Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation*, 6: 451-477.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

Harrison, G. L.; McLenachan, P. A.; Phillips, M. J.; Slack, K. E.; Cooper, A. e Penny, D. (2004) Four new avian mitochondrial genomes help get to basic evolutionary questions in the Late Cretaceous. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 974-983.

Huybers, P. e Wunsch, C. (2005) Obliquity pacing of the late Pleistocene glacial terminations. *Nature*, 434: 491-493.

Hasegawa, M.; Kishino, e H. Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 2: 1-5.

Hasegawa, M.; Yano, T. e Kishino, H. (1984) A new molecular clock of mitochondrial DNA and the evolution of hominoids. *Proceedings of the Japanese Academy B*, 60: 95-98.

Hedges, S.B.; Parker, P.H.; Sibley, C.G. e Kumar, S. (1996) Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals. *Nature*, 381: 226-229.

Helbig, A.J.; Kocum, A.; Seibold, I. e Braun, M.J. (2005) A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive

paraphyly at the genus level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 147-164.

Hennig, W. (1966) *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press. Urbana.

Hoorn, C.; Wesselingh, F. P.; ter Steege, H.; Bermudez, M. A.; Mora, A.; Sevink, J.; Sanmartín, I.; Sanchez-Meseguer, A.; Anderson, C. L.; Figueiredo, J. P.; Jaramillo, C.; Riff, D.; Negri, F. R.; Hooghiemstra, H.; Lundberg, J.; Stadler, T.; Särkinen, T. e Antonelli, A. (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330: 927-931.

Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F.; Nielsen, R. e Bollback, J.B. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294: 2310-2314.

IUCN: *International Union for Conservation of Nature*. Lista de espécies em perigo de 2009. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>

Johnson, K.P. e Weckstein, J.D. (2011) The Central American land bridge as an engine of diversification in New World doves. *Journal of Biogeography*, 38: 1069-1076.

Jukes, T.H. e Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro, H.M. *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.

Kirby, M. X.; Jones, D.S. e MacFadden, B.J. (2008) Lower Miocene stratigraphy along the Panama Canal and its bearing on the Central American Peninsula. *PloS ONE*, 3: e2791.

Kishino, H.; Thorne, J.L. e Bruno, W.J. (2001) Performance of a divergence time method under a probabilistic model of rate evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 352-361.

Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Paabo, S.; Villablanca, F.X. e Wilson, A.C., (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 6196-6200.

Kumar, S.; Skjæveland, A.; Orr, R.J.S.; Enger, P.; Ruden, T.; Mevik, B.H.; Burki, F.; Botnen, A. e Shalchian-Tabrizi, K. (2009) AIR: A batch-oriented web program package for construction of supermatrices ready for phylogenomic analyses. *BMC Bioinformatics*, 10: 357. Disponível: <http://www.bioportal.uio.no/>

Lovette, I.J. (2004) Mitochondrial dating and mixed-support for the '2% rule' in birds. *Auk*, 121: 1–6.

Maddison, W. P. e Maddison, D.R. (2010) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73. Disponível em: <http://mesquiteproject.org>.

Margoliash, E. (1963) Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 50: 672-679.

Mayr, G. (2002) On the osteology and phylogenetic affinities of the Pseudasturidae—lower Eocene stem-group representatives of parrots (Aves, Psittaciformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 136: 715-729.

McLoughlin, S. (2001) The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. *Australian Journal of Botany*, 49:271–300.

Miller, K.G.; Kominz, M.A.; Browning, J.V.; Wright, J.D.; Mountain, G.S.; Katz, M.E.; Sugarman, P.J.; Cramer, B.S.; Christie-Blick, N. e Peka, S.F. (2005) The Phanerozoic record of global sea-level change. *Science*, 310: 1293-1298.

Miller, M.A.; Pfeiffer, W. e Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA pp 1 - 8. Disponível em: <http://www.phylo.org/portal2/>

Miyaki, C.; Matioli, S.R.; Burke, T. e Wajntal, A. (1998) Parrot evolution and paleogeographical events: mitochondrial DNA evidence. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 544-551.

Mora, A.; Baby, P.; Roddaz, M.; Parra, M.; Brusset, S.; Hermoza, W. e Espurt, N. (2010) Tectonic history of the Andes and sub-Andean zones: implications for the development of the Amazon drainage basin. In: Hoorn, C. e Wesselingh, F. P. (Eds.). *Amazonia, Landscape and Species Evolution*. Wiley, Oxford. Pp: 38–60.

Nei, M. e Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Nemésio, A. e Rasmussen, C. (2009) The rediscovery of Buffon's "Guarouba" or "Perriche jaune": two senior synonyms of *Aratinga pinto* Silveira, Lima & Höfling, 2005 (Aves: Psittaciformes). *Zootaxa*, 2013: 1-16.

Newton, I. (2003) *The Speciation and Biogeography of Birds*. Academic Press, San Diego.

Nores, M. (1999) An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*, 26: 475-485.

Omland, K.E.; Cook, L.G. e Crisp, M.D. (2008) Tree thinking for all biology: the problem with reading phylogenies as ladders of progress. *BioEssays*, 30: 854-867.

Paton, T.; Haddrath, O. e Baker, A.J. (2002) Complete mitochondrial DNA genome sequences show that modern birds are not descended from transitional shorebirds. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 269: 839–846.

Pereira, S.L.; Miyaki, C.Y. e Russo, C.A.M. (2001) Reconstrução filogenética: Métodos probabilísticos. In: Matioli, S.R. *Biologia Molecular e Evolução*. Editora Holos, Ribeirão Preto.

Posada, D. e Crandall, K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

Poulsen, C. J.; Ehlers, T. A. e Insel, N. (2010) Onset of convective rainfall during gradual Late Miocene Rise of the Central Andes. *Science*, 328: 490-493.

Quinn, T.W. (1997) Molecular evolution of the mitochondrial genome. In: Mindell, D. P. *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego.

Rambaut, A. e Drummond, A.J. (2009) Tracer v1.5, Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

Randi, E. (1996) A mitochondrial cytochrome b phylogeny of the *Alectoris* partridges. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6: 214-227.

Ribas, C. C. (2004) *Filogenias Moleculares e Biogeografia Histórica em Psitacídeos (Aves; Psittacidae): Padrões e Processos de Diversificação no Neotrópico*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, Brasil.

Ribas, C.C. e Miyaki, C.Y. (2004) Molecular systematics in *Aratinga* parakeets: species limits and historical biogeography in the *solstitialis* group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 663-675.

Ribas, C. G.; Gaban-Lima, R.; Miyaki, C. Y. e Cracraft, J. (2005) Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography*, 32: 1409-1427.

- Ridley, M.** (2004) *Evolução* (3 Edição). Artmed, Porto Alegre.
- Riff, D.; Romano, P.S.P.R.; Oliveira, G.R. e Aguilera, O.A.** (2010) Neogene crocodile and turtle fauna in northern South America. In: Hoorn, C. e Wesselingh, F.P. *Amazonia, Landscape and Species Evolution*. Wiley, Oxford.
- Rodriguez, F.; Oliver, J.L.; Marín, A. e Medina, R.** (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142: 485-501.
- Ronquist, F.** (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology*, 46: 195–203.
- Ronquist F.R. e Huelsenbeck, J.P.** (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Sanderson, M.J.** (2002) Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 101-109.
- Santos, J.C.; Coloma, L.A.; Summers, K.; Caldwell, J.P.; Ree, R. e Cannatella, D.C.** (2009) Amazonian amphibian diversity Is primarily derived from Late Miocene Andean lineages. *PLOS Biology*, 7: 0448-0461.
- Schweizer, M.; Seehausen, O.; Güntert, M. e Hertwig, S.T.** (2010) The evolutionary diversification of parrots supports a taxon pulse model with multiple trans-oceanic dispersal events and local radiations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 984–994.
- Schweizer, M.; Seehausen, O. e Hertwig, S.T.** (2011) Macroevolutionary patterns in the diversification of parrots: effects of climate change, geological events and key innovations. *Journal of Biogeography*, 38: 2176-2194.
- Shevenall, A.E.; Kennett, J.P. e Lea, D.W.** (2004) Middle Miocene Southern ocean cooling and Antarctica cryosphere expansion. *Science*, 305: 1766-1770.
- Shields, G.F. e Wilson, A.C.** (1987) Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *Journal of Molecular Evolution*, 24: 212-217.
- Sigrist, T.** (2006) *Aves do Brasil – Uma visão artística*, Birds of Brazil – An artistic view. Editora: Tomas Sigrist, São Paulo.
- Silveira, L.F.; Lima, F.C.T. e Höfling, E.** (2005) A new species of *Aratinga* parakeet (Psittaciformes:Psittacidae) from Brazil, with taxonomic remarks on the *Aratinga solstitialis* complex. *The Auk*, 122: 292-305.

Simpson, G.G. (1980) *Splendid Isolation: the Curious History of South American Mammals*. Yale University Press, New Haven.

Smith, B.T. e Klicka, J. (2010) The profound influence of the Late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of New World birds. *Ecography*, 33: 333-342.

Sorenson, M.D.; Ast, J.C.; Dimcheff, D.E.; Yuri, T. e Mindell, D.P. (1999) Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 105-111.

Stamatakis, A.; Ludwig, T. e Meier, H. (2005) Raxml-iii: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 21: 456-463.

Stamatakis, A. (2006) Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688-2690.

Stamatakis, A.; Hoover, P. e Rougemont, J. (2008) A rapid bootstrap algorithm for the raxml web servers. *Systematic Biology*, 57: 758-771.

Stidham, T.A. (1998) A lower jaw from a Cretaceous parrot. *Nature*, 39: 29-30.

Tamura, K. e 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. e Kumar, S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (no prelo).

Tavares, E.S. (2005) *Relações Filogenéticas, Biogeografia Histórica e Evolução da Organização de Genes Mitocondriais dos Psitacídeos Neotropicais (Tribo Arini: Psittacidae: Psittaciformes)*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, Brasil.

Tavares, E.S.; Baker, A.J.; Pereira, S.L. e Miyaki, C.Y. (2006) Phylogenetic relationships and historical biogeography of Neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Biology*, 55: 454-470.

- Tavares, E.S.; Yamashita, C. e Miyaki, C.Y.** (2004) Phylogenetic relationships among some Neotropical parrot genera (Psittacidae, Aves) based on mitochondrial sequences. *The Auk*, 121: 230-242.
- Thorne, J.L.; Kishino, H. e Painter, I.S.** (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1647-1657.
- van Tuinen, M. e Hedges, S.B.** (2001) Calibration of avian molecular clocks. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 206-213.
- Vanzolini, P. E. e Williams, E. E.** (1970) South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*, 19: 298.
- Weir, J.T.; Bermingham, E. e Schluter, D.** (2009) The great American biotic interchange in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106: 21737-21742.
- Weir, J.T. e Schluter, D.** (2008) Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*, 17: 2321-2328.
- Wesselingh, F.P. e Salo, J.A.** (2006) Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica*, 133: 439-458.
- Wiens, J.J.** (2003) Missing data, incomplete taxa, and phylogenetic accuracy. *Systematic Biology*, 52: 528-538.
- Wiens, J.J.** (2006) Missing data and the design of phylogenetic analyses. *Journal of Biomedical Informatics*, 39: 34-42.
- Wiens, J.J. e Moen, D.S.** (2008) Missing data and the accuracy of Bayesian phylogenetics. *Journal of Systematics and Evolution*, 46: 307-314.
- Woodburne, M.O. e Case, J.A.** (1996) Dispersal, vicariance, and the late Cretaceous to early Tertiary land mammal biogeography from South America to Australia. *Journal of Mammalian Evolution*, 3: 121-161.
- Wright, T.F.; Schirtzinger, E.E.; Matsumoto, T.; Eberhard, J.R.; Graves, G.R.; Sanchez, J.J.; Capelli, S.; Müller, H.; Scharpegge, J.; Chambers, G.K. e Fleischer, R.C.** (2008) A multilocus molecular phylogeny of the parrots (Psittaciformes): support for a Gondwanan origin during the Cretaceous. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 2141-2156.

Yu, Y.; Harris, A.J.; He, X.J. (2011) A novel Bayesian method for reconstructing geographic ranges and ancestral states on phylogenies. (Submetido).

Zuckerkandl, E. e Pauling, L. (1962) Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In: Kasha, M. e Pullman, B. *Horizons in Biochemistry*. Academic Press, New York.

Anexo I: Tabela de distância-p entre pares de táxons baseada em todos os genes mitocondriais concatenados dos 37 táxons utilizados nas análises filogenéticas. Análise realizada no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

	<i>A. auricapilla</i>	<i>A. jandaya</i>	<i>A. solstitialis GB</i>	<i>A. solstitialis</i>	<i>A. maculata</i>	<i>Nandayus nenday</i>	<i>A. weddellii</i>	<i>Cyanopsitta spixii</i>	<i>Orthopsittaca manilata</i>	<i>Ara ararauna</i>	<i>Primolius auricollis</i>	<i>A. cactorum</i>	<i>A. pertinax</i>	<i>A. canicularis</i>	<i>A. aurea</i>	<i>A. nana</i>	<i>A. leucophthalmus</i>	<i>A. holochlora</i>	
<i>A. auricapilla</i>																			
<i>A. jandaya</i>	0,005																		
<i>A. solstitialis GB</i>	0,005	0,002																	
<i>A. solstitialis</i>	0,008	0,009	0,008																
<i>A. maculata</i>	0,010	0,010	0,010	0,002															
<i>Nandayus nenday</i>	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040														
<i>A. weddellii</i>	0,083	0,082	0,083	0,080	0,081	0,088													
<i>Cyanopsitta spixii</i>	0,101	0,099	0,101	0,100	0,100	0,101	0,097												
<i>Orthopsittaca manilata</i>	0,099	0,099	0,100	0,098	0,099	0,105	0,092	0,098											
<i>Ara ararauna</i>	0,099	0,098	0,099	0,096	0,096	0,100	0,099	0,100	0,088										
<i>Primolius auricollis</i>	0,101	0,101	0,101	0,100	0,101	0,103	0,098	0,092	0,088	0,083									
<i>A. cactorum</i>	0,086	0,086	0,087	0,086	0,086	0,090	0,084	0,092	0,094	0,094	0,090								
<i>A. pertinax</i>	0,091	0,091	0,090	0,090	0,091	0,098	0,089	0,098	0,096	0,101	0,093	0,040							
<i>A. canicularis</i>	0,101	0,100	0,100	0,099	0,098	0,099	0,090	0,097	0,095	0,103	0,099	0,057	0,061						
<i>A. aurea</i>	0,094	0,094	0,094	0,091	0,092	0,096	0,095	0,096	0,098	0,094	0,094	0,053	0,052	0,060					
<i>A. nana</i>	0,092	0,090	0,092	0,090	0,090	0,094	0,090	0,098	0,097	0,097	0,097	0,054	0,060	0,060	0,052				
<i>A. leucophthalmus</i>	0,098	0,098	0,099	0,097	0,097	0,103	0,098	0,098	0,101	0,105	0,099	0,091	0,095	0,096	0,091	0,098			
<i>A. holochlora</i>	0,103	0,102	0,103	0,101	0,101	0,102	0,098	0,098	0,101	0,107	0,099	0,089	0,097	0,096	0,094	0,098	0,024		
<i>A. wagleri</i>	0,099	0,098	0,100	0,099	0,099	0,101	0,093	0,097	0,098	0,107	0,100	0,090	0,092	0,093	0,095	0,100	0,040	0,038	
<i>A. mitrata</i>	0,100	0,098	0,100	0,099	0,100	0,099	0,094	0,097	0,099	0,105	0,098	0,088	0,093	0,093	0,095	0,100	0,043	0,038	
<i>A. euops</i>	0,101	0,100	0,102	0,100	0,101	0,098	0,095	0,098	0,102	0,107	0,102	0,093	0,097	0,097	0,096	0,101	0,047	0,044	
<i>A. chloroptera</i>	0,098	0,097	0,098	0,098	0,098	0,099	0,094	0,101	0,101	0,105	0,101	0,091	0,096	0,096	0,096	0,101	0,048	0,045	
<i>A. erythrogenys</i>	0,100	0,098	0,100	0,099	0,099	0,101	0,094	0,100	0,103	0,107	0,103	0,092	0,095	0,097	0,095	0,101	0,048	0,045	
<i>A. brevipes</i>	0,098	0,097	0,098	0,097	0,098	0,099	0,094	0,100	0,102	0,105	0,102	0,089	0,092	0,096	0,096	0,100	0,046	0,042	
<i>A. finschi</i>	0,098	0,096	0,098	0,097	0,097	0,100	0,093	0,098	0,101	0,104	0,100	0,090	0,094	0,097	0,097	0,100	0,048	0,043	
<i>A. rubritorquis</i>	0,099	0,097	0,099	0,098	0,099	0,100	0,094	0,100	0,102	0,104	0,102	0,091	0,095	0,098	0,098	0,101	0,049	0,046	
<i>A. acuticaudata</i>	0,098	0,097	0,097	0,095	0,095	0,101	0,098	0,099	0,101	0,097	0,099	0,089	0,092	0,094	0,096	0,097	0,098	0,095	
<i>Diopsittaca nobilis</i>	0,097	0,096	0,097	0,094	0,094	0,099	0,101	0,101	0,099	0,099	0,103	0,091	0,097	0,099	0,096	0,098	0,098	0,100	
<i>Guarouba guarouba</i>	0,096	0,095	0,096	0,093	0,093	0,100	0,095	0,099	0,093	0,098	0,098	0,083	0,088	0,094	0,090	0,092	0,097	0,096	
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	0,092	0,092	0,092	0,090	0,090	0,092	0,088	0,094	0,095	0,096	0,096	0,088	0,093	0,091	0,094	0,092	0,091	0,092	
<i>Cyanoliseus patagonus</i>	0,105	0,104	0,105	0,104	0,103	0,107	0,105	0,102	0,104	0,099	0,101	0,090	0,098	0,101	0,098	0,098	0,106	0,101	
<i>Epicognathus leptorhynchus</i>	0,101	0,101	0,101	0,099	0,099	0,104	0,098	0,096	0,097	0,105	0,102	0,092	0,094	0,098	0,100	0,100	0,097	0,097	
<i>Rhynchositta pachyrhyncha</i>	0,117	0,117	0,118	0,117	0,117	0,118	0,113	0,116	0,114	0,111	0,111	0,106	0,101	0,114	0,109	0,109	0,116	0,115	
<i>Pyrrhura leucotis</i>	0,109	0,108	0,108	0,109	0,109	0,107	0,104	0,107	0,107	0,111	0,106	0,098	0,100	0,103	0,103	0,105	0,098	0,102	
<i>Derophtus accipitrinus</i>	0,119	0,119	0,120	0,119	0,119	0,124	0,114	0,118	0,112	0,121	0,120	0,110	0,118	0,113	0,120	0,115	0,118	0,116	
<i>Pionites leucogaster</i>	0,107	0,107	0,107	0,106	0,105	0,112	0,111	0,112	0,115	0,120	0,118	0,103	0,108	0,109	0,113	0,110	0,110	0,108	
<i>Forpus crassirostris</i>	0,143	0,143	0,144	0,144	0,143	0,147	0,144	0,149	0,148	0,145	0,143	0,141	0,145	0,144	0,148	0,144	0,147	0,148	

(continuação da Tabela do Anexo I)

	A. wagleri	A. mitrata	A. euops	A. chloroptera	A. erythrogenys	A. brevipes	A. finschi	A. rubritorquis	A. acuticaudata	Diopsittaca nobilis	Guarouba guarouba	Anodorhynchus hyacinthinus	Cyanoliseus patagonos	Enicognathus leptorhynchus	Rhynchopsitta pachyrhyncha	Pyrrhura leucotis	Pionites leucogaster
<i>A. auricapilla</i>																	
<i>A. jandaya</i>																	
<i>A. solstitialis GB</i>																	
<i>A. solstitialis</i>																	
<i>A. maculata</i>																	
<i>Nandayus nenday</i>																	
<i>A. weddellii</i>																	
<i>Cyanopsitta spixii</i>																	
<i>Orthopsittaca manilata</i>																	
<i>Ara ararauna</i>																	
<i>Primolius auricollis</i>																	
<i>A. cactorum</i>																	
<i>A. pertinax</i>																	
<i>A. canicularis</i>																	
<i>A. aurea</i>																	
<i>A. nana</i>																	
<i>A. leucophthalmus</i>																	
<i>A. holochlora</i>																	
<i>A. wagleri</i>																	
<i>A. mitrata</i>	0,023																
<i>A. euops</i>	0,029	0,023															
<i>A. chloroptera</i>	0,030	0,023	0,022														
<i>A. erythrogenys</i>	0,028	0,022	0,023	0,022													
<i>A. brevipes</i>	0,030	0,024	0,025	0,023	0,015												
<i>A. finschi</i>	0,029	0,024	0,024	0,023	0,014	0,010											
<i>A. rubritorquis</i>	0,029	0,022	0,023	0,023	0,013	0,011	0,009										
<i>A. acuticaudata</i>	0,092	0,096	0,095	0,095	0,096	0,096	0,093	0,096									
<i>Diopsittaca nobilis</i>	0,096	0,097	0,097	0,099	0,098	0,100	0,097	0,099	0,047								
<i>Guarouba guarouba</i>	0,093	0,092	0,093	0,096	0,095	0,094	0,092	0,093	0,058	0,054							
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	0,087	0,090	0,091	0,089	0,091	0,092	0,089	0,090	0,084	0,090	0,087						
<i>Cyanoliseus patagonos</i>	0,105	0,102	0,103	0,106	0,102	0,103	0,100	0,103	0,094	0,094	0,090	0,091					
<i>Enicognathus leptorhynchus</i>	0,095	0,095	0,096	0,098	0,098	0,096	0,096	0,097	0,092	0,097	0,095	0,090	0,097				
<i>Rhynchopsitta pachyrhyncha</i>	0,113	0,114	0,112	0,114	0,112	0,113	0,112	0,114	0,113	0,111	0,114	0,106	0,105	0,109			
<i>Pyrrhura leucotis</i>	0,098	0,100	0,100	0,100	0,101	0,099	0,098	0,100	0,101	0,107	0,105	0,101	0,107	0,099	0,110		
<i>Derophtus accipitrinus</i>	0,116	0,117	0,117	0,119	0,119	0,118	0,117	0,119	0,113	0,114	0,112	0,107	0,114	0,111	0,123	0,112	
<i>Pionites leucogaster</i>	0,107	0,107	0,106	0,108	0,108	0,107	0,106	0,109	0,107	0,114	0,109	0,106	0,113	0,107	0,118	0,105	
<i>Forpus crassirostris</i>	0,144	0,144	0,146	0,143	0,145	0,144	0,143	0,144	0,149	0,147	0,144	0,144	0,153	0,144	0,153	0,144	0,142