

Fernanda Midori Sato

Análise filogeográfica multilocos do
complexo *Amazona aestiva/A. ochrocephala*
(Aves, Psittacidae)

Multilocus phylogeographical analysis of the
species complex *Amazona aestiva/A.*
ochrocephala (Aves, Psittacidae)

São Paulo

2016

Fernanda Midori Sato

Análise filogeográfica multilocos do
complexo *Amazona aestiva/A. ochrocephala*
(Aves, Psittacidae)

Multilocus phylogeographical analysis of the
species complex *Amazona aestiva/A.*
ochrocephala (Aves, Psittacidae)

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

Orientador(a): Cristina Yumi Miyaki

São Paulo

2016

Sato, Fernanda Midori

Análise filogeográfica multilocos do complexo *Amazona aestiva/ochrocephala* (Aves, Psittacidae)

55 páginas

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

1. Filogeografia 2. Região Neotropical 3. Papagaio I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

Dedicatória

Aos meus pais, meus irmãos
e meu amor, Fernando,
por serem o meu alicerce.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Cristina Yumi Miyaki**, pela confiança e oportunidade para realizar esse trabalho, pela orientação e grande aprendizado durante esses anos. Agradeço também pela paciência e pelas palavras de apoio durante os meus momentos de crise.

Aos amigos do LGEMA, **Bia, Denise, Ana Cris, Claydson, Henrique Batalha, Marcos, Maria, Henrique II, Adri, Tiago, Rafa, Greg, Manuelita, Carla, Andressa, Ana Carolina, Bruno, Fábio e Cibele**, pelo companheirismo, amizade, risadas, momentos de descontração e de “ócio criativo”, e também pelas valiosas discussões e opiniões, que contribuíram muito para minha formação acadêmica e também pessoal.

Aos funcionários do Instituto de Biociências, em especial à **Maria da Conceição Andrade** e **Lucilene Silva** pelo auxílio e apoio ao nosso laboratório. À **Tatiana C. Silva Corrêa** por todo o apoio com o sequenciamento. A todos os funcionários da **Secretaria do Departamento de Genética e da Pós-Graduação** por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Aos Museus/coleções e curadores por terem cedido amostras para este trabalho: **Alexandre Aleixo** (Museu Paraense Emílio Goeldi), **Marcos Raposo** (MNRJ), **Renato Caparroz** (UFG e UCB) e **Igor Berkunsky** (Universidad Nacional Del Centro de La Provincia de Buenos Aires).

Ao **Francisco Prodescimi e sua equipe** pelo desenvolvimento dos *primers* dos locos nucleares anônimos e por outras contribuições a esse trabalho.

Ao **ICMBio** e **IBAMA** pelas licenças e permissões para coleta.

Ao **CNPq** pela minha bolsa de mestrado. À **FAPESP, CNPq, CAPES, BioComp, Instituto de Biociências da USP e Pró-Reitoria de Pesquisa da USP** pelo apoio e suporte financeiro à este trabalho.

A todos os **professores** da graduação na UEL e da pós graduação na USP, que foram a base da minha formação acadêmica.

Aos amigos e professores do meu antigo laboratório LAGEA, **Fernanda Simões, Silvia Sofia, Karen, Rafael, Bruna, Carol, Alessandra, Wilson, Diego, Camila e Faustinho** que sempre me apoiaram e me incentivaram durante a graduação, além de todo o aprendizado durante o meu primeiro contato com a genética molecular.

Aos **amigos de Londrina**, biólogos e não biólogos, pelo companheirismo, aventuras e diversões que tornaram alegres os meus anos na graduação. Em especial à **Andressa Nakagawa**, minha irmã de coração, que mesmo longe e com fuso horário invertido, arruma um tempinho para conversarmos, darmos risada e apoiar uma à outra. E também à **Saiko Yamamoto**, que sempre se lembra de mim com carinho lá do outro do mundo.

À minha família pelo apoio constante, principalmente aos meus primos **Juliana** e **Alessandro** por todo o companheirismo, diversão e apoio durante a minha estadia na “cidade grande”.

Ao **Fernando H. O. Lopes**, meu grande amor, por continuar a me amar apesar da distância desde o comecinho do nosso namoro. Por sempre me dar carinho, me ouvir e me apoiar quando preciso.

Aos meus irmãos, **Álvaro** e **Yukari**, por sempre se lembrarem de mim com carinho e esperarem ansiosamente pela minha volta para casa.

Ao meu pai e minha mãe, **Milton** e **Sonia**, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a ir além. Por todo o amor, carinho, apoio, paciência e sacrifício que tem feito para eu alcançar meus objetivos. Mãe, pai, apesar dos momentos difíceis que estamos passando, agradeço a Deus por vocês serem meus pais.

Índice

1. Introdução	01
1.1 Hipóteses de diversificação na região Neotropical	01
1.2 Filogeografia	03
1.3 Complexo <i>Amazona aestiva/A. ochrocephala</i>	07
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos	14
3.1 Amostragem	14
3.2 Marcadores Moleculares	16
3.3 Extração de DNA	17
3.4 Amplificação do DNA	18
3.5 Purificação e Sequenciamento	19
3.6 Sexagem molecular	19
3.7 Análise dos dados	20
4. Resultados	24
5. Discussão	35
5.1 Estrutura genética do complexo <i>A. aestiva/A. ochrocephala</i>	35
5.2 Relação entre <i>A. aestiva</i> e <i>A. ochrocephala</i>	39
5.3 Implicações para conservação	43
6. Conclusões	44
Resumo	45
Abstract	47
Referências Bibliográficas	48

1. Introdução

1.1 Hipóteses de diversificação na região Neotropical

A região Neotropical abrange uma das maiores biodiversidades do mundo e diversos *hotspots* de biodiversidade, isto é, áreas com alta concentração de espécies endêmicas com alto nível de degradação (Myers, 2000; Rull, 2008). A origem e a evolução de tamanha diversidade biológica têm chamado a atenção de diversos pesquisadores evolutivos (Antonelli & Sanmartín, 2011) e assim, várias hipóteses de diversificação tem sido propostas na tentativa de explicar tal fenômeno, tais como a hipótese dos refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini & Willians, 1970), dos rios como barreiras (Wallace, 1852) e gradientes ecológicos (Endler, 1982), entre outros.

Entre as diversas hipóteses, a teoria dos refúgios (Haffer, 1969; Vanzolini & Willians, 1970) pode ser considerada uma das mais populares. Segundo esta teoria, os ciclos climáticos que ocorreram no planeta durante o Pleistoceno teriam modificado a cobertura vegetal. Assim, durante os períodos secos e frios as florestas úmidas teriam sido fragmentadas e isoladas uma das outras por áreas de vegetações abertas. Do mesmo modo, populações de organismos dependentes de florestas, abrigados em diferentes fragmentos florestais (refúgios), permaneceriam isoladas uma das outras durante este período, podendo ocorrer diferenciação. Inversamente, durante os períodos úmidos e quentes, os fragmentos florestais se expandiriam e se uniriam novamente, permitindo também que as populações de organismos se expandissem e se conectassem. Assim, se o tempo de isolamento tiver sido longo o suficiente, mesmo em contato, as populações se manteriam como entidades diferenciadas. Esta teoria tem sido proposta como explicação para a diversificação de diversos organismos que ocorrem na região Neotropical (Ribas & Miyaki, 2004; Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Maldonado-Coelho, 2012). Apesar da sua popularidade, essa hipótese também tem sido refutada em alguns trabalhos. Por exemplo, diversos autores, com base em dados paleoecológicos, sugerem a ausência de fragmentação florestal na Amazônia durante o Pleistoceno (Colinvaux *et al.*, 1996, 2000; Bush & de Oliveira, 2006). Além disso, diversas estimativas de tempo de divergência mostram que vários eventos de diversificação parecem ter ocorrido anteriormente ao Quaternário, não sendo então restrito a esse período (Cracraft &

Prum, 1988; Moritz *et al.* 2000; Eberhard & Bermingham, 2005; Rull, 2008, 2011). No entanto, com respeito a essa última crítica, Haffer (1997) argumenta que a teoria dos refúgios não se restringe apenas ao Quaternário, mas sim que os processos de diversificação poderiam ter ocorrido durante os ciclos climáticos durante o Terciário ou até mesmo em períodos anteriores.

Outra hipótese de diversificação é a dos rios como barreira (Wallace, 1852). Segundo essa hipótese os rios poderiam servir como barreiras geográficas ao fluxo gênico. Assim, o surgimento de um rio poderia ocasionar o isolamento de indivíduos em lados opostos e, dado o devido tempo, poderia ocorrer diferenciação entre os mesmos. Vários estudos têm mostrado padrões de distribuição de diversos táxons congruentes com essa hipótese, em particular na região da bacia amazônica onde os rios parecem ter tido um papel importante no processo de diversificação (Ayres & Clutton-Brock, 1992; Ribas *et al.* 2011; Souza-Neves *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014a, 2014b). No entanto esse modelo também não está livre de críticas. Haffer (1997) postula que a efetividade dos rios como barreira ao fluxo gênico diminuiria gradualmente em direção à cabeceira (largura do rio mais estreita), colocando em questão a validade desse modelo. Outra crítica é o fato de que os rios poderiam apenas estar delimitando a atual distribuição de táxons que teriam se divergido por outros mecanismos independentemente dos rios (revisado por Moritz *et al.* 2000).

Diferentemente dos modelos anteriores, a hipótese dos gradientes sugere que a diversificação também pode ocorrer em parapatria (Endler, 1982). De acordo com essa hipótese indivíduos que habitam ambientes adjacentes e distintos estariam sujeitos a pressões seletivas diferentes, o que poderia levar a uma divergência adaptativa entre eles, não sendo necessária a completa supressão do fluxo gênico como nos modelos anteriores (revisado por Moritz *et al.* 2000). Assim, é esperada maior divergência entre habitats do que dentro de habitats (Moritz *et al.* 2000). Apesar de os modos de especiação alopátricos ainda serem os mais comumente sustentados, alguns estudos têm mostrado resultados concordantes com esse modelo (Smith *et al.*, 1997; Ogden & Thorpe, 2002), mas poucos para a região Neotropical (Werneck *et al.*, 2012a)

A aparente falta de consenso sobre a origem e manutenção dessa grande biodiversidade sugere uma história complexa para a região Neotropical e que possivelmente os processos de diversificação não se restringem a um único

mecanismo ou período (Rull, 2011; Turchetto-Zolet, 2013). Dessa forma, fica clara a necessidade de mais estudos para entendermos melhor como surgiu e se mantém tamanha diversidade. Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas moleculares forneceu uma nova ferramenta para estudos evolutivos (Crisci *et al.*, 2003) e propiciou o surgimento de uma nova área de estudo que possibilitaria testes de hipóteses: a filogeografia (Avise *et al.*, 1987).

1.2 Filogeografia

A filogeografia, considerada uma subárea da Biogeografia, tem como objetivo geral descrever como e quais processos evolutivos são responsáveis pela diversidade e distribuição de linhagens genéticas entre e dentro de espécies próximas (Avise, 2000). Essa área de estudo relativamente recente, foi proposta por Avise *et al.* (1987) e estabelece uma conexão entre genética de populações (microevolução) e filogenia (macroevolução), que até então vinham se desenvolvendo separadamente.

Com isso em mente, o DNA mitocondrial (mtDNA) foi considerado como o marcador molecular ideal para estudos filogeográficos devido a suas características, tais como: estrutura simples com ausência de íntrons, espaçadores, pseudogenes, elementos repetitivos ou elementos transponíveis ativos, evolução rápida em relação ao DNA nuclear e seu modo de herança uniparental (normalmente materna) livre de eventos de recombinação (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2009). Além disso, devido ao seu caráter haplóide e seu modo de herança, o mtDNA possui tamanho efetivo aproximadamente 4 vezes menor comparado ao do DNA nuclear, estando assim mais sujeito aos efeitos da deriva gênica e o sorteamento de linhagens ocorreria de forma mais rápida, permitindo recuperar eventos de diversificação mais recentes (Zink & Barrowclough, 2008; Avise, 2009).

Inicialmente, a abordagem clássica dos estudos filogeográficos possuía um caráter descritivo e consistia na inferência de hipóteses sobre a história evolutiva de táxons ou linhagens baseada em uma árvore de gene ou rede de haplótipos em um contexto geográfico, sobrepondo-as sobre um mapa de distribuição. De acordo com Avise *et al.* (1987) cinco padrões filogeográficos básicos poderiam ser encontrados: linhagens com grande divergência genética e separadas geograficamente (padrão 1) ou co-ocorrendo em uma mesma área (padrão 2). As linhagens podem ainda

apresentar baixa divergência e estarem geograficamente isoladas (padrão 3), serem simpátricas (padrão 4) ou ocorrendo de forma intermediária, com alguns haplótipos geograficamente isolados e outros amplamente distribuídos (padrão 5).

Entretanto, nas últimas décadas, a filogeografia teve um grande avanço com a incorporação da teoria da coalescência, que fornece um suporte estatístico na estimativa de parâmetros populacionais, como tamanho efetivo populacional, taxa de migração, tempo de divergência, mudanças no tamanho populacional; além do desenvolvimento de metodologias que permitem testar hipóteses (cenários demográficos) baseadas em modelos estatísticos (Knowles & Maddison, 2002; Rosenberg & Nordborg, 2002; Hickerson *et al.*, 2010).

A teoria da coalescência, descrita por Kingman na década de 80, prediz que as linhagens presentes atualmente descendem de um ancestral comum em algum momento da história no passado (Avice, 2009). Isto é, se traçarmos a ancestralidade de um grupo de linhagens (ou alelos) voltando no tempo, eventualmente elas coalescerão até uma única linhagem que corresponde ao ancestral comum mais recente (MRCA – do inglês *most recent common ancestor*; Nordborg, 2003). Uma interessante analogia desse processo, denominado “*Bugs in a box*”, foi descrita por Felsenstein (2004) em seu livro *Inferring Phylogenies*: considerando que, dentro de uma caixa, existam k besouros hiperativos, vorazes, insaciáveis e não discriminantes voando aleatoriamente, ocasionalmente ocorrem colisões entre dois besouros e um devora o outro (evento coalescente), sendo insaciáveis, logo voltam a voar aleatoriamente, repetindo o processo diversas vezes até que reste apenas um besouro (o MRCA).

Todavia, a coalescência resultante em um ancestral comum não significa a existência exclusiva do mesmo no passado, mas sim a perda de linhagens ao longo das gerações até o presente (Avice, 2009). Um dos principais fatores que geram esse processo coalescente é a diferença no número de filhotes produzidos entre os indivíduos, pois aqueles que não produzirem descendentes não transmitirão seus alelos para a próxima geração, o que pode culminar com a extinção de sua linhagem. Por outro lado, a linhagem de indivíduos com muitos descendentes proliferará. Assim, a estrutura de uma árvore de genes depende de quais indivíduos deixaram descendentes, e no caso de locos diploides, qual dos dois alelos foi transmitido pela reprodução (Avice, 2009; Nielsen & Beaumont, 2009). A aleatoriedade desse

processo pode resultar em árvores de genes que diferem em sua estrutura para os diferentes locos. Assim, uma única árvore representa apenas uma de diversas histórias possíveis de um grupo de organismos, sendo necessária a análise de diversos locos para reduzir o efeito desta estocasticidade, além de aumentar o poder estatístico diminuindo os erros nas estimativas (Wakeley, 2002; Avise, 2009; Brito & Edwards, 2009; Nielsen & Beaumont, 2009).

Dentro desta perspectiva, ficou evidente a necessidade de adicionar dados nucleares nos estudos filogeográficos, pois o genoma mitocondrial, apesar de possuir diversas características desejáveis, é considerado como um loco único (Avise, 2009). Diversos marcadores nucleares são conhecidos atualmente, tais como: microssatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*); estes últimos podem ser identificados em íntrons, locos anônimos e cromossomos sexuais (ex. Y nos mamíferos e Z para as aves) (Brito & Edwards, 2009). A seguir são detalhados os dois últimos tipos de marcadores que foram utilizados no presente estudo.

Locos nucleares anônimos são regiões do genoma não codificantes e selecionados aleatoriamente (Lee & Edwards, 2008; Thomson *et al.*, 2010). Algumas características que tornam esse tipo de marcador útil para inferências filogeográficas são: idealmente se localizam em diversas áreas do genoma e, assim, não estão ligados; possuem elevadas taxas de substituição nucleotídica, o que os tornam informativos até mesmo em estudos de divergências recentes; e possuem baixa probabilidade de estarem sob ação da seleção por meio do efeito carona, ao contrário do que ocorre com íntrons (Brito & Edwards, 2008; Thomson *et al.*, 2010; Bertozzi *et al.*, 2012). Segundo Thomson *et al.* (2010), uma das desvantagens desse tipo de marcador é a existência de possíveis genes parálogos que podem confundir a história evolutiva dos táxons estudados. No entanto, os autores sugerem algumas metodologias que podem ser utilizadas a fim de evitar esse problema, sendo as duas principais: a) fazer BLAST do loco contra um genoma completo e bem anotado e verificar a presença de múltiplos resultados com alto score; b) analisar a própria sequência. Esta última metodologia permite detectar sítios heterozigotos presentes em todos os indivíduos sequenciados o que indicaria a presença de paralogia (Rosenblum *et al.*, 2007; Bertozzi *et al.*, 2012).

Outro grupo de marcadores que vem sendo utilizado com mais frequência em estudos moleculares de aves são os locos ligados ao cromossomo sexual Z. Em geral, se espera encontrar mais diferenciação e menos introgressão entre espécies em marcadores no Z do que em locos autossômicos, devido à hipótese de que os cromossomos sexuais desempenhariam importante papel no processo de especiação. Isso é previsto pela Regra de Haldane que indica que na prole derivada de duas espécies distintas (híbridos), o sexo heterogamético tende a ser mais suscetível à infertilidade e/ou inviabilidade (Coyne & Orr, 2004). A esterilidade do híbrido poderia ser causada pela interação de genes com incompatibilidade alélica desenvolvida em alopatria e, sendo esses alelos recessivos, genes que estão localizados em cromossomos sexuais teriam maior impacto, pois no sexo heterogamético não haveria possibilidade de o alelo recessivo ser “mascarado” por um alelo dominante, como ocorre em genes autossômicos (Teoria da Dominância de Dobzhansky-Muller; Coyne & Orr, 2004; Carling & Brumfield, 2009).

Adicionalmente, Mank *et al.* (2007) detectaram elevadas taxas de evolução adaptativa em genes ligados ao cromossomo Z em comparação aos autossômicos (*Fast-Z effect*) em galinha (*Gallus gallus*) e zebra finch (*Taeniopygia guttata*). Uma das explicações para o fenômeno também se baseia na Teoria da Dominância: mutações recessivas benéficas ou deletérias expostas no sexo heterogamético podem ser mais facilmente fixadas ou eliminadas, respectivamente (Charlesworth *et al.*, 1987). A deriva genética também teria uma contribuição para o *Fast-Z effect* - devido ao menor tamanho populacional efetivo do cromossomo Z e consequentemente maior ação da deriva - e na taxa de fixação de mutações levemente deletérias (Mank *et al.*, 2007, 2010).

Sumariamente, segundo a regra de Haldane, é esperado encontrar níveis mais baixos de introgressão em genes ligados ao cromossomo Z comparado aos autossômicos, devido ao acúmulo de incompatibilidade alélica entre os táxons, que pode ser acelerada pelo *Fast-Z effect* e apresentar, consequentemente, maior diferenciação interespecífica (Carling & Brumfield, 2008; Elgvin *et al.*, 2011). Diversos estudos empíricos realizados em aves têm mostrado resultados que são congruentes com essa hipótese (Saetre *et al.*, 2003; Borge *et al.*, 2005; Carling & Brumfield, 2008, 2009; Carling *et al.*, 2010; Storchová *et al.*, 2010; Elgvin *et al.*, 2011).

Recentemente, Corl & Ellegren (2013) testaram a utilidade dos genes ligados ao cromossomo Z em estudos filogenéticos. Foi concluído que, ao adicionar dados de um ou mais genes ligados ao Z a um conjunto de locos autossômicos, há uma substancial melhora na acurácia e resolução da árvore de espécie. Esse bom resultado, segundo os autores, é devido ao menor tamanho efetivo populacional do Z, sendo assim esperado pouco conflito entre a árvore de gene e a de espécie gerado pelo sorteamento incompleto de linhagens. Ainda, genes mitocondriais possuem menor tamanho efetivo do que os ligados ao Z. Assim, a inclusão de dados mitocondriais melhora ainda mais a resolução da árvore de espécie, indicando que, apesar da ascensão da abordagem multilocos, dados mitocondriais não devem ser completamente removidos dos estudos filogenéticos e filogeográficos (revisado por Brito & Edwards, 2009).

Assim, juntamente com estes avanços e maior robustez nas metodologias de análise, houve um aumento global considerável na quantidade de estudos filogeográficos desde a publicação de Avise *et al.* (1987). No entanto, para a região neotropical, que é megabiodiversa, esses números ainda são relativamente baixos, reforçando a necessidade de realizar estudos nessa região (Martins & Domingues, 2011; Turchetto-Zolet, 2013).

1.3 Complexo *Amazona aestiva/A. ochrocephala*

O gênero *Amazona* é um dos grupos de maior representatividade dentre os psitacídeos possuindo 31 espécies, das quais 11 estão presentes no território brasileiro (Collar, 1997; CBRO, 2011). As espécies de papagaios *Amazona aestiva* e *Amazona ochrocephala* possuem ampla distribuição na região Neotropical, compreendendo a América do Sul e a América Central (Collar, 1997). Esses papagaios possuem plumagem predominantemente verde com a cabeça de coloração amarela, e podem ser morfologicamente diferenciados principalmente pela fronte azulada característica de *A. aestiva*. Ambas as espécies estão listadas no Apêndice II do CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*), mesmo sendo classificadas como de baixa preocupação (*least concern*) pela IUCN (*Internacional Union for Conservation of Nature*; IUCN, 2016).

A. aestiva, popularmente conhecido como papagaio-verdadeiro, possui distribuição ampla que compreende principalmente a região do Cerrado brasileiro e o Chaco na Argentina (Figura 1). Há duas subespécies descritas. *A. a. aestiva* possui a região do encontro das asas de cor vermelha e ocorre na porção leste do Brasil, desde o Maranhão, Pará e Piauí até o Rio Grande do Sul. Já *A. a. xanthopteryx* tem o encontro das asas amarela ou uma mistura de amarelo e vermelho e apresenta distribuição que vai desde a Bolívia e sudoeste do Mato Grosso até o norte da Argentina (Forshaw, 1989; Collar, 1997). Na região do Mato Grosso do Sul há sobreposição na distribuição dessas subespécies com indivíduos com fenótipo intermediário de coloração mista no encontro das asas (Darrieu, 1983 *apud* Caparroz *et al.*, 2009). A espécie está incluída no “Plano de Ação Nacional para a Conservação de Psitacídeos da Mata Atlântica” como espécie de interesse especial por ser um dos principais alvos do comércio ilegal de animais silvestres (Schunck *et al.*, 2011; IUCN, 2013). Os Planos de Ação Nacionais são documentos oficiais do governo brasileiro, nesse caso sendo representado pelo Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade, para a conservação de espécies ameaçadas do Brasil.

A espécie *A. ochrocephala* ocorre desde a América Central até a bacia Amazônica na América do Sul (Collar, 1997; Figura 1) e possui taxonomia um tanto quanto controversa. Alguns autores consideram a existência de uma única espécie (*A. ochrocephala*) contendo nove (Forshaw, 1989) ou dez (Collar, 1997) subespécies que diferem quanto à quantidade de coloração amarela na cabeça e coloração do bico, sendo três delas com ocorrência no Brasil (*A. o. ochrocephala*, *A. o. nattereri* e *A. o. xantholaema*). Por outro lado a *American Ornithologists' Union* (1998) reconhece três espécies e diversas subespécies (diferenciadas pela quantidade de cor amarela na cabeça e pela coloração do bico): *A. oratrix* (quatro subespécies), *A. auropalliata* (três subespécies) e *A. ochrocephala* (quatro subespécies). Recentemente o *International Ornithological Committee* (IOC) elevou a subespécie *A. oratrix tresmariae* para nível de espécie, resultando em uma nova classificação com quatro espécies (*A. oratrix*, *A. auropalliata*, *A. ochrocephala* e *A. tresmariae*; Gill & Donsker, 2015). Tais rearranjos taxonômicos foram realizados baseados em alguns estudos de sistemática molecular descritos a seguir.

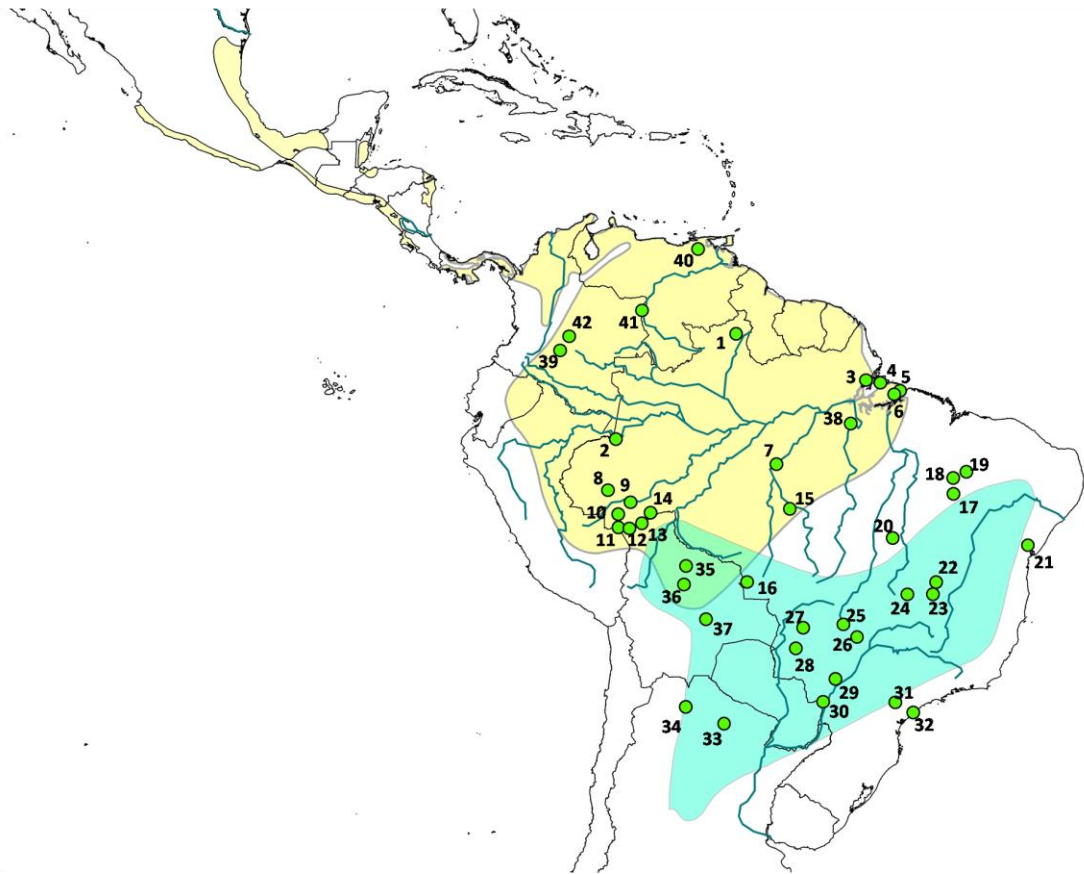


Figura 1: Distribuição geográfica de *Amazona aestiva* em turquesa e de *Amazona ochrocephala* em amarelo (INFONATURA, 2007). Os pontos verdes indicam localidades amostradas (ver Tabela 1).

Eberhard & Bermingham (2004) realizaram uma análise filogenética utilizando três genes de DNA mitocondrial (mtDNA) de oito subespécies de *A. ochrocephala* e de *A. aestiva*. Eles recuperaram três clados compostos por: 1) indivíduos das então subespécies de *A. ochrocephala* que ocorrem na América Central - CA (*oratrix*, *belizensis*, *auropalliata*, *tresmariae*, *panamensis*), os quais mostraram monofilia recíproca entre si; 2) indivíduos das subespécies de *A. ochrocephala* da América do Sul - SA (*ochrocephala* do Pará, *nattereri* da Bolívia e *xantholaema* da Ilha do Marajó) e indivíduos de *A. aestiva*, ou seja, sem monofilia recíproca entre esses táxons; 3) um único indivíduo de *A. ochrocephala* coletado na Colômbia (norte da América do Sul, NSA). Ainda nesse trabalho, essas linhagens também foram obtidas em uma filogenia baseada somente em citocromo oxidase I (COI) e com a adição de mais um indivíduo de *A. ochrocephala* da Colômbia e dois da Venezuela, os quais foram agrupados no clado NSA. Esses autores levantaram a

hipótese de que a diversificação dessas linhagens teria sido causada pelo rio Amazonas que seria uma barreira geográfica e por refúgios pleistocênicos. No mesmo estudo, a presença de indivíduos de *A. aestiva* em clados com *A. ochrocephala* foi melhor investigada utilizando sequências de um íntron nuclear para um subconjunto de indivíduos, que indicou, sem suporte, o monofiletismo recíproco entre os táxons.

Para investigar melhor essa questão de possível ausência de monofiletismo recíproco, Ribas *et al.* (2007) adicionaram 28 indivíduos de *A. aestiva* e *A. ochrocephala* da América do Sul à matriz de dados do trabalho anterior. O estudo, também baseado em sequências de mtDNA, recuperou os três principais clados descritos por Eberhard & Bermingham (2004) e, similarmente, todos os indivíduos de *A. aestiva* foram recuperados no clado da América do Sul, que é composto por duas linhagens: **SA 1** - *A. a. xantholaema* (Ilha de Marajó), *A. a. aestiva* (Mato Grosso do Sul e Minas Gerais) e *A. o. nattereri* (leste da Bolívia); **SA 2** - formado por *A. o. nattereri* (Acre e norte-leste da Bolívia), *A. a. aestiva* (Mato Grosso do Sul e Minas Gerais), *A. a. xanthopteryx* (Mato Grosso) e *A. o. ochrocephala* (Maranhão e Pará). Esse resultado indicou que, apesar de geograficamente próximos, indivíduos da Ilha do Marajó e Macapá ocorrem em clados distintos, indicando que o rio Amazonas poderia ter sido barreira entre as linhagens SA e não entre SA e o NSA como proposto por Eberhard & Bermingham (2004) (Ribas *et al.*, 2007). Alternativamente, os autores sugeriram que a hipótese dos refúgios não pode ser refutada como possível processo associado a essa diferenciação genética. Ainda neste estudo, o clado NSA foi encontrado na posição basal da filogenia, sugerindo que a área de distribuição ancestral de *A. ochrocephala* seria na porção norte da América do Sul e que uma posterior expansão e colonização poderia ter ocorrido desta região para o norte e para sul (Ribas *et al.*, 2007).

Posteriormente, Caparroz *et al.* (2009) realizaram um estudo filogeográfico mitocondrial desse complexo, incluindo mais amostras de *A. aestiva*, espécie analisada com mais ênfase nesse trabalho. A rede de haplótipos recuperou os mesmos agrupamentos (CA, NSA e SA) descritos anteriormente (Eberhard & Bermingham, 2004; Ribas *et al.*, 2007). Foram encontrados 13 haplótipos para *A. aestiva* sendo que todos pertencem ao clado SA que, assim como em Ribas *et al.* (2007), seria composto por duas linhagens. A primeira composta por quase que exclusivamente por indivíduos da porção norte e leste da sua distribuição (Bahia, Minas Gerais,

Tocantins, Distrito Federal e Goiás), todos os indivíduos de *A. o. xantholaema* e um *A. o. ochrocephala* de Santa Cruz (Bolívia) e a segunda linhagem formada em sua maior parte por indivíduos localizados na porção sudoeste (norte da Argentina e Mato Grosso do Sul), *A. o. ochrocephala* de Macapá e *A. o. nattereri* do Brasil e Bolívia. Essas duas linhagens são bastante concordantes com a distribuição geográfica das subespécies de *A. aestiva*, contudo há representantes de *A. ochrocephala* incluídos nas duas linhagens, sendo que dois dos haplótipos encontrados são compartilhados entre as duas espécies. Além disso, os autores encontraram sinais de expansão demográfica nas duas linhagens, que teriam se divergido há aproximadamente 300 mil anos, durante o Pleistoceno. Os autores ainda sugerem que a região do Mato Grosso do Sul abrigaria populações ancestrais do papagaio-verdadeiro e que uma expansão populacional teria ocorrido em direção ao Nordeste e o Sudoeste durante as flutuações climáticas durante o Pleistoceno, e que as duas linhagens teriam se mantido devido ao baixo fluxo gênico entre eles.

Recentemente, Urantówka *et al.* (2014) realizaram um estudo filogenético molecular com foco nas relações entre *A. ochrocephala* e *A. barbadensis* utilizando sete conjunto de dados baseados nas sequências de mtDNA de Russello & Amato (2004) e Ribas *et al.* (2007). Sumariamente, todas as filogenias recuperaram os clados CA, NSA, SA 1 e SA 2, assim como a ausência de monofiletismo recíproco entre *A. ochrocephala* e *A. aestiva*. As análises também mostraram *A. barbadensis*, com distribuição na Venezuela e em algumas ilhas próximas ao Caribe, como grupo irmão dos indivíduos do clado NSA. Além disso, os táxons provavelmente mais próximos a esse grupo estão distribuídos nas Pequenas Antilhas. Desta forma, os autores sugeriram que a linhagem ancestral de *A. barbadensis*, *A. ochrocephala* e *A. aestiva* teria colonizado o norte da América do Sul (vindo das Pequenas Antilhas) há aproximadamente um milhão de anos, possivelmente devido a mudanças climáticas durante os ciclos glaciais. Posteriormente, teriam ocorrido dispersões do norte da América do Sul para a América Central e para o sul da América do Sul originando respectivamente os clados CA e SA (Urantówka *et al.*, 2014; Figura 2).

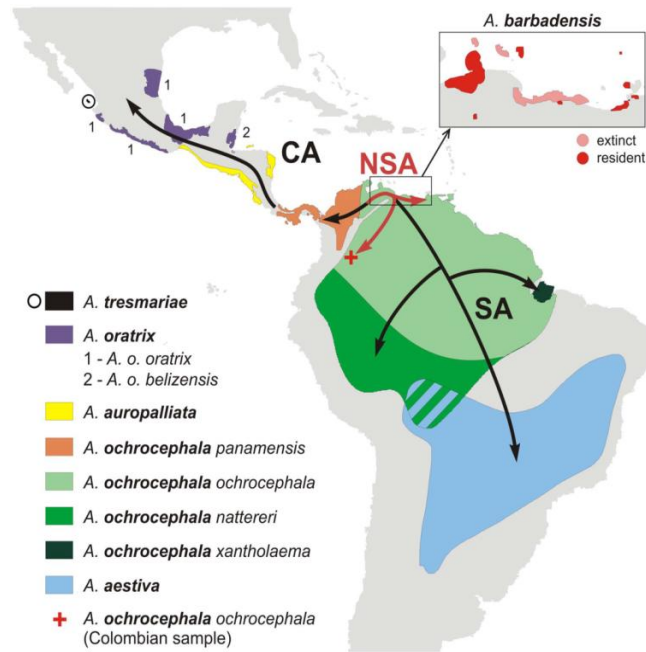


Figura 2. Hipótese de um possível cenário de diversificação do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala*. Fonte: Urantówka *et al.* (2014).

Diversos autores têm sugerido uma possível introgressão ou o sorteamento incompleto de linhagens como as principais causas da parafilia entre os táxons da América do Sul (Eberhard & Bermingham, 2004; Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009; Urantówka *et al.*, 2014). Contudo, é necessário realizar estudos com mais marcadores para testar essas hipóteses de maneira mais robusta, uma vez que os estudos anteriores foram baseados principalmente no DNA mitocondrial.

2. Objetivos

Tendo em vista que os trabalhos anteriores foram baseados apenas em marcadores mitocondriais, o presente trabalho tem como objetivo reconstruir e analisar a história evolutiva e demográfica do complexo *A. aestiva*/*A. ochrocephala* em um contexto multilocos.

Além disso, no Brasil, *A. aestiva* é considerada um dos principais alvos de captura na natureza devido à sua capacidade de vocalização e carisma. Por esta razão, a espécie que, apesar de ser considerada como de baixa preocupação para conservação, está incluída no Plano de Ação Nacional para a Conservação de Papagaios da Mata Atlântica (PAN de Papagaios; Shunck *et al.*, 2011). Assim, o presente estudo contempla a ação 3 do anexo “Recomendações para a conservação do Papagaio-Verdadeiro (*A. aestiva*)” do PAN de Papagaios (“Caracterizar o padrão filogeográfico e a estrutura genética do papagaio-verdadeiro em toda a sua área de distribuição”).

3. Material e Métodos

3.1 Amostragem

Para o presente estudo foram utilizadas 133 amostras de sangue, músculo, fígado ou pena, sendo 96 indivíduos de *Amazona aestiva* de 21 localidades e 37 indivíduos de *Amazona ochrocephala* de 16 localidades (Figura 1 e Tabela 1). Sequências de COI e ND2 obtidas previamente no nosso laboratório (Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009) foram incluídas nas análises. No presente estudo, 49 indivíduos utilizados nestes trabalhos anteriores tiveram marcadores adicionais sequenciados. Também foram utilizadas sequências de COI e ND2 de 10 indivíduos do estudo de Eberhard & Bermingham (2004). Esses indivíduos não tiveram marcadores adicionais sequenciados, uma vez que não tivemos acesso a essas amostras.

Tabela 1: Amostras de *Amazona ochrocephala* (Ao) e de *Amazona aestiva* (Aa). Os números do código (Cód.) se referem às localidades mostradas na Figura 1. MNT: Museu Nacional do Rio de Janeiro; MPEG: Museu Paraense Emilio Goeldi; LGEMA: Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves, IB-USP; UCB: Universidade Católica de Brasília; UFG: Universidade Federal de Goiás; *: Universidad Nacional del Centro de La Provincia de Buenos Aires.

Cód	Localidade	Latitude	Longitude	Amostras
Ao 1	Caracaraí, RR	3.4894	-60.773	MNT 2803
Ao 2	Tabatinga, AM	-4.3611	-69.7611	MPEG72658
Ao 3	Macapá, AP	0.45	-50.9333	LGEMA 5188 ^a , 5189, 5195 ^a , 5197 ^a , 5204 ^a
Ao 4	Chaves/Ilha de Marajó, PA	-0.16	-49.9883	LGEMA 5218, 5219 ^a , 5221 ^a , 5222 ^a , STRI- LPI ^c
Ao 5	Salvaterra/Ilha de Marajó, PA	-0.7533	-48.5167	LGEMA 4655, 4658, 4663 ^a , 4674 ^a
	Soure/Ilha de Marajó, PA	-0.7167	-48.5233	LGEMA 4671
Ao 6	Cachoeira do Arari/Ilha de Marajó, PA	-1.0114	-48.9633	LGEMA 4654, 4668, 4670
	Ponta de Pedra/Ilha de Marajó, PA	-1.3903	-48.8711	LGEMA 4669,
Ao 7	Jacareacanga, PA	-6.2222	-57.7528	LGEMA 6583 ^a
Ao 8	Feijó, AC	-8.1642	-70.3536	LGEMA 5704
Ao 9	Sena Madureira, AC	-9.0656	-68.6569	LGEMA 5711
Ao 10	Floresta Nacional Maracá, AC	-9.9528	-69.5766	LGEMA 5700 ^a , 5701, 5702
Ao 11	Assis Brasil, AC	-10.9414	-69.5669	LGEMA 5708 ^a , 5713

Continuação da Tabela 1					
Cód	Localidade	Latitude	Longitude	Amostras	
Ao 12	Basiléia, AC	-11.0046	-68.7233	LGEMA 5705, 5706 ^a	
	Xapurí, AC	-10.6517	-68.5044	LGEMA 5710 ^a , 5712	
	Cobija (Bolívia)	-11.0133	-68.7655	LGEMA 5707 ^a , LSU B9409 ^c	
Ao 13	Ramal da Gameleira, AC	-10.637	-67.8156	MPEG 64423	
Ao 14	Ramal Oco do Mundo, AC	-9.83667	-67.172	MPEG 64351	
Ao 15	Paranaíta, MT	-9.56278	-56.7614	MPEG 69240	
Ao 16	Vila Bela da Santíssima Trindade, MT	-15.0081	-59.9506	UFG 3740,	UFG 3747
Aa 16	Vila Bela da Santíssima Trindade, MT	-15.0081	-59.9506	LGEMA 4951 ^a , 4952 ^a , 4953 ^a	
Aa 17	Parque Nacional Serra das Confusões, PI	-8.4333	-44.5333	LGEMA 9432, 9433, 9434, 9435	
Aa 18	Uruçuí, PI	-7.2478	-44.5563	MPEG T6944	
Aa 19	Guadalupe, PI	-6.7916	-43.5705	MPEG T9653	
Aa 20	Gurupi, TO	-11.7292	-49.0686	LGEMA 10785 ^b , 10787 ^b , 10789 ^b , 10790 ^b , 10791 ^b , 10792 ^b , 10793 ^b , 10794 ^b , 10795 ^b , 10796 ^b , 10797 ^b , 10798 ^b , 10799 ^b	
Aa 21	Feira de Santana, BA	-12.2667	-38.9667	LGEMA 4374 ^b , 4375 ^b , 4376 ^b , 4377 ^b , 4378 ^b , 4379 ^b , 4380 ^b	
Aa 22	Parque Nacional Grande Sertão Veredas, MG	-15.0209	-45.8239	LGEMA 7683 ^b , 7684 ^a , 7685 ^a , 7686 ^b , 7687 ^a , 7688 ^a , 7689 ^a , 7690 ^b , 7682 ^b	
Aa 23	Arinos, MG	-15.9167	-46.0667	LGEMA 3842, 3844, 3917, 3920, 3921	
Aa 24	Estação Ecológica Águas Emendadas, DF	-15.5786	-47.6936	LGEMA 10643 ^b , 10645 ^b UCB 11 ^b , 143 ^b	
	Reserva da Aeronáutica, DF	-15.8930	-47.9236	LGEMA 10646 ^b	
	Jardim Botânico de Brasília, DF	-15.9328	-47.9675	UCB 02 ^b , 09 ^b , 109 ^b , 115 ^b	
	Córrego Taquara (IBGE), DF	-15.9447	-47.8853	UCB 141 ^b , 149	
Aa 25	Parque Nacional das Emas, GO	-18.1667	-52.75	LGEMA 10734, 10736 ^b , 10739 ^b , UCB 152 ^b	
Aa 26	Cassilândia, MS	-19.1133	-51.7342	UCB 285, 287, 289, 291, 293	
Aa 27	Fazenda RPPN Rio Negro, MS	-18.4236	-55.7533	LGEMA 10669, 10671, 10676, UCB 120	
Aa 28	Fazenda Barranco Alto, MS	-19.5765	-56.1504	LGEMA 10674, 10675, UCB 124, 126	
	Fazenda Refúgio Ecológico Caiman, MS	-19.9538	-56.3044	LGEMA 10649, 10652	
	Fazenda Novo Horizonte, MS	-20.0397	-56.3203	LGEMA 10658,	
	Fazenda San Francisco, MS	-20.0721	-56.6174	LGEMA 10667, UCB 269, 270	
	Fazenda Refúgio da Ilha, MS	-20.2227	-56.5753	UCB 266, 271	
	Miranda, MS	-21.1333	-56.4667	LGEMA 5812 ^a , 5813 ^b , 5814 ^b , 5815 ^a , 5816 ^b , 5818 ^a , 5820 ^b ,	

Continuação da Tabela 1				
Cód	Localidade	Latitude	Longitude	Amostras
				5821 ^a , 5822 ^b , 5824 ^a , 5825 ^b , 5827 ^b , 5828 ^b , 5831 ^b , 5833 ^b
Aa 29	Nova Andradina, MS	-22.2333	-53.3431	UCB 295, 297, 299, 301, 303
Aa 30	Mundo Novo, MS	-23.9381	-54.2708	UCB 280, 281, 282, 283
Aa 31	Itapeva, SP	-23.9822	-48.8756	UCB 397, 398
Aa 32	Ilha Comprida, SP	-24.7411	-47.54	LGEMA 4785, 4786, 4787
Aa 33	Província del Chaco 1/Argentina	-25.5764	-61.6733	LGEMA 10679 ^b , 10680 ^b , 10681 ^b , 10684 ^b , 10687 ^b , 10691 ^b , 10692 ^b , 10693 ^b , 10696 ^b , 10699 ^b , 10702 ^b , 10706 ^b
	Província del Chaco 2/Argentina	-25.1973	-62.0192	LGEMA 10709 ^b , 10718 ^b
	Província del Chaco 3/Argentina	-25.5323	-62.0733	LGEMA 10723, 10724
Aa 34	Província del Jujuy/Argentina	-24.3171	-64.5357	LGEMA 10729 ^b , 10730 ^b , 10731 ^b , 10732 ^b , 10733 ^b
Aa 35	Província Beni 1/Bolívia	-13.82	-64.52	BF-05C-I*, ISLA 2 #2 177*, VACA MUERTA 102 179*, MOTACU ISLAND LH1*, PERCY LH1*, BFP 172 II*, BETANIA PICHON 162*
Aa 36	Província Beni 2/ Bolívia	-15.2	-64.66	O6C BF1 173*, LSU B25220 ^c
	Província Beni 3/Bolívia	-14.89	-64.75	A04 AR16901*, CCVS-PBA I*
Ao 37	Santa Cruz/Bolívia	-17.7804	-63.0157	LSU B12973 ^c
Ao 38	Altamira, PA	-3.1984	-52.2115	NMNH B06867 ^c , NMNH B07034 ^c
Ao 39	La Macarena/Colômbia	2.2546	-73.9232	ANSP 168178 ^c
Ao 40	Caicara/Venezuela	9.8131	-63.6141	AMNH 177109 ^c
Ao 41	Maipures/Venezuela	5.2404	-67.7988	AMNH 437237 ^c
Ao 42	Carimagua/Colômbia	-3.3098	-73.2474	STRI-x-61 ^c

^a Sequências de COI e ND2 de Ribas *et al.* (2007).

^b Sequências de COI de Caparroz *et al.* (2009).

^c Sequências de COI e ND2 de Eberhard & Bermingham (2004).

3.2 Marcadores Moleculares

Para o presente estudo foram selecionados dois locos mitocondriais (COI e ND2), um íntron de gene ligado ao cromossomo Z em outras espécies de aves (PLAA) e três locos nucleares anônimos (AMZ-02, AMZ-10, AMZ-12; Tabela 2). Os *primers* para

os locos nucleares anônimos foram obtidos utilizando o genoma de *A. aestiva* que está sendo montado no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC/UFRJ) como parte da rede Sisbiota Aves, do qual nosso laboratório faz parte. Foram desenhados 100 pares de *primers* utilizando o programa eprimer3. Deste total, selecionamos 20 pares (dados não apresentados) para serem testados quanto ao nível de polimorfismo em oito indivíduos, e destes foram selecionados três marcadores que foram utilizados no presente trabalho. Adicionalmente, a partir de uma comparação da sequência do loco PLAA obtida neste estudo com o genoma do papagaio-verdadeiro, foi verificado que a nossa sequência realmente se encontra no cromossomo Z (N. C. B. Lima e F. Prosdocimi, comunicação pessoal).

Tabela 2: Locos mitocondriais, ligados ao cromossomo Z e nucleares anônimos, sequências dos seus respectivos *primers* e referências.

Loco	Sequência dos <i>primers</i>	Referência
COI	F: 5'- CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3' R: 5'-AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3'	Palumbi (1996)
ND2	F: 5'-GGCCATACCCCGAAAATGA-3' R: 5'-GAGAAGCTAGGATTTTTCGTG-3'	J. Groth (comunicação pessoal) P. Brito (comunicação pessoal)
PLAA	F: 5'-CCTGTATCTCCTCGGCACTT-3' R: 5'-GTTCAAACAATCAGACTCCC-3'	Backstrom <i>et al.</i> (2010)
AMZ02	F: 5'-GGCAGGATGATCTGTGTCAA-3' R: 5'-CATAACTGGCATGGCACAAG-3'	F. Prosdocimi (comunicação pessoal)
AMZ10	F: 5'-GAACGTATTCCCAGCTCCAA-3' R: 5'-AATGTCAGCACTTCCCAAGC-3'	F. Prosdocimi (comunicação pessoal)
AMZ12	F: 5'-CGTGATAGCCATTCCTGGTT-3' R: 5'-TCCACCAGGACACAAGTGAG-3'	F. Prosdocimi (comunicação pessoal)

3.3 Extração de DNA

O DNA total foi extraído de cada amostra seguindo o protocolo modificado de Bruford *et al.* (1992), consistindo em digestão inicial de aproximadamente 2 mm³ do tecido em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml com solução contendo 300 µl de TNE 1x (50 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 5mM de EDTA; pH 7,5), 30 µl de Tris-HCl (pH 7,5), 9 µl de SDS 25% e 25 µl de proteinase K (20 mg/ml), incubado durante a noite a 55 °C. Após este período, foi realizada a purificação adicionando um volume de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (proporção 25:24:1) em cada tubo, e então misturados e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. Então, a fase superior foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml e adicionados dois volumes de Etanol 100%

para a precipitação do DNA. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos e depois o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 300 µl de Etanol 70% em cada tubo que foi submetido a uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos e então foi feito o descarte do sobrenadante. Para a secagem do precipitado foi realizada centrifugação a vácuo por aproximadamente 30 minutos. Para finalizar, o DNA foi ressuspensionado em 70 µl de TE (Tris HCl 10 mM e EDTA 1mM, pH 8,0) e estocado na geladeira.

O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da sua qualidade e quantificação por comparação com DNA lambda de concentração conhecida. As amostras que apresentaram boa qualidade foram aliquotadas e diluídas para concentrações de 5 a 15 ng/µl para amplificação.

3.4 Amplificação do DNA

A amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão 10x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM; GE Health Care), 1 µl de dNTP (2 mM de cada nucleotídeo), 1 µl de cada *primer* (10 µM), 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl; GE Health Care), 1 µl de DNA para locos anônimos e 2 µl para mtDNA e locos ligados ao Z, e água Mili-Q para completar o volume.

As PCRs foram realizadas em termociclador (TC9600 ou Veriti; Applied Biosystem) com programas conforme o tipo de marcador: a) **mtDNA** - desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; e extensão final a 72 °C por 10 minutos; b) **ligado ao Z** – desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos e 30 segundos; seguido de 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 60 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto; e extensão final de 72 °C por 9 minutos; c) **nucleares anônimos** – desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos; e extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Cerca de 5 µl do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar se houve amplificação e seu tamanho por meio de comparação com marcador de peso molecular (*DNA 100 bp ladder*, GE Health Care ou Sinapse). Os produtos amplificados com tamanho esperado e que não

apresentaram fragmentos inespecíficos seguiram para a etapa de purificação e sequenciamento.

3.5 Purificação e Sequenciamento

A purificação dos produtos amplificados foi realizada adicionando 2,5 µl de EXO-FAP (*Exonuclease I + FastAP Alkaline Phosphatase*) a cada 10 µl de reação e em seguida incubado no termociclador a 37 °C por 30 minutos e a 80 °C por 15 minutos.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Para cada reação foram adicionados 1 µl de solução *Big Dye*, 1µl de um dos *primers* (10 µM), 1,5 µl de tampão do kit *Big Dye*, 1µl de produto de PCR e 5,5 µl de água Mili-Q, totalizando 10 µl. A reação foi colocada em termociclador e seguiu o seguinte programa: desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto; seguido de 30 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Posteriormente, os produtos foram precipitados de acordo com o seguinte protocolo: adição de 80 µl de Isopropanol 75% em cada reação, mistura em um agitador de tubos e descanso no escuro por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugação durante 40 minutos a 4000 rpm e em seguida descarte do sobrenadante. Adição de 200 µl de Etanol 70%, centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos e descarte do sobrenadante. Secagem das amostras em estufa a 37 °C por cerca de 20 a 30 minutos. Depois da precipitação, as reações foram enviadas para serem carregados no sequenciador automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

3.6 Sexagem molecular

Para identificar o número de alelos do loco ligado ao Z por indivíduo foi realizada a identificação molecular do sexo via PCR utilizando os *primers* P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'; Griffiths *et al.*, 1998), que amplificam parte de um íntron do gene CHD-1 (presente nos cromossomos Z e W), sendo o íntron do W mais longo do que o do Z.

As PCRs para sexagem foram realizadas em volume final de 10 μ l, contendo 1 μ l de tampão 10x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM; GE Health Care), 1 μ l de dNTP (2 mM de cada nucleotídeo), 1 μ l de cada *primer* (10 μ M), 0,1 μ l de *Taq* polimerase (5 U/ μ l; GE Health Care), 0,2 μ l de MgCl₂, 1 μ l de DNA e 4,7 μ l de água Mili-Q.

As reações foram realizadas em termociclador (TC9600 ou Veriti; Applied Biosystem) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 48 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; e extensão final a 72 °C por 7 minutos.

O volume total do produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 4% para separação e visualização dos fragmentos.

3.7 Análise dos dados

O programa Codoncode Aligner v3.7.1 (Codoncode Inc.) foi utilizado para a edição dos eletroferogramas e para a obtenção da sequência consenso de cada amostra. Posteriormente, essas sequências foram alinhadas pelo método Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2011) e inspecionados e corrigidos visualmente.

As fases alélicas dos locos nucleares foram resolvidos pelo algoritmo PHASE, implementado no programa DnaSP v5.10 (Librado & Rozas, 2009), e foram utilizadas somente as fases resolvidas com probabilidade maior que 0,7. O teste PHI implementado no programa SplitsTree v4.13.1 (Bruen *et al.*, 2006; Huson & Bryant, 2006) foi utilizado para verificar sinal de recombinação nos locos nucleares. Os heterozigotos de *indel* (inserção-deleção) encontrados para os locos nucleares anônimos foram resolvidos no programa Champuru v1.0 (Flot *et al.*, 2006; Flot, 2007).

Uma filogenia Bayesiana com dados do mtDNA foi construída no BEAST v2.3 (Bouckaert *et al.* 2014) para verificar se os clados CA, NSA e SA encontrados nos trabalhos anteriores são recuperados após a inclusão dos novos indivíduos. Nesta análise foram adicionadas as sequências dos indivíduos de *A. ochrocephala* da América Central e de *A. amazonica*, *A. farinosa*, *A. autumnalis* e *A. barbadensis* do

GenBank (Eberhard & Bermingham, 2004; Urantówka *et al.* 2014) como grupo externo. Foram realizadas três corridas independentes com 400.000.000 gerações e frequência de amostragem a cada 1.000 e 10% de *burn-in*, utilizando o processo de especiação Yule e uma árvore inicial de UPGMA. Foi utilizado o modelo *Relaxed clock log normal* para estimar os tempos de divergência e, como não há registro fóssil adequado disponível, foi adotada a taxa de 1,05% de mutação por linhagem por milhão de anos (Weir & Schluter, 2008). O melhor modelo evolutivo para o qual os dados melhor se ajustam foi determinado usando o programa MrModelTest v2.3 (Nylander, 2004) de acordo com o Critério de Informação Akaike (AIC, em inglês). A qualidade das corridas (ESS>200) foi verificada no programa Tracer v1.5 (Rambaut *et al.*, 2014). As diferentes corridas foram combinadas utilizando o LogCombiner v2.3 e a melhor árvore foi construída no programa TreeAnnotator v2.3 e plotada e editada utilizando o programa FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

O programa Structure v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para analisar a estrutura populacional baseada nos marcadores nucleares, assumindo o *admixture model*. A análise foi realizada variando o valor de K (número de grupos) de 1 a 10, com 20 corridas independentes para cada um, utilizando 2.000.000 de gerações e 10% de *burn-in*. A avaliação do melhor K foi realizada utilizando o método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005) implementado no Structure Harvester (Earl & Vanholdt, 2012). As 20 corridas independentes do melhor K foram agrupadas no programa CLUMPP v1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) e o gráfico foi plotado no programa Distruct (Rosenberg, 2004). Adicionalmente, o programa BAPS v.6.0 (Corander & Marttinen, 2006; Corander *et al.*, 2008) foi utilizado para verificar a estrutura populacional baseada nos marcadores mitocondriais e nucleares. Inicialmente foram realizadas análises utilizando o modelo *mixture* para determinação do K mais provável, especificando valor máximo de K=10. Em seguida o arquivo de saída foi utilizado para a análise *admixture model*, realizando 10 corridas independentes. Devido à diferença na ploidia e no modo de herança, em ambos os programas foram realizadas análises separadamente para os locos mitocondriais, nucleares anônimos e ligados ao cromossomo Z.

Redes de haplótipos foram construídas pelo método de *Median-joining* utilizando o programa NETWORK v4.6 (Bandelt *et al.*, 1999; www.fluxus-

engineering.com). Para verificar o nível de diferenciação populacional das linhagens observados nas análises anteriores foram realizadas análise de variância molecular (AMOVA) e F_{ST} no programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Para cada marcador foram calculados a diversidade nucleotídica por sítio (π), o número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), e realizados testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) e o teste de expansão populacional R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) utilizando o programa DnaSP v5.10 (Librado & Rozas, 2009).

As análises a seguir utilizam métodos coalescentes que possuem como premissa a neutralidade das sequências a serem utilizadas. Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) indicaram desvios e significativos para o loco mitocondrial (ver Resultados). No entanto, esses testes também podem produzir resultados significativos quando a população sofreu algum evento de instabilidade demográfica. Assim, foi realizado o teste de seleção MK (McDonald & Kreitman, 1991) para o mtDNA, implementado no programa DnaSP v5.10 utilizando como grupo externo sequências de COI de *A. barbadensis* e de ND2 de *A. farinosa*, disponíveis no GenBank. Os resultados dos testes não foram significativos ($P > 0,05$) para ambos os marcadores, que, assim, foram mantidos nas análises.

Com relação ao loco PLAA, a literatura sugere que locos ligados ao cromossomo Z estariam sob ação de seleção. Do mesmo modo que no presente trabalho, diversos autores observaram níveis reduzidos de variação nesses marcadores comparados aos autossômicos e apontam a seleção como uma das possíveis causas dessa redução da diversidade genética (Saetre, *et al.*, 2003; Axelsson *et al.*, 2004; Sundstrom *et al.*, 2004; Borge *et al.*, 2005; Elgvin *et al.*, 2011). Recentemente, análises de expressão gênica do cromossomo Z em diversas espécies de aves sugeriram que a seleção atuaria como um fator importante no *Fast-Z effect*, por meio da exposição de mutações nas fêmeas (Dean *et al.*, 2015). Adicionalmente, Backstrom *et al.* (2010) e Elgvin *et al.* (2011) detectaram desvios significativos da neutralidade no loco PLAA para outras espécies de aves. No presente estudo, os testes de neutralidade não foram significativos para este mesmo loco (ver Resultados), no entanto, esta análise possui uma estatística pouco robusta devido ao baixo número de sítios polimórficos. Infelizmente não foi possível realizar um teste de seleção mais robusto (e.g. teste de seleção HKA) para este loco devido à falta de

sequências de um grupo externo. Isso será realizado no futuro. Assim, esse loco foi excluído das análises seguintes para evitar violações às premissas da análise coalescente e consequentemente um possível viés que possa vir a prejudicar os resultados.

Estimativas de flutuações no tamanho populacional efetivo ao longo do tempo para cada linhagem mitocondrial identificada nas análises anteriores foram realizadas pelo método coalescente *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBS_P; Heled & Drummond, 2008) implementado no programa BEAST v1.8.0 (Drummond & Rambaut, 2007). Como citado acima essa análise incluiu dados do mtDNA e nucleares. Optamos por não realizar análises considerando as duas linhagens sugeridas pelo loco ligado ao Z, pois em muitos exemplos na literatura esse marcador parece estar sob seleção e decidimos ser conservativos, mesmo não tendo encontrado evidência de sinal de seleção nos nossos dados (ver Resultados). Foram realizadas duas corridas independentes para cada linhagem utilizando árvores iniciais de UPGMA, 100 a 200 milhões de gerações com frequência de amostragem a cada 10.000 à 20.000 e 10% de *burn-in*. Para todos os marcadores foi adotado o modelo *Relaxed clock log normal*. Foi utilizada taxa de mutação de 1,05% por linhagem por milhões de anos para o mtDNA (Weir & Schluter, 2008) e as taxas de mutação para os locos nucleares foram estimados pelo programa usando como base a taxa do mtDNA. Foram utilizados os melhores modelos evolutivos para cada marcador determinados no programa MrModelTest v.2.3 (Nylander, 2004) de acordo com o Critério de Informação Akaike (AIC). A qualidade das corridas (ESS>200) foi verificada no programa Tracer v1.5 (Rambaut *et al.*, 2014). As corridas independentes foram combinadas no LogCombiner v1.8.0 e os gráficos foram plotados no programa RStudio utilizando o *script* EBSPlot (R. Campos Junior, comunicação pessoal).

4. Resultados

No total foram obtidas sequências de 189 indivíduos para o marcador mitocondrial COI (512 pb) e de 146 para o ND2 (524 pb), sendo 108 e 33 sequências de COI e ND2, respectivamente, do GenBank. Para o loco PLAA (473 pb) foram sequenciados 132 indivíduos, e todos estes tiveram seu sexo identificado com sucesso. Todos os oito indivíduos heterozigotos foram identificados como machos, o que é congruente com a possibilidade de este marcador se localizar no cromossomo Z. Para os locos anônimos AMZ-02 (525 pb), AMZ-10 (524 pb) e AMZ-12 (524 pb) foram sequenciados 132, 133 e 132 indivíduos, respectivamente. Dentre estes, foram encontrados respectivamente 4, 7 e 9 indivíduos heterozigotos de *indel*, os quais foram todos resolvidos, com exceção de um indivíduo para o loco AMZ-10. Após a análise no PHASE e a exclusão dos indivíduos com probabilidade menor que 0,7, restaram 131, 127, 128 e 130 indivíduos para os locos PLAA, AMZ-02, AMZ-10 e AMZ-12, respectivamente. Não foi detectada nenhuma evidência de recombinação em nenhum dos locos estudados.

A filogenia Bayesiana mitocondrial baseada em 1036 pb de COI e ND2 recuperou os clados América Central (CA), norte da América do Sul (NSA), América do Sul I (SA I) e América do Sul II (SA II) encontrados em estudos anteriores (Eberhard & Bermingham, 2004; Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009; Urantówka *et al.*, 2014) com boa probabilidade posterior ($>0,95$; Figura 3). Do mesmo modo, as subespécies de *A. ochrocephala* da América Central mostraram monofiletismo recíproco. Duas amostras adicionadas no presente trabalho e coletadas em Caracaraí (RO) e Tabatinga (AM) se agruparam ao clado NSA. As demais novas amostras incluídas na análise se agruparam nos clados SA I e SA II. A diversificação das linhagens do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* foi estimada de ter ocorrido durante o Pleistoceno (Figura 3). O primeiro evento de diversificação teria ocorrido entre os clados CA+NSA e SA há aproximadamente 0,65 (0,45 – 0,85) milhões de anos (Ma), seguido pela diversificação entre CA e NSA há aproximadamente 0,55 (0,35 – 0,72) Ma. As linhagens SA I e SA II teriam se divergido há 0,45 (0,29 – 0,6) Ma e por fim, a divergência entre linhagens SA IIa e SA IIb foi estimada em 0,35 (0,2 – 0,45) Ma.

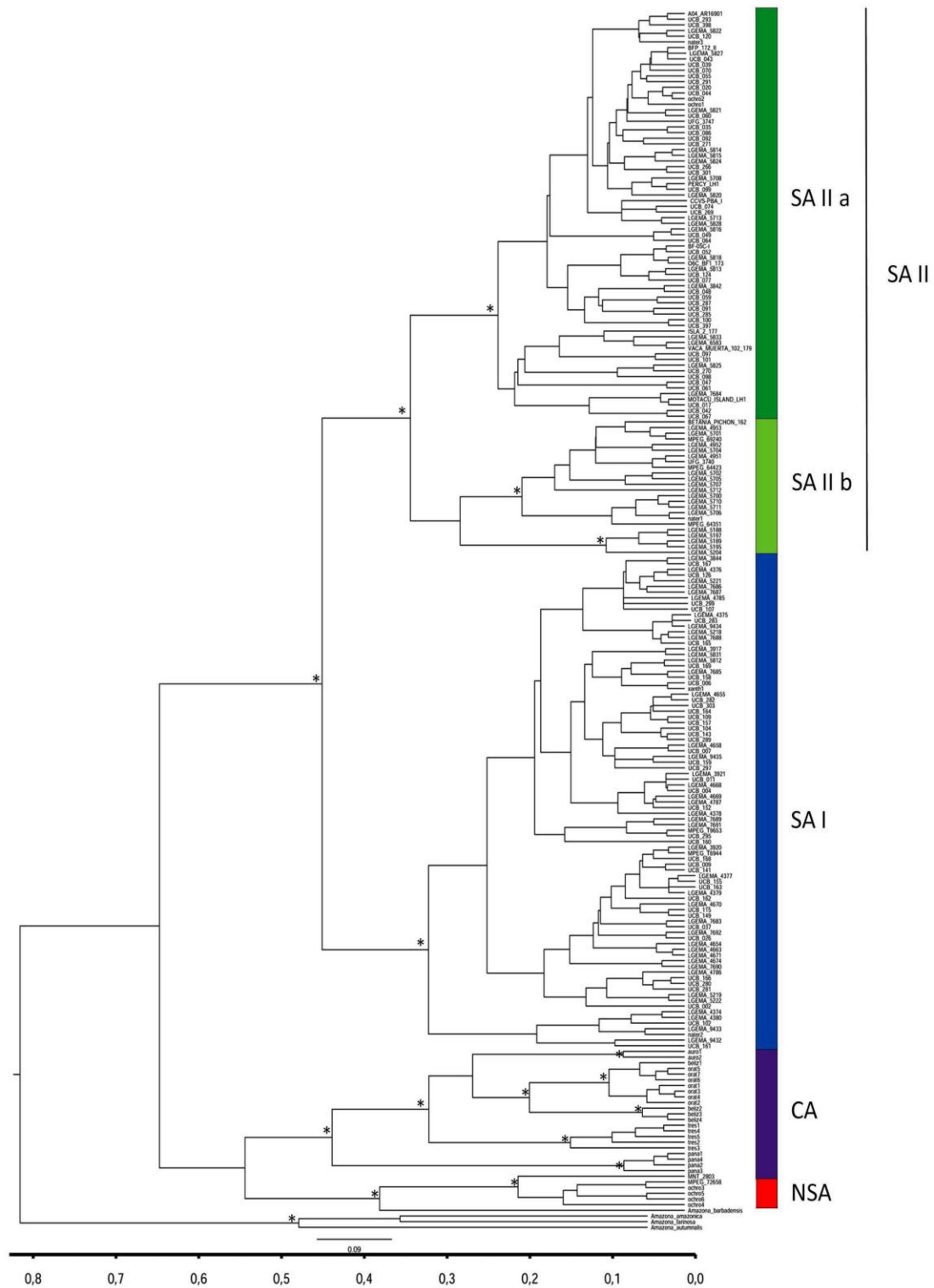


Figura 3. Filogenia Bayesiana baseada em 1036 pb de mtDNA (COI + ND2) do complexo *Amazona aestiva*/*A. ochrocephala*. Nós com probabilidade posterior acima de 0,95 estão indicados com asterisco. A barra horizontal na porção inferior representa o tempo em milhão de anos. As cores das barras verticais correspondem às cores do gráfico gerado pelo BAPS (ver Figura 4). SA II – clado 2 da América do Sul; SA I – clado 1 da América do Sul; CA – clado da América Central; NSA – clado do norte da América do Sul.

A análise dos dados mitocondriais no BAPS para o complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* da América do Sul indicou como melhor $K=4$ (Figura 4), o que não era esperado segundo trabalhos anteriores que indicavam apenas três linhagens. Os agrupamentos desta análise coincidem com os clados NSA e SA I, mas indica uma subdivisão do clado SA II, que chamaremos aqui de SA IIa e SA IIb. Essa subdivisão também pode ser observada na árvore bayesiana, porém com baixa probabilidade posterior para o clado SA IIb ($<0,95$; Figura 3). Os locos anônimos ($K=4$) e o PLAA ($K=4$) não recuperaram a mesma estrutura do mitocondrial, e não apresentaram nenhuma clara estrutura geográfica (Figuras 5 e 6). Por outro lado, a análise no STRUCTURE do loco PLAA, indicou a existência de duas populações, que parecem ser parcialmente concordantes com a taxonomia, mas há indivíduos de *A. aestiva* geneticamente mais semelhantes a *A. ochrocephala* (Figura 7). Na análise para os locos anônimos, apesar de indicar $K=3$, não há estruturação aparente (Figura 8). Essa diferença dos resultados entre o BAPS e o STRUCTURE pode ser devido ao fato de o primeiro ser um método menos preciso quando a análise se baseia em poucos marcadores ou quando estes são pouco informativos (Rodríguez-Ramilo *et al.*, 2009).

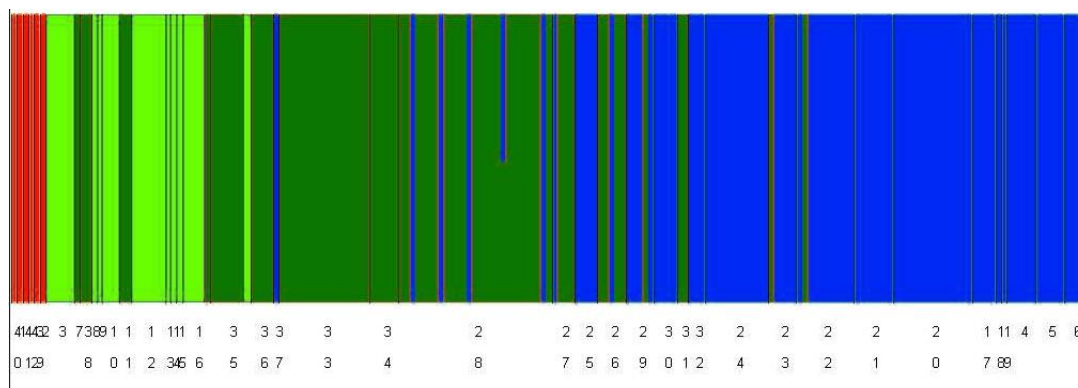


Figura 4. Resultado da análise no BAPS ($K=4$) do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* baseada em 1036 pb do mtDNA (COI e ND2). Cada cor representa um agrupamento (vermelho: NSA; azul: SA I; verde escuro: SA IIa; verde claro: SA IIb). Os números correspondem às localidades da Tabela 1.

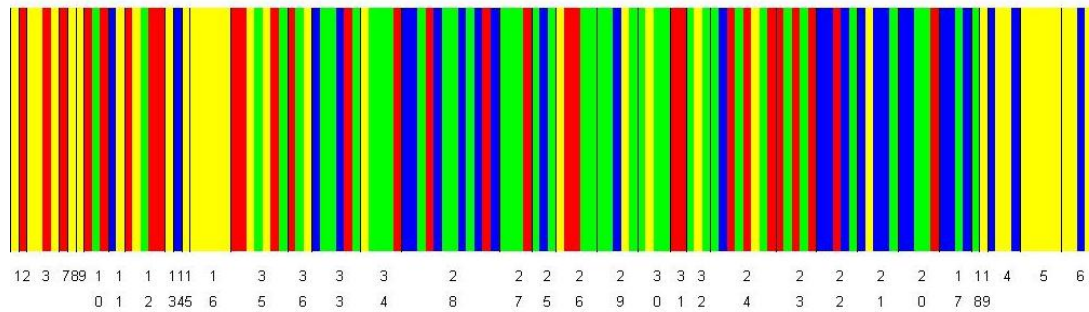


Figura 5. Resultado da análise no BAPS ($K=4$) do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* baseada em 1573 pb dos locos anônimos (AMZ-02, AMZ-10 e AMZ-12). Cores representam os quatro agrupamentos e não correspondem às cores dos gráficos das análises com dados mitocondrial ou do PLAA. Os números correspondem às localidades da Tabela 1 e estão dispostas na mesma ordem do gráfico da figura 4. Note que infelizmente as amostras das localidades analisadas por Eberhard & Bermingham (2004) não estão incluídas, pois esses marcadores não foram analisados por esses autores.

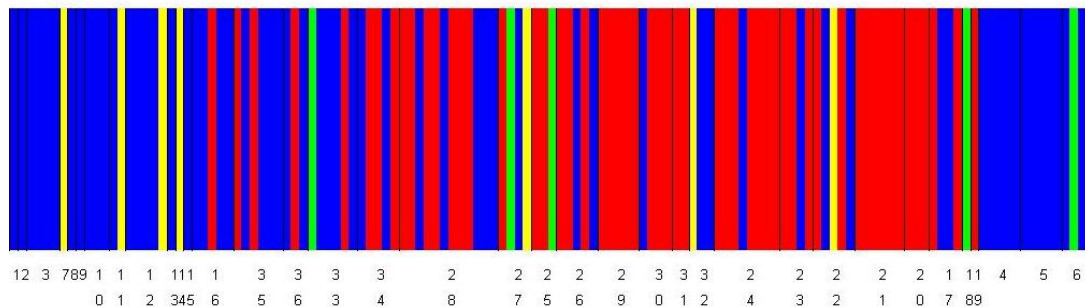


Figura 6. Resultado da análise no BAPS ($K=4$) do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* baseada em 473 pb do loco PLAA. Cores representam os quatro agrupamentos e não correspondem às cores dos gráficos das análises com dados mitocondrial ou do PLAA. Os números correspondem às localidades da Tabela 1 e estão dispostos na mesma ordem dos gráficos das figuras 4 e 5. Note que infelizmente as amostras das localidades analisadas por Eberhard & Bermingham (2004) não estão incluídas, pois esse marcador não foi analisado por esses autores.

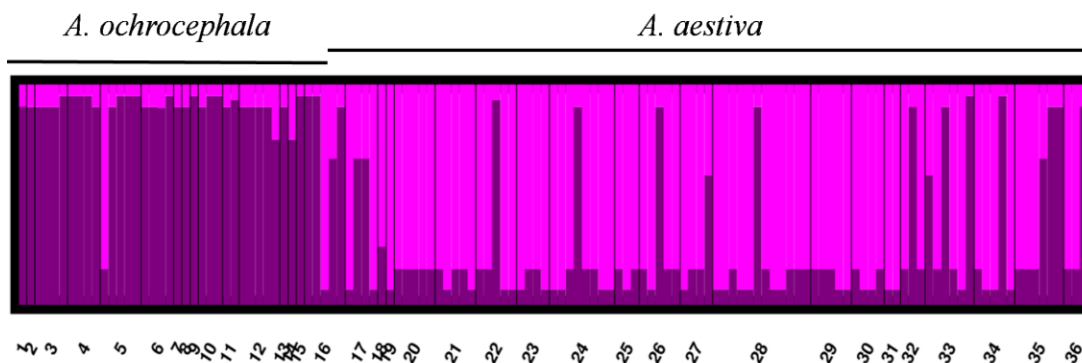


Figura 7. Resultado da análise no Structure (K=2) do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* baseada em 473 pb do loco PLAA. Cores representam os dois agrupamentos. Os números correspondem às localidades da Tabela 1. A identificação morfológica de cada indivíduo está indicada nas barras acima da gráfico.

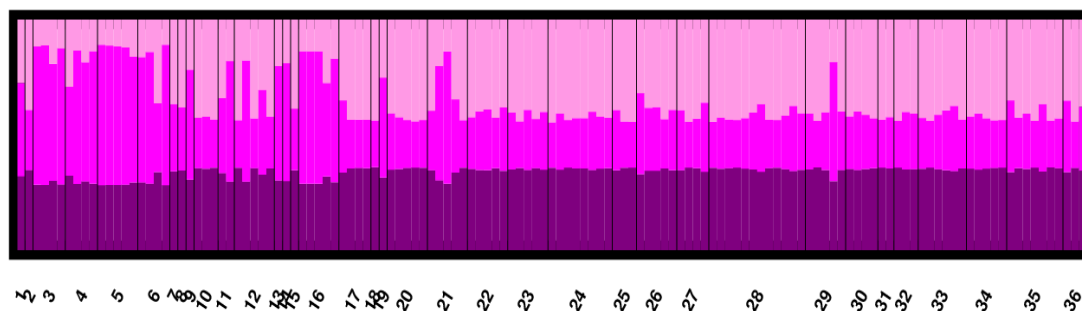


Figura 8. Resultado da análise no Structure (K=3) do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* baseada em 1573 pb dos locos anônimos (AMZ-02, AMZ-10 e AMZ-12). Cores representam os três agrupamentos. Os números estão dispostos na mesma ordem da figura 7 e correspondem às localidades da Tabela 1.

A rede de haplótipos do mtDNA e dos locos anônimos foram coloridos de acordo com os agrupamentos encontrados nas análises anteriores. As redes mitocondriais (Figura 9 - B e C) mostraram congruência com as quatro linhagens encontradas na análise no BAPS, que são compostas por: **NSA** - *A. ochrocephala* do Amazonas (AM), Roraima (RR), Colômbia e Venezuela; **SA I** - *A. aestiva* da Bahia (BA), Tocantins (TO), Piauí (PI), Goiás (GO), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS) e São Paulo (SP) e *A. ochrocephala* da Ilha de Marajó; **SA IIa** - *A. aestiva* da Bolívia, MG, MS, Argentina e SP e *A. ochrocephala* do Acre (AC), Pará (PA), Bolívia e Mato Grosso (MT); **SA IIb** - *A. aestiva* da

Bolívia e MT e *A. ochrocephala* do Amapá (AP), AC e MT. As redes de haplótipos dos locos nucleares anônimos não evidenciaram nenhuma estruturação geográfica clara (Figura 9 - D, E e F).

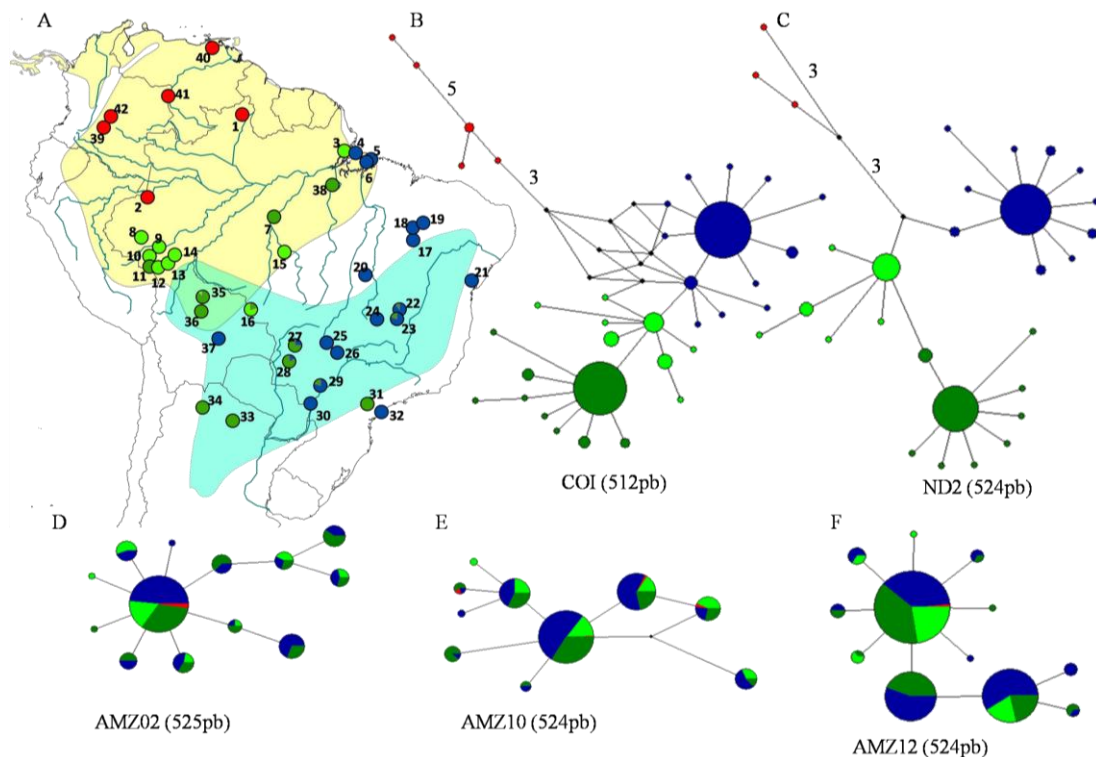


Figura 9. A) Distribuições geográficas de *A. ochrocephala* (amarelo) e *A. aestiva* (turquesa). Os círculos indicam localidades de coleta e as cores representam as linhagens mitocondriais (vermelho: NSA, azul: SA I, verde escuro: SA IIa e verde claro: SA IIb). B) Rede de haplótipos baseados em 512 pb de COI. C) Rede de haplótipos baseado em 524 pb de ND2. D) Rede de haplótipo baseado em 525 pb do loco AMZ-02. E) Rede de haplótipo baseado em 524 pb do loco AMZ-10. F) Rede de haplótipo baseado em 524 pb do loco AMZ-12. Cada círculo das redes representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional à sua frequência.

Diferentemente da estrutura observada para o mtDNA, a rede de haplótipos do loco PLAA (Figura 10 - B) indica a presença de duas linhagens semelhantes às observadas no STRUCTURE (Figura 7): 1) composta em sua maior parte por *A. ochrocephala* e 2) composta majoritariamente por *A. aestiva*.

O cálculo de F_{ST} e a análise de variância molecular (AMOVA) foram realizados considerando: 1) as quatro linhagens mitocondriais e 2) as duas linhagens do PLAA. Foram obtidos valores altos de F_{ST} (Tabela 3; e $F_{ST} = 0,92371$ entre as

duas linhagens baseadas no PLAA), indicando grande diferenciação entre os pares de grupos avaliados. O resultado da AMOVA considerando as quatro linhagens mitocondriais baseado no mtDNA, como esperado, indicou que a maior parte da variação ocorre entre linhagens (82,27%; Tabela 4). No entanto, a AMOVA considerando essas linhagens, mas baseada nos demais marcadores indicou maior variação dentro de populações (Tabela 4). Já considerando os dois agrupamentos indicados pelo PLAA no STRUCTURE e na rede de haplótipos, a AMOVA baseada nos dados de PLAA indica maior variação entre linhagens (80,46%; Tabela 5) e maior variação entre populações dentro de cada linhagem baseado nos dados de mtDNA e dentro de populações quando baseado nos locos autossômicos (Tabela 5). A maior variação dentro de populações baseada nos locos anônimos em ambas as análises é congruente com a ausência de estruturação observada nas redes de haplótipos correspondentes (Figura 7).

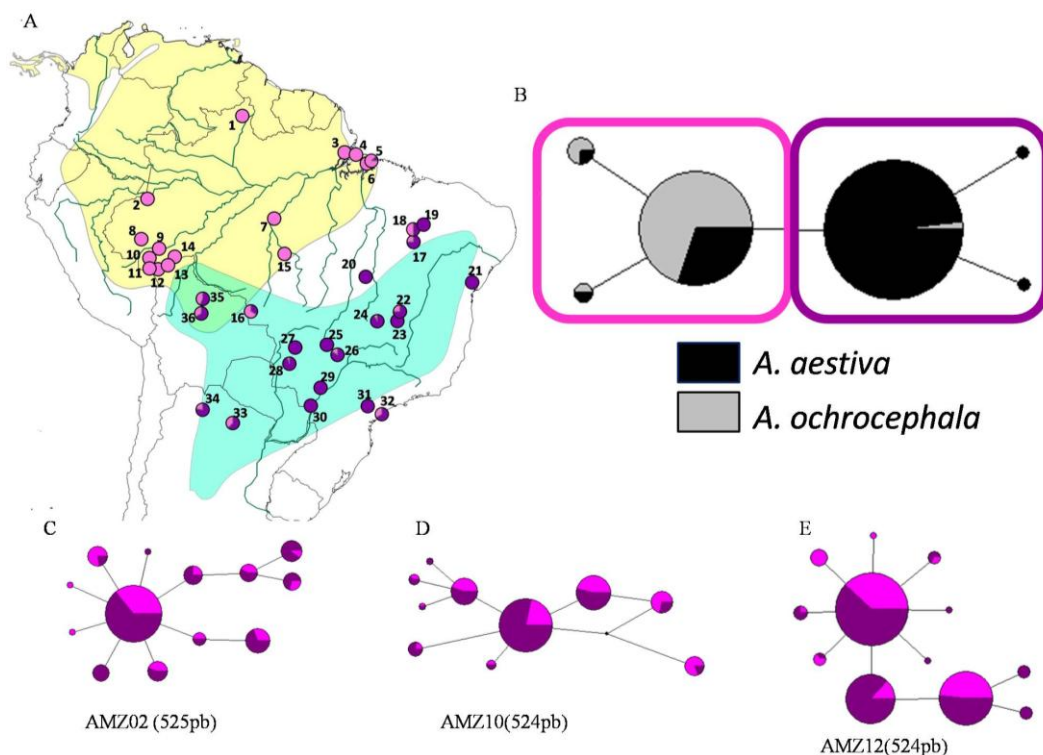


Figura 10. A) Distribuições geográficas de *A. ochrocephala* (amarelo) e *A. aestiva* (turquesa). Os círculos indicam localidades de coleta e suas cores (rosa ou roxo) representam as duas grandes linhagens de haplótipos baseados na análise do PLAA. B) Rede de haplótipos baseada em 473 pb do loco PLAA. C) Rede de haplótipos baseada em 525 pb do loco AMZ-02. D) Rede de haplótipos baseada em 524 pb do loco AMZ-10. E) Rede de haplótipos baseada em 524 pb do loco AMZ-12. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é proporcional à sua frequência.

Tabela 3. Valores de F_{ST} entre as linhagens com base em 1036 pb de mtDNA do complexo *Amazona aestiva/A. ochrocephala*.

	SA I	SA IIa	SA IIb	NSA
SA IIa	0,86934	-		
SA IIb	0,73750	0,64290	-	
NSA	0,91712	0,93379	0,82974	-

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala*, considerando as quatro linhagens mitocondriais.

Fonte de variação	mtDNA		PLAA		AMZ02		AMZ10		AMZ12	
	g.l.	%	g.l.	%	g.l.	%	g.l.	%	g.l.	%
Entre grupos	2	80,73	2	26,81	2	1,14	2	0,39	2	3,65
Entre populações dentro de grupos	25	3,36	33	32,09	24	7,59	24	19,66	24	11,71
Dentro de populações	93	15,91	198	41,10	196	91,27	190	79,95	185	84,65
Total	120		223		222		216		211	

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala*, considerando as duas linhagens do PLAA (*A. aestiva* e *A. ochrocephala*)





Fonte de variação	mtDNA		PLAA		AMZ02		AMZ10		AMZ12	
	g.l.	%	g.l.	%	g.l.	%	g.l.	%	g.l.	%
Entre grupos	1	6,98	1	94,08	1	0,58	1	7,44	1	1,07
Entre populações dentro de grupos	23	55,82	29	0,10	40	4,40	44	13,73	20	9,65
Dentro de populações	72	37,21	134	5,82	200	95,02	212	78,83	130	89,28
Total	96		164		241		257		151	

As estatísticas sumárias foram calculadas para cada marcador considerando as linhagens identificadas pelo mtDNA, considerando o complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* como um grupo único e considerando os 2 grupos indicados pelos dados de PLAA – aqui denominados PLAA – *A. aestiva* e PLAA – *A. ochrocephala* (Tabela 7). Testes de neutralidade e R_2 foram significativos apenas para os dados do

mtDNA para as linhagens SA I, SA IIa, SA IIb, conjunto total de dados, para PLAA - *A. aestiva* e PLAA - *A. ochrocephala*, o que pode ser indicativo de uma possível expansão populacional.

A análise EBSP multilocos para as linhagens mitocondriais são congruentes com os respectivos testes de neutralidade e R_2 para o loco mitocondrial indicando expansão demográfica nas linhagens SA I e SA IIa com início entre 50 e 100 mil anos (Figura 11 - B e C) e SA IIb por volta de 50mil anos (Figura 11 - D). O gráfico da linhagem NSA (Figura 11 - A) mostra estabilidade populacional, contudo o amplo intervalo de confiança torna esse resultado pouco informativo, possivelmente devido ao baixo número de indivíduos. Todos os sinais de expansão observados nos gráficos foram confirmados pelo Tracer que indica a ocorrência de mudança no tamanho populacional.

Tabela 7. Análise de diversidade genética e testes de neutralidade do complexo *A. aestiva*/*A. ochrocephala*. As cores dos círculos correspondem às cores da Figura 3B. N=número de sequências; S=número de sítios polimórficos; π =diversidade nucleotídica; H=número de haplótipos; Hd=diversidade haplotípica.

Linhagem	Loco	N	S	π	H (Hd)	D de Tajima	Fs de Fu	R ₂
NSA 	mtDNA	6	8	0,00722	5 (0,933)	0,2743 ^{ns}	-0,905 ^{ns}	0,1780 ^{ns}
	PLAA	2	0	0,00000	1 (0,000)	-	-	-
	AMZ02	4	1	0,00095	2 (0,500)	-0,6124 ^{ns}	0,172 ^{ns}	0,4330 ^{ns}
	AMZ10	4	4	0,00413	4 (1,000)	-0,0650 ^{ns}	-1,741 ^{ns}	0,2234 ^{ns}
	AMZ12	2	0	0,00000	1 (0,000)	-	-	-
SA I 	mtDNA	66	24	0,00100	20 (0,633)	-2,4991 ^{**}	-22,328 ^{**}	0,0284 ^{**}
	PLAA	92	3	0,00104	4 (0,446)	-0,2974 ^{ns}	-0,479 ^{ns}	0,0858 ^{ns}
	AMZ02	118	10	0,00213	10 (0,485)	-1,2037 ^{ns}	-3,896 ^{ns}	0,0485 ^{ns}
	AMZ10	124	11	0,00276	10 (0,688)	-0,9967 ^{ns}	-2,595 ^{ns}	0,0568 ^{ns}
	AMZ12	122	8	0,00302	9 (0,717)	-0,5510 ^{ns}	-2,143 ^{ns}	0,0710 ^{ns}
SA IIa 	mtDNA	53	15	0,00080	14 (0,563)	-2,3878 ^{**}	-16,133 ^{**}	0,0332 ^{**}
	PLAA	64	4	0,00097	5 (0,419)	-0,9873 ^{ns}	-2,039 ^{ns}	0,0698 ^{ns}
	AMZ02	90	9	0,00227	10 (0,547)	-1,0750 ^{ns}	-4,065 ^{ns}	0,0568 ^{ns}
	AMZ10	86	10	0,00311	9 (0,729)	-0,8157 ^{ns}	-1,835 ^{ns}	0,0681 ^{ns}
	AMZ12	92	10	0,00323	11 (0,712)	-0,6852 ^{ns}	-3,177 ^{ns}	0,0705 ^{ns}
SA IIb 	mtDNA	23	17	0,00256	10 (0,838)	-1,5385 [*]	-2,756 ^{ns}	0,0700 ^{**}
	PLAA	30	2	0,00067	3 (0,301)	-0,7705 ^{ns}	-0,809 ^{ns}	0,0787 ^{ns}
	AMZ02	42	6	0,00186	6 (0,479)	-1,0635 ^{ns}	-1,789 ^{ns}	0,0710 ^{ns}
	AMZ10	42	5	0,00317	5 (0,799)	1,0855 ^{ns}	1,198 ^{ns}	0,1663 ^{ns}
	AMZ12	44	7	0,00318	7 (0,628)	-0,3001 ^{ns}	-0,945 ^{ns}	0,1003 ^{ns}
Todos	mtDNA	146	63	0,00535	48 (0,865)	-1,7197 [*]	-28,765 ^{**}	0,0383 [*]
	PLAA	188	5	0,00118	6 (0,511)	-0,6766 ^{ns}	-1,698 ^{ns}	0,0576 ^{ns}
	AMZ02	254	10	0,00293	11 (0,497)	-1,1253 ^{ns}	-4,722 ^{ns}	0,0414 ^{ns}
	AMZ10	256	11	0,00315	10 (0,732)	-0,5291 ^{ns}	-1,200 ^{ns}	0,0631 ^{ns}
	AMZ12	260	12	0,00278	13 (0,659)	-1,0981 ^{ns}	-5,223 ^{ns}	0,0436 ^{ns}
PLAA - <i>A. aestiva</i>	mtDNA	78	33	0,00431	27 (0,796)	-1,1099 ^{ns}	-10,742 ^{**}	0,0608 ^{ns}
	PLAA	116	2	0,00007	3 (0,034)	-1,3582 ^{ns}	-4,255 ^{ns}	0,0651 ^{ns}
	AMZ02	156	10	0,00230	11 (0,512)	-1,0079 ^{ns}	-4,119 ^{ns}	0,0516 ^{ns}
	AMZ10	148	11	0,00238	10 (0,648)	-1,1603 ^{ns}	-3,149 ^{ns}	0,0477 ^{ns}
	AMZ12	156	9	0,00276	10 (0,684)	-0,8191 ^{ns}	-3,112 ^{ns}	0,0578 ^{ns}
PLAA - <i>A. ochrocephala</i>	mtDNA	48	47	0,00622	21 (0,926)	-1,3818 ^{ns}	-4,258 ^{ns}	0,0621 [*]
	PLAA	72	2	0,00034	3 (0,158)	-1,0007 ^{ns}	-1,598 ^{ns}	0,0403 ^{ns}
	AMZ02	88	8	0,00280	9 (0,509)	-1,2395 ^{ns}	-4,313 ^{ns}	0,0502 ^{ns}
	AMZ10	94	10	0,00414	9 (0,826)	-0,0982 ^{ns}	-0,466 ^{ns}	0,0935 ^{ns}
	AMZ12	94	9	0,00364	10 (0,671)	-0,2246 ^{ns}	-1,820 ^{ns}	0,0872 ^{ns}

* $p < 0.05$ ou 0.02 para Fs de Fu, ** $p < 0.01$, ^{ns}: não significativo

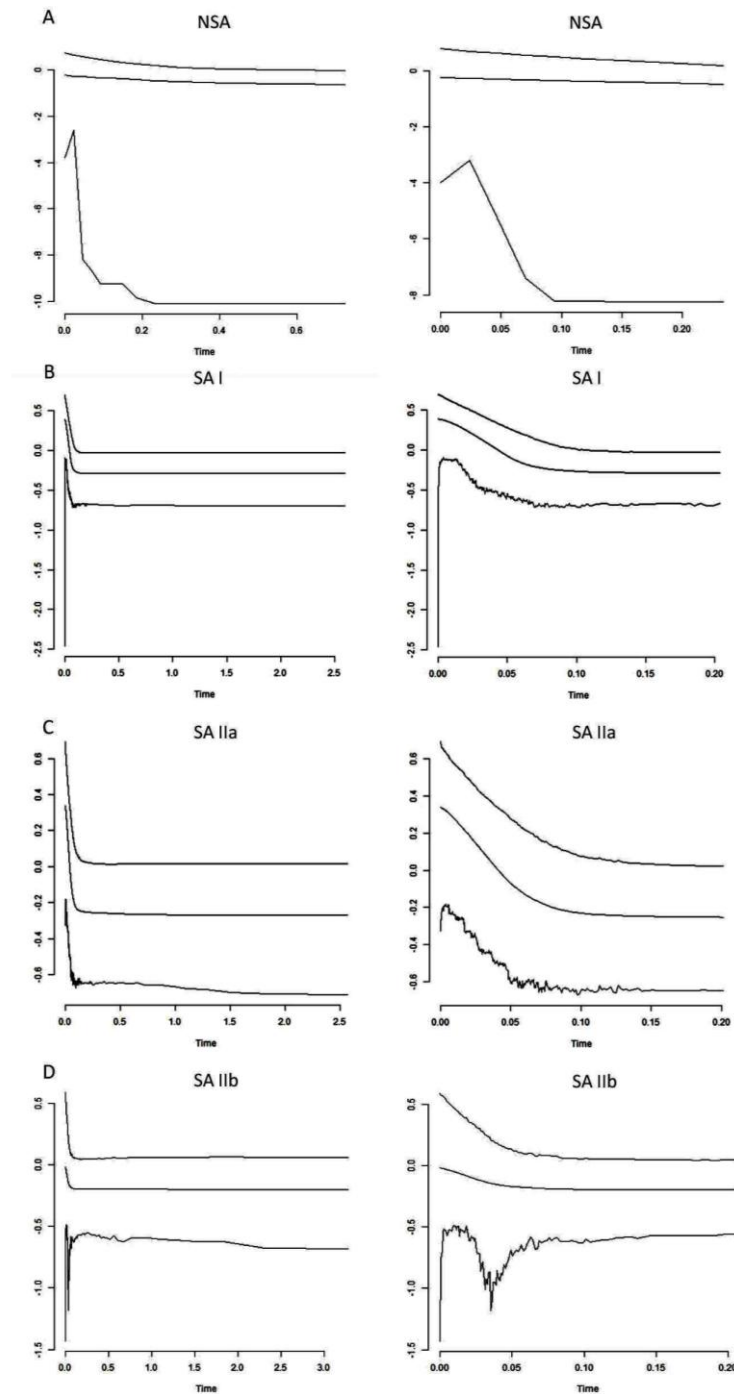


Figura 11. Resultados do *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) para as linhagens mitocondriais de *Amazona aestiva/A. ochrocephala* baseadas em 1036 pb do mtDNA (COI+ND2), 525 pb do AMZ02, 524 pb do AMZ10 e 525 pb do AMZ12. O eixo x representa o tempo em milhões de anos e o eixo y o tamanho populacional em escala logarítmica. A linha central indica a estimativa da mediana e as linhas externas indicam limites de distribuição dos 95% HPD (*Highest Posterior Density*). As figuras à direita mostram o detalhamento dos últimos 200 mil anos. A) Linhagem NSA; B) Linhagem SA I; C) Linhagem SA IIa; D) Linhagem SA IIb.

5. Discussão

5.1 Estrutura genética e padrões filogeográficos do complexo *A. aestiva*/*A. ochrocephala*.

As análises com base no mtDNA (árvore bayesiana, BAPS, redes de haplótipos, AMOVA e F_{ST} ; Figuras 3, 4, 9; Tabelas 3, 4) do complexo *A. aestiva*/*A. ochrocephala* da América do Sul indicaram a presença de quatro linhagens, cada uma com suporte máximo (exceção para SA Iib): NSA, SA I, SA IIa e SA Iib (Figuras 3, 4, 9B e 9C; Tabela 3). Essas linhagens são concordantes com as encontradas em estudos prévios (Eberhard & Bermingham, 2004; Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009; Urantówka *et al.*, 2014), exceto pelo clado SA II que no presente estudo indicou ser composto de dois subgrupos distintos que foram nomeados como SA IIa e SA Iib, sendo o primeiro composto em sua maior parte por indivíduos de *A. aestiva* da porção sul-oeste da sua distribuição e por dois indivíduos de *A. ochrocephala* do Acre e três do Pará, e o segundo formado em grande parte por indivíduos de *A. ochrocephala* do Amapá, Acre, Mato Grosso e Bolívia e por três indivíduos de *A. aestiva* do Mato Grosso e um da Bolívia.

Os indivíduos de *A. ochrocephala* de Tabatinga (AM) e Caracaraí (RR) incluídos no presente trabalho, agruparam com indivíduos da Colômbia e Venezuela do clado NSA (Figuras 3, 4, 9B e 9C; Eberhard & Bermingham, 2004; Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009; Urantówka *et al.*, 2014). Com isso, ampliamos a distribuição desse clado (Figura 9A). Um dado interessante, é que o indivíduo de Tabatinga foi identificado morfológicamente como sendo da subespécie *A. o. nattereri* (A. Aleixo, com. pessoal), enquanto os indivíduos de Caracaraí, Colômbia e Venezuela foram identificados como *A. o. ochrocephala* sendo o primeiro identificado baseado na localização geográfica e os dois últimos identificados em estudo anterior (Eberhard & Bermingham, 2004). A incongruência entre a morfologia e a genética parece indicar que a quantidade de cor amarela na cabeça possivelmente não seja um bom caráter para diferenciar esses táxons ou que está ocorrendo hibridação nessa região (A. Aleixo, com. pessoal). Estudos com amostragem maior de indivíduos dessa região são necessários para testar essas hipóteses.

Do mesmo modo que Caparroz *et al.* (2009), encontramos grande concordância das linhagens que incluem indivíduos de *A. aestiva* e a distribuição geográfica descrita para as subespécies *A. a. aestiva* (linhagem SA I, porção nordeste) e *A. a. xanthopteryx* (linhagem SA IIa, porção sul-oeste; Figura 9A). Essas duas linhagens ocorrem em simpatria principalmente na região do Mato Grosso do Sul (Figura 9A), local que já era conhecido por abrigar indivíduos com morfologia intermediária dessas subespécies (Darrieu, 1983 *apud* Caparroz *et al.* 2009), o que poderia indicar uma possível zona de contato secundário nessa região ou um centro de origem. Adicionalmente, foi encontrada a presença em simpatria das linhagens SA IIa (predominantemente *A. aestiva*) e SA IIb (predominantemente *A. ochrocephala*) onde aparentemente ocorre sobreposição da distribuição geográfica de *A. aestiva* e *A. ochrocephala*, em Mato Grosso e Bolívia e também em locais próximos à essa região (Figura 9A). Assim, essa é outra área onde seria interessante investigar se ocorre hibridização entre esses táxons.

A estrutura geográfica mitocondrial encontrada neste trabalho de modo geral parece não corresponder fortemente a barreiras geográficas conhecidas atualmente, diferentemente do que ocorre, por exemplo, com diversos grupos de aves da Amazônia em que o rio Amazonas e seus afluentes parecem ter tido um papel importante na sua diversificação (Ribas *et al.*, 2011, Souza-Neves, 2013; Fernandes *et al.*, 2014a, 2014b). Os estudos anteriores apresentaram algumas hipóteses sobre o efeito de barreiras geográficas atualmente conhecidas sobre os táxons desse complexo e estão discutidas a seguir.

Eberhard & Bermingham (2004) haviam sugerido que o rio Amazonas poderia atuar como uma barreira geográfica entre as linhagens NSA e SA. Entretanto, apesar de todos os indivíduos do clado NSA terem sido amostrados ao norte dos rios Solimões e Amazonas, há alguns indivíduos do clado SA (Macapá-AP) amostrados na mesma margem (Figura 9), observação feita anteriormente por Ribas *et al.* (2007). Por outro lado, assim como Ribas *et al.* (2007), foi observado que indivíduos de *A. ochrocephala* da Ilha do Marajó e do Amapá apesar de estarem geograficamente próximos, pertencem a clados distintos (Figura 9). Esses autores sugeriram que o rio Amazonas poderia ser uma barreira entre os clados SA I e SA II nessa região. No entanto, o rio não parece agir como uma barreira efetiva dentro do clado SA IIb, pois como dito anteriormente, existem indivíduos desse clado localizados em ambos os

lado do rio (Acre e Amapá). Uma possível explicação para isso seria o fato de que os indivíduos seriam capazes de atravessar o rio nas regiões mais próximas à cabeceira onde sua largura é mais estreita, mas não na região de desembocadura na ilha. Para testar essa hipótese, seria necessário realizar estudos com uma amostragem maior de indivíduos ao longo de ambas as margens do rio.

A datação com base nos marcadores mitocondriais indica que as linhagens da América do Sul teriam se diversificado durante o Pleistoceno (Figura 3), o que não refuta uma possível influência das oscilações climáticas durante esse período na história evolutiva dessas linhagens. Também foram detectados sinais de expansão populacional para todas as linhagens (exceto NSA) por volta de 50 mil anos atrás, durante o Pleistoceno, que podem estar relacionados aos ciclos climáticos desse período. Caparroz *et al.* (2009) sugeriram que a diversificação das linhagens de *A. aestiva* tenha ocorrido em consequência aos ciclos climáticos que ocorreram durante o Pleistoceno. Segundo os autores, as linhagens teriam se divergido como resultado de expansões populacionais em direção nordeste e sudoeste a partir de um possível centro de origem (Mato Grosso do Sul). Tanto *A. aestiva* quanto *A. ochrocephala* habitam principalmente áreas abertas e secas, portanto tal expansão deve ter ocorrido durante os períodos frios e secos, com a possível expansão de savanas e áreas abertas (Pennington, 2000; Behling & Hooghiemstra, 2001). Em contraste, modelagens paleoclimáticas do Cerrado e de florestas sazonalmente secas, indicaram que esses ambientes teriam expandido sua distribuição durante o último período interglacial, seguido de uma retração no último máximo glacial, pois o clima estaria frio e seco demais para suportar amplas distribuições desses ambientes (Cerrado e florestas sazonalmente secas; Werneck *et al.*, 2011, 2012b). Entretanto, nossos dados mostram que a expansão populacional teria ocorrido após o período do último interglacial (Figura 11), sendo mais congruente com a expansão das savanas durante o período glacial, há pelo menos 60 mil anos (Behling & Hooghiemstra, 2001).

Também podemos observar que as linhagens SA I, SA IIa e SA IIb são concordantes com a distribuição dos domínios Amazônia, Cerrado e Chaco (Figura 9). Embora os dois últimos domínios possuam características mais semelhantes entre si, cada um responde de forma diferente às mudanças climáticas e ambientais e devem ser considerados separadamente em análises biogeográficas (Pennington *et al.*, 2000). Essa concordância entre as linhagens e os domínios pode indicar uma possível

divergência mediada pelo ambiente. Assim, a apesar de não ter encontrado sinal de seleção (ver Material e Métodos, pg. 22), não é possível descartar que alguma pressão seletiva tenha levado à fixação de alelos diferentes em cada ambiente (Rundle & Nosil, 2005; Schluter & Conte, 2009). Alternativamente, o processo de divergência poderia ter sido conduzido por seleção sexual, pela qual a reprodução poderia ter ocorrido preferencialmente entre indivíduos mais semelhantes entre si (Servedio, 2016), uma vez que essas linhagens possuem alguma concordância com as formas morfológicas de *A. ochrocephala*, *A. a. aestiva* e *A. a. xanthopteryx*.

As redes de haplótipos (Figura 10) e o resultado do STRUCTURE (Figura 7) com base no loco ligado ao cromossomo Z, PLAA, também mostraram alguma estruturação, embora distinta daquela observada para o mtDNA. Essas linhagens possuem alguma concordância com a identificação taxonômica atual dos indivíduos (Figuras 7 e 10). No entanto é possível observar compartilhamento de haplótipos entre as espécies, podendo ser resultante de um sorteamento incompleto de linhagens ou fluxo gênico, que parece ser mais intenso no sentido *A. ochrocephala* → *A. aestiva*, uma vez que há mais indivíduos *A. aestiva* com haplótipos da linhagem com mais indivíduos de *A. ochrocephala*. Essa estruturação é congruente com a literatura e outros estudos que têm mostrado que marcadores ligados ao cromossomo Z em aves apresentam maior diferenciação e/ou menor introgressão entre espécies do que locos autossômicos (Saetre *et al.*, 2003; Coyne & Orr, 2004; Borge *et al.*, 2005; Carling & Brumfield, 2008, 2009; Carling *et al.*, 2010; Storchová *et al.*, 2010; Elgvin *et al.*, 2011). Como mencionado na introdução, uma das possíveis explicações para esse resultado é a Regra de Haldane, que prediz a inviabilidade ou infertilidade do sexo heterogamético na prole híbrida (Coyne & Orr, 2004). A esterilidade teria como causa a interação de genes recessivos com incompatibilidade alélica desenvolvida em alopatria, e que não poderiam ser “mascarados” por um alelo dominante no sexo heterogamético caso esses alelos estejam localizados nos cromossomos sexuais (Coyne & Orr, 2004; Carling & Brumfield, 2009). Além disso, uma pressão seletiva mais acentuada pode ser esperada nesses genes (*Fast-Z effect*), uma vez que mutações recessivas benéficas ou deletérias sendo expostas no sexo heterogamético podem ser mais facilmente fixadas ou eliminadas, respectivamente (Charlesworth *et al.*, 1987). Isso pode ter resultado no baixo polimorfismo observado e maior diferenciação

interespecífica do que os encontrados para os demais marcadores nucleares no presente estudo.

As redes de haplótipos dos locos nucleares anônimos (Figuras 9 e 10) não mostraram evidências de estruturação geográfica. Tal resultado pode estar relacionado com o maior tamanho efetivo populacional de aproximadamente quatro vezes nos locos nucleares em comparação aos mitocondriais, o que leva a um maior tempo de coalescência e conseqüentemente, a um maior efeito do sorteamento incompleto de linhagens (Zink & Barrowclough, 2008).

5.2 Relação entre *A. aestiva* e *A. ochrocephala*

Assim como nos trabalhos anteriores, as espécies *A. aestiva* e *A. ochrocephala* atualmente descritas com base na morfologia não são concordantes com a estrutura genética recuperada para o mtDNA, que mostra uma relação parafilética entre eles. Eberhard & Bermingham (2004) propuseram que *A. ochrocephala* da América do Sul deveria ser separado em duas espécies: *A. ochrocephala* (inclui *A. o. ochrocephala* do Norte da América do Sul, ou seja, o clado NSA) e *A. nattereri* (composto por *A. o. ochrocephala* da Amazônia e *A. o. nattereri* e *A. o. xantholaema*). Alternativamente, todos os indivíduos da América do Sul seriam reconhecidos como uma única espécie, *A. ochrocephala*. Esta última proposta não foi congruente com os dados de Ribas *et al.* (2007), devido ao fato de as linhagens NSA e SA não serem os mais proximamente relacionados.

Os nossos dados mitocondriais (Figuras 3, 4, 9), assim como os de trabalhos anteriores (Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009) são congruentes com a proposta de que *A. ochrocephala* da linhagem NSA poderia ser uma espécie distinta. Entretanto, existe um descompasso entre morfologia e genética nesses indivíduos. Segundo a proposta de Eberhard & Bermingham (2004) a espécie *A. ochrocephala* (clado NSA) incluiria apenas indivíduos de *A. o. ochrocephala* da parte norte da América do Sul, excluindo os indivíduos de *A. o. ochrocephala* da Amazônia. Adicionalmente, neste estudo um dos indivíduos da linhagem NSA foi identificado como *A. o. nattereri* (A. Aleixo, comunicação pessoal). Essa incongruência entre genética e morfologia pode ser um indicativo de que a quantidade de amarelo na cabeça não seja um bom marcador para diagnosticar as subespécies desta espécie,

sendo necessária uma revisão taxonômica dessas subespécies. Surpreendentemente, a rede de haplótipos do loco PLAA (Figura 10) não recuperou a linhagem NSA que se mostra bastante divergente para o mtDNA. Para uma verificação mais precisa, seria necessário analisar mais locos e mais indivíduos dessa linhagem, uma vez que apenas dois indivíduos foram sequenciados para esse loco. Estudos adicionais de morfologia e vocalização devem ser realizados para verificar se existem caracteres que permitam distinguir essa linhagem das demais.

Para o restante dos indivíduos da América do Sul os resultados são um pouco mais complexos. A divisão das subespécies descritas morfologicamente para *A. ochrocephala* não são concordantes com as linhagens recuperadas nas análises, mas são congruentes com estudos anteriores (Figuras 3, 9; Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009) que indicam a necessidade de mais estudos morfológicos que permitam entender melhor o padrão de plumagem que possa ser utilizado para diagnosticar esses táxons. Adicionalmente, esses estudos anteriores indicam que *A. ochrocephala* e *A. aestiva* não são reciprocamente monofiléticos, o que foi corroborado pelas nossas análises mitocondriais (Figuras 3 e 9). Entretanto, no presente estudo encontramos uma subdivisão do grupo SA II, sendo que uma das linhagens é composta em sua maioria por indivíduos de *A. aestiva* (SA IIa) e a outra linhagem por indivíduos de *A. ochrocephala* (SA IIb). Dessa forma, nossos dados indicam uma tendência um pouco maior em diferenciar as duas espécies se comparados aos estudos anteriores (Eberhard & Bermingham, 2004; Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009; Urantówka *et al.*, 2014). No entanto, para refletir melhor a taxonomia atual, nossos dados deveriam agrupar as linhagens SA IIa (maioria de *A. aestiva*) e SA I (maioria de *A. aestiva*), o que não é observado (Figura 3). Outra possível alternativa seria o agrupamento da linhagem SA IIb com a linhagem SA I, pois, apesar de esta última ser composta majoritariamente por *A. aestiva*, devido à possibilidade de ter ocorrido uma varredura introgressiva entre as duas espécies dentro dessa linhagem (ver abaixo), não podemos inferir inequivocadamente à qual espécie os haplótipos da linhagem SA I estão mais relacionados. Assim, estudos adicionais com mais amostras de *A. ochrocephala* da América do Sul e mais marcadores precisam ser realizados para investigar melhor as relações entre essas linhagens.

Sorteamento incompleto de linhagens e introgressão foram sugeridos como possíveis explicações para o compartilhamento de haplótipos entre os táxons

(Eberhard & Bermingham, 2004; Ribas *et al.*, 2007; Caparroz *et al.*, 2009). Caparroz *et al.* (2009) ainda sugere que a introgressão seria a melhor explicação para este caso. Distinguir entre introgressão e sorteamento incompleto de linhagens não é uma tarefa simples, uma vez que ambos os processos podem produzir padrões filogenéticos semelhantes (Avice *et al.*, 1990; Morando *et al.*, 2004). No entanto, é esperado que esses processos resultem em padrões geográficos diferentes: na presença de introgressão, espera-se que o compartilhamento de haplótipos seja mais frequente nas regiões de contato entre as espécies ou próximas, e não distribuídas aleatoriamente, como no caso de sorteamento incompleto (Masta *et al.*, 2002). Os resultados do presente estudo parecem ser mais congruentes com um cenário de introgressão. Isso porque indivíduos de *A. ochrocephala* que carregam haplótipos da linhagem SA IIa (composto em sua maior parte por *A. aestiva*) e indivíduos de *A. aestiva* portadores de haplótipos da linhagem SA IIb (composto majoritariamente por *A. ochrocephala*) ocorrem principalmente em uma área onde supostamente há sobreposição da distribuição dessas espécies (Bolívia e Mato Grosso; Figura 9, localidades 16 e 35). Essa situação também é observada em uma localidade próxima à essa área (Acre; Figura 9, localidade 11). Assim, devido à proximidade geográfica, é possível que indivíduos da área de contato entre as duas espécies tenham migrado até essa localidade. Contudo, podemos observar que há três indivíduos de *A. ochrocephala* com um haplótipo (o mais frequente) da linhagem SA IIa em localidades mais distantes dessa zona de contato (Figura 9, localidades 9 e 38), o que não seria congruente com um cenário de introgressão, mesmo que, em geral, os psitacídeos sejam capazes de dispersar longas distâncias (Collar, 1997). Assim, seria importante obter uma amostragem maior nessa região para permitir investigar essa questão.

Na rede de haplótipos do loco PLAA (Figura 10) podemos observar, que a introgressão detectada ocorre de forma diferente entre as espécies, sendo encontrados mais indivíduos de *A. aestiva* agrupados na linhagem composta majoritariamente por *A. ochrocephala* do que indivíduos de *A. ochrocephala* agrupados na linhagem composta predominantemente por *A. aestiva*. Tal assimetria pode ser devido a mecanismos genéticos ou epigenéticos restringindo a introgressão de forma diferencial nas duas espécies (Saetre, 2003). Carling & Brumfield (2009) também detectaram introgressão assimétrica de alelos do gene do Z em *Passerina cyanea* e *P. amoena*, e sugerem que a intensidade da seleção sobre o híbrido seria diferente

dependendo da composição do genoma do indivíduo que recebeu o alelo ligado ao Z. Aplicando a hipótese de Carling & Brumfield (2009) no nosso estudo, indivíduos carregando alelo PLAA de *A. aestiva* que possuem genoma predominante de *A. ochrocephala* sofreriam maior ação da seleção do que indivíduos com alelo PLAA de *A. ochrocephala* com genoma predominante de *A. aestiva*.

Ainda com base nos dados do loco PLAA, todos os indivíduos (N = 14; Tabela 1) da Ilha de Marajó (morfologicamente identificados como *A. o. xantholaema*) são mais próximos dos demais *A. ochrocephala* (exceto um alelo de um indivíduo; Figura 10), enquanto o mtDNA mostra o agrupamento desses indivíduos com *A. aestiva* da linhagem SA I (Figura 9). Isso é interessante, pois, como exposto anteriormente, os demais indivíduos de *A. ochrocephala* estão majoritariamente agrupados na linhagem SA IIb (que é composto em sua maioria de *A. ochrocephala*) e a introgressão do mtDNA parece ocorrer principalmente na região de sobreposição da distribuição das duas espécies (Figura 9), enquanto que todos os indivíduos da Ilha do Marajó se agruparam com *A. aestiva* da linhagem SA I (Figura 9). Assim, parece que nessa localidade a introgressão ocorre de forma mais intensa, mesmo não tendo indicação de que esses indivíduos estejam em contato (de acordo com a distribuição conhecida desses táxons). Devido às predições da Regra de Haldane, espera-se que o DNA mitocondrial apresente menor susceptibilidade à introgressão do que os locos ligados ao Z e menor ainda do que os nucleares em aves (Carling & Brumfield, 2008; Rheindt & Edwards, 2011). Dessa forma, seria esperado que a introgressão do mtDNA ocorresse preferencialmente nas áreas de hibridização, sendo pouco provável que a introgressão atinja regiões muito além dessa área. No entanto, o mtDNA também é considerado o marcador mais suscetível aos efeitos de “varredura introgressiva” (*introgressive sweep*, em inglês; Rheindt & Edwards, 2011). Esse fenômeno ocorre quando há diferença no *fitness* entre alelos. Assim, quando o alelo “invasor” possui *fitness* maior do que o alelo nativo, ele pode substituir o nativo ao longo de toda sua distribuição geográfica (Rheindt & Edwards, 2011). Segundo Rossetti *et al.* (2006, 2007) a porção leste da Ilha de Marajó possui habitat semelhante ao cerrado (domínio onde *A. aestiva* do clado SA I ocorre) podendo indicar a possibilidade de que a introgressão poderia estar relacionada com alguma vantagem seletiva ao habitat. Apesar de os nossos dados serem congruentes com um evento de varredura introgressiva, análises utilizando dados em escala genômica

precisariam ser realizadas para diagnosticar esse fenômeno de maneira mais conclusiva (F. Rheindt, comunicação pessoal)

Assim, estudos adicionais integrando morfologia, vocalização e genética ainda são necessários para compreender as relações evolutivas desses táxons de maneira mais global.

5.3 Implicações para conservação

As principais ameaças tanto para *A. aestiva* quanto para *A. ochrocephala* são a degradação e fragmentação de habitat e perda de áreas potenciais para reprodução (Collar & Juniper, 1988; Juniper & Parr, 1998). As principais causas dessa destruição de habitat são as atividades humanas, tais como expansão da agricultura, desenvolvimento urbano e desmatamento (Juniper & Parr, 1998). Outra principal ameaça é a grande pressão de captura de indivíduos na natureza para o comércio ilegal de animais silvestres. Psitacídeos de modo geral, são bastante populares como mascotes, devido à sua coloração exuberante e habilidade de imitar a fala humana (Forshaw, 1989; Juniper & Parr, 1998). Em especial, *A. aestiva* é considerado um dos alvos principais desse tráfico, e por isso foi incluída no Plano de Ação Nacional para a Conservação de Psitacídeos da Mata Atlânticas (Schunck *et al.*, 2011).

Sob o ponto de vista de Unidades de Manejo (Moritz, 1994) e adotando um cenário conservativo, a estrutura genética encontrada no presente trabalho sugere que as linhagens mitocondriais (Figuras 3, 4 e 9 - B e C) poderiam ser consideradas como Unidades de Manejo distintas, apesar das incongruências taxonômicas. Além disso, podemos observar que a linhagem SA I, composta por sua maior parte por *A. aestiva*, está distribuída principalmente no Cerrado, considerado um dos *hotspots* de biodiversidade (Myers, 2000). Estima-se que esse domínio possua apenas 20% da sua cobertura original e apenas 6,2% da extensão total do domínio se encontra em áreas de protegidas (Myers, 2000). Por ser uma espécie popularmente conhecida e carismática, *A. aestiva* pode ser utilizada como espécie bandeira para a preservação desse domínio e de toda sua a biodiversidade, e também no combate ao tráfico ilegal de aves no Brasil (Schunck *et al.* 2011).

Conclusões

1) O complexo *A. aestiva/A. ochrocephala* da América do Sul abrange quatro linhagens mitocondriais. Ou seja, no presente trabalho uma subdivisão adicional foi identificada, revelando duas linhagens da América do Sul que foram majoritariamente compostas de indivíduos de uma das espécies, indicando diferenciação maior entre elas quando comparado a estudos anteriores. Além disso, o aumento da amostragem geográfica revelou que uma dessas linhagens (norte da América do Sul) possui maior distribuição geográfica.

2) Flutuações climáticas durante o Pleistoceno e pressões seletivas divergentes em diferentes ambientes podem ter influenciado na diversificação dessas linhagens.

3) O padrão filogeográfico encontrado para o mtDNA indica que o compartilhamento de haplótipos entre as espécies ocorre principalmente em zonas de contato e áreas próximas, o que sugere que a introgressão seja o processo gerador desse compartilhamento de haplótipos.

4) O loco ligado ao cromossomo Z mostra estruturação mais concordante com a atual identificação morfológica de espécies. Possivelmente, seguindo a Regra de Haldane, os alelos são menos susceptíveis à introgressão devido à esterilidade e/ou inviabilidade de híbridos heterogaméticos. Além disso, esses locos supostamente possuem uma rápida evolução adaptativa (*Fast-Z*) que pode também aumentar a diferenciação entre espécies.

5) Incongruências entre a taxonomia baseada na plumagem e na genética ressaltam a necessidade de mais estudos de diferentes áreas do conhecimento (como por exemplo, vocalização e morfologia) para ajudar a entender melhor as relações entre esses táxons.

6) De forma conservativa, as linhagens mitocondriais podem ser consideradas como unidades de manejo distintas para o manejo e estratégias de conservação.

7) Os resultados aqui obtidos mostram a importância da inclusão de mais indivíduos e marcadores em estudos evolutivos. Assim, as novas tecnologias de análises a nível genômico parecem ser uma boa estratégia para investigar histórias evolutivas de diversos táxons de maneira ainda mais ampla, seu uso pode ser uma ferramenta útil para investigar o complexo sul americano de *Amazona aestiva* / *Amazona ochrocephala*.

Resumo

O complexo sul americano de *Amazona aestiva*/*Amazona ochrocephala* possui ampla distribuição geográfica, compreendendo desde o nordeste brasileiro até o norte da Argentina e do norte da América do Sul até a Bacia Amazônica, respectivamente. Estudos de filogenia e filogeografia indicam que esses táxons não são reciprocamente monofiléticos. Contudo, esses trabalhos foram baseados apenas no DNA mitocondrial. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise de filogeografia multilocos do complexo *A. aestiva*/*A. ochrocephala* da América do Sul. Foram utilizados os locos mitocondriais COI (512 pb) e ND2 (524 pb) de 189 e 146 indivíduos, respectivamente; os locos nucleares autossômicos AMZ-02 (525 pb), AMZ-10 (524 pb) e AMZ-12 (524 pb) de 132, 133 e 132 indivíduos, respectivamente; e um íntron de um gene ligado ao cromossomo Z (PLAA, 473 pb) de 132 indivíduos. A estrutura genética mitocondrial indicou a presença de quatro linhagens que, apesar de incluírem indivíduos das duas espécies, cada linhagem é majoritariamente composta de indivíduos de uma das espécies. Ou seja, nossos dados mostraram maior tendência a separar os indivíduos das duas espécies do que os estudos prévios, mas ainda sem congruência total com a taxonomia vigente. Duas amostras novas se agruparam na linhagem do norte da América do Sul, ampliando sua distribuição e mostrando incongruência com a atual classificação das subespécies de *A. ochrocephala*. A distribuição geográfica das linhagens possui concordância com diferentes domínios, sugerindo que pressões seletivas dos ambientes podem ter contribuído para sua diversificação. Adicionalmente, os ciclos glaciais durante o Pleistoceno podem ter alguma relação com mudanças no tamanho populacional das linhagens. A estrutura baseada no loco ligado ao cromossomo Z mostrou boa congruência com a atual taxonomia de espécies. O compartilhamento de haplótipos principalmente nas áreas de maior proximidade entre *A. aestiva* e *A. ochrocephala* pode ser um indicativo de introgressão. As incongruências entre genética e plumagem encontrados no presente trabalho ressaltam a necessidade de mais estudos para melhor entender as relações dentro desse complexo de espécies. Sob o ponto de vista da conservação, as linhagens mitocondriais podem ser consideradas como Unidades de Manejo distintas. De um modo geral, o presente estudo contribuiu com mais informações sobre o complexo sul americano de *A. aestiva*/*A. ochrocephala* e mostra a importância da utilização de mais amostras e marcadores em estudos evolutivos

para uma investigação de padrões filogeográficos e histórias evolutivas de maneira mais ampla.

Abstract

The South American *Amazona aestiva/Amazona ochrocephala* complex has a broad distribution, ranging from northeast Brazil to the north of Argentina and from the north of South America to the Amazon Basin, respectively. Phylogenetic and phylogeographic studies have shown that these taxa are not reciprocally monophyletic. However, these studies were based only on mitochondrial DNA. Therefore, in the present study we performed a phylogeographic analysis of South American *A. aestiva/A. ochrocephala* using a multilocus approach. Our database included mitochondrial DNA sequences of COI (512 bp) and ND2 (524 bp) from 189 and 146 individuals, respectively; autosomal nuclear sequences of AMZ-02 (525 bp), AMZ-10 (524 bp) and AMZ-12 (524 bp) from 132, 133 and 132 individuals, respectively; and one intron of a Z chromosome-linked gene (PLAA, 473 bp) from 132 individuals. Mitochondrial data recovered four South American lineages. Even though each lineage groups individuals from both species, the majority of individuals from each lineage belongs to one of the species. Thus, our data showed a clearer tendency to separate individuals from each species than previous studies, but still did not fully agree with current taxonomy. Two new samples clustered in the northern South America lineage, expanding its distribution and revealing incongruence between genetic data and current taxonomy of subspecies of *A. ochrocephala*. The geographic distribution of lineages matched that of different biomes, suggesting that selective environmental pressures may have contributed to their diversification. Additionally, climatic oscillations during the Pleistocene could have influenced demographic changes of these lineages. The genetic structure based on the Z-linked locus fairly agrees with species taxonomy. The overlap of different mitochondrial lineages mostly occurred where the geographic distributions of *A. aestiva* and *A. ochrocephala* were closer, suggesting that haplotype sharing could be caused by introgression. The lack of agreement between genetic and plumage data indicated that more studies are needed to solve this question. Regarding conservation, mitochondrial lineages could be considered as distinct Management Units. In sum, the present study contributed to improve the knowledge about the South American *A. aestiva/A. ochrocephala* complex and highlights the importance of using more samples and markers in evolutionary studies.

Referências Bibliográficas

- Antonelli, A.; Sanmartín, I. (2011) Why there are so many plant species in the Neotropics? **Taxon** 60: 403-414.
- American Ornithologists' Union (1998) **Check-list of North American Birds**. 7^a ed. American Ornithologists' Union, Washington, D.C.
- Avise, J.C. (2000) **Phylogeography: the History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise, J.C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography** 36: 3-15.
- Avise J.C.; Arnold J.; Ball R.M.; Bermingham E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 18: 489–522.
- Avise, J.C.; Ankney, C.D.; Nelson, W.S. (1990) Mitochondrial gene trees and the evolutionary relationship of mallard and black ducks. **Evolution** 44: 1109-1119.
- Axelsson, E.; Smith, N.G.C.; Sundstrom, H.; Berlin, S.; Ellegren, H. (2004) Male-biased mutation rate and divergence in autossomal, Z-linked and W-linked introns of chicken and turkey. **Molecular Biology and Evolution** 21: 1538-1547.
- Ayres, J.M.; Clutton-Brock, T.H. (1992) River boundaries and species ranges size in Amazonian primates. **The American Naturalist** 140: 531-537.
- Backstrom, N.; Lindell, J.; Zhang, Y.; Palkopoulou, E.; Qvarnstrom, A.; Saetre, G.; Ellegren, H. (2010). A high-density scan of the Z chromosome in *Ficedula* flycatchers reveals candidate loci for diversifying selection. **Evolution** 64: 3461-3475.
- Bandelt, H-J.; Forster, P.; Rohl, A. (1999) Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16: 37-48.
- Behling, H.; Hooghiemstra, H. (2001) Neotropical savanna environments in space and time: Late Quaternary interhemispheric comparisons. *In*: Markgraf, V. (ed) **Interhemispheric Climate Linkages**. Academic Press, New York. Pp: 307-323.
- Bertozzi, T.; Sanders, K.L.; Sistro, M.J.; Gardner, M.G. (2012) Anonymous nuclear loci in non-model organism: making the most of high-throughput genome surveys. **Bioinformatics** 28: 1807-1810.
- Borge, T.; Webster, M.T.; Andersson, G.; Saetre, G. (2005) Contrasting pattern of polymorphism and divergence on the Z chromosome and autosomes in two *Ficedula* flycatcher species. **Genetics** 171: 1861-1873.
- Bouckaert, R.; Heled, J.; Kuhnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C-H.; Xie, D.; Suchard, M.A.; Rambaut, A.; Drummond, A.J. (2014) BEAST 2: A software Platform

- for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology** 10: e1003537.
- Brito, P.H.; Edwards, S.V. (2009) Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. **Genetics** 135: 439-455.
- Bruen, T.C.; Philippe, H.; Bryant, D. (2006) A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. **Genetics** 172: 2665-2681.
- Bruford, M.W.; Hanotte, O.; Brookfield, J.F.Y.; Burke, T. (1992) Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoezel, A.R. (ed.) **Molecular Genetic Analysis of Population - a Practical Approach**. Oxford University, New York. Pp: 225-269.
- Bush, M.B.; de Oliveira, P.E. (2006) The rise and fall of the refugial hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. **Biota Neotropica** 6: 1-17.
- Cabanne, G.S.; d'Horta, F.M.; Sari, E.H.R.; Santos, F.R.; Miyaki, C.Y. (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49: 760-773.
- Caparroz, R.; Seixas, G.H.F.; Berkunsky, I.; Collevatti, R.G. (2009) The role of demography and climatic events in shaping the phylogeography of *Amazona aestiva* (Psittaciformes, Aves) and definition of management units for conservation. **Diversity and Distributions** 15: 459-468.
- Carling, M.D.; Brumfield, R.T. (2008) Haldane's rule in an avian system: using cline theory and divergence population genetics to test for differential introgression of mitochondrial, autosomal, and sex-linked loci across the *Passerina* bunting hybrid zone. **Evolution** 62: 2600-2615.
- Carling, M.D.; Brumfield, R.T. (2009) Speciation in *Passerina* buntings: introgression patterns of sex-linked loci identify a candidate gene region for reproductive isolation. **Molecular Ecology** 18: 834-847.
- Carling, M.D.; Lovette, I.J.; Brumfield, R.T. (2010) Historical divergence and gene flow: coalescent analyses of mitochondrial, autosomal and sex-linked loci in *Passerina* buntings. **Evolution** 64: 1762-1772.
- Carnaval, A.C.; Hickerson, M.J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M.T.; Moritz, C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science** 323: 785-789.
- CBRO – Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2011) **Lista das Aves do Brasil**. 10ª Ed. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>> Acesso em: [01.03.2013].
- Charlesworth, B.; Coyne, J.A.; Barton, N.H. (1987) The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. **The American Naturalist** 130: 113-146
- Colinvaux, P.A.; de Oliveira, P.E.; Moreno, J.E.; Miller, M.C.; Bush, M.B. (1996) A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. **Science** 274: 85-88.
- Colinvaux, P.A.; de Oliveira, P.E.; Bush, M.B. (2000) Amazonian and Neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. **Quaternary Science Reviews** 19: 141-169.
- Collar, N.J. (1997) Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo, J.; Elliot, A.E.;

- Sargatal, J. (eds.). **Handbook of the Birds of the World**. vol.4, Lynx Edicions, Barcelona. Pp: 280-477.
- Collar, N.J.; Juniper, A.T. (1988) Dimensions and causes of the parrot conservation crisis. *In*: Beissinger, S.R.; Snyder, N.F.R. (eds) **New World Parrot in Crisis: Solutions from Conservation Biology**. Smithsonian Institution Press, Washington. Pp. 3-21.
- Corander, J.; Marttinen, P. (2006) Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. **Molecular Ecology** 15: 2833-2843.
- Corander, J.; Marttinen, P.; Siren, J.; Tang, J. (2008) Enhanced Bayesian modeling in BAPS software for learning genetics structures of populations. **BMC Bioinformatics** 9: 539.
- Corl, A.; Ellegren, H. (2013) Sampling strategies for species trees: the effects on phylogenetic inference of the number of genes, number of individuals, and whether loci are mitochondrial, sex-linked, or autosomal. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 67: 358-366.
- Coyne, J.A.; Orr, H.A. (2004) **Speciation**. Sinauer Associates, Sunderland.
- Cracraft, J.; Prum, R.O. (1988) Patterns and processes of diversification: Speciation and historical congruence in some neotropical birds. **Evolution** 42: 603-620.
- Crisci, J.V.; Katinas, L.; Posadas, P. (2003) **Historical Biogeography: an Introduction**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dean, R.; Harrison, P.W.; Wright, A.E.; Zimmer, F.; Mank, J.E. (2015) Positive selection underlies faster-Z evolution of gene expression in birds. **Molecular Biology and Evolution** doi:10.1093/molbev/msv138.
- Drummond, A.J.; Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology** 7: 214.
- Earl D.A.; Vanholdt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** 4: 359-361.
- Eberhard, J.R.; Bermingham E. (2004) Phylogeny and biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. **The Auk** 121: 318-332.
- Eberhard, J.R.; Bermingham, E. (2005) Phylogeny and comparative biogeography of *Pionopsitta* parrots and *Pteroglossus* toucans. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 36: 288-304.
- Elgvin, T.O.; Hermansen, J.S.; Fijarczyk, A.; Bonnet, T.; Borge, T.; Saether, S.A.; Voje, K.L.; Saetre, G. (2011) Hybrid speciation in sparrows II: a role for sex chromosomes? **Molecular Ecology** 20: 3823-3837.
- Ellegren, H. (2007) Molecular evolutionary genomics of birds. **Cytogenetic and Genome Research** 117: 120-130.
- Endler, J.A. (1982) Pleistocene forest refuges: fact or fancy? *In*: Prance, G.T. (ed.) **Biological Diversification in the Tropics**. Columbia University Press, New York. Pp.: 641-657.

- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14: 2611-2620.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics** 1: 47-50.
- Felsenstein, J. (2004) **Inferring Phylogenies**. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Fernandes, A.M.; Wink, M.; Sardelli, C.H.; Aleixo, A. (2014a) Multiple speciation across the Andes and throughout Amazonia: the case of the spot-backed antbird species complex (*Hylophylax naevius*/*Hylophylax naevioides*). **Journal of Biogeography** 41: 1094-1104.
- Fernandes, A.M.; Cohn-Haft, M.; Hrbek, T.; Farias, I.P. (2014b) Rivers acting as barriers for bird dispersal in the Amazon. **Revista Brasileira de Ornitologia** 22: 363-373.
- Flot, J.F.; Tillier, A.; Samadi, S.; Tillier, S. (2006) Phase determination from direct sequencing of length-variable DNA regions. **Molecular Ecology Notes** 6: 627-630.
- Flot, J.F. (2007) Champuru 1.0: a computer software for unraveling mixtures of two DNA sequences of unequal lengths. **Molecular Ecology Notes** 7: 974-977.
- Forshaw, J.M. (1989) **Parrots of the World**. Princeton Field Guides, Princeton.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147: 915-925.
- Gill, F.; Donsker, D. (2015) IOC World Bird List (v 5.3). Disponível em <<http://www.worldbirdnames.org>> Acesso em: [10.2015].
- Griffiths, R.; Double, M.; Orr, K.C.Y.; Dawson, R.J.G (1998) A DNA test to sex most bird. **Molecular Ecology** 7: 1071-1075.
- 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: 451-476.
- Heled, J.; Drummond, A.J. (2008) Bayesian inference of population size history from multiple loci. **BMC Evolutionary Biology** 8: 289.
- Hickerson, M.J.; Carstens, B.C.; Cavender-Bares, J.; Crandall, K.A.; Graham, C.H.; Johnson, J.B.; Rissler, L.; Victoriano, P.F.; Yoder, A.D. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 54:291-301.
- Huson, D.H.; Bryant, D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution** 23: 254-267.
- INFONATURA (2007) Birds, mammals, and amphibians of Latin America [web application] Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Disponível em <<http://infonatura.natureserve.org>>. Acesso em: [03.13].
- IUCN (2016) **Red List of Threatened Species**. Versão 2015.4. Disponível em <<http://iucnredlist.org>>. Acesso em [01.2016].

- Jakobsson, M.; Rosenberg, N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics** 23: 1801-1806.
- Juniper, T.; Parr, M. (1998) **Parrots: a Guide to Parrots of the World**. Yale University Press, New Haven.
- Knowles, L.L.; Maddison, W.P. (2002) Statistical phylogeography. **Molecular Ecology** 11: 2623-2635.
- Lee, J.Y.; Edwards, S.V. (2008) Divergence across Australia's carpenterian barrier: statistical phylogeography of the red-backed fairy wren (*Malurus melanocephalus*). **Evolution** 62: 3117-3134.
- Librado, P.; Rozas, J. (2009) DnaSPv5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25: 1451-1452.
- Maldonado-Coelho, M. (2012) Climatic oscillations shape the phylogeographical structure of Atlantic Forest fire-eye antbirds (Aves: Thamnophilidae) **Biological Journal of the Linnean Society** 105: 900-924.
- Mank, J.E.; Axelsson, E.; Ellegren, H. (2007) Fast-X on the Z: rapid evolution of sex-linked genes in birds. **Genome Research** 17: 618-624.
- Mank, J.E.; Nam, K.; Ellegren, H. (2010) Faster-Z evolution is predominantly due to genetic drift. **Molecular Biology and Evolution** 27: 661-670.
- McDonald, J.H.; Kreitman, M. (1991) Adaptive protein evolution at the locus in *Drosophila*. **Nature** 351: 652-654.
- Martins, F.M.; Domingues, M.V. (2011) Filogeografia. **Revista da Biologia**. Volume Especial Biogeografia: 26-30.
- Masta, S.E.; Sullivan, B.K.; Lamb, T.; Routman, E.J. (2002) Molecular systematics, hybridization, and phylogeography of the *Bufo americanus* complex in Eastern North America. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 24: 302-314.
- Mayers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; da Fonseca, G.A.B; Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-858.
- Morando, M.; Avila, L.J.; Baker, J.; Sites Jr, J.W. (2004) Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): Evidence for introgression and incomplete lineage sorting. **Evolution** 58: 842-861.
- Moritz, C. (1994) Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology and Evolution** 9: 373-375.
- Moritz, C.; Patton, J.L.; Schneider, C.J.; Smith, T.B. (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics** 31: 533-563.
- Nielsen, R.; Beaumont, M. A. (2009) Statistical inferences in phylogeography. **Molecular Ecology** 18: 1034-1047.
- Nordborg, M. (2003) Coalescent Theory. In: Balding, D.J.; Bishop, M.; Cannings, C. (eds.). **Handbook of Statistical Genetics**. 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester. Pp: 602-635.

- Nylander, J. A. A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Ogden, R.; Thorpe, R.S. (2002) Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99: 13612-13615.
- Palumbi, S.R. (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In*: Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B.K. (eds.). **Molecular Systematics**. 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland. Pp: 205-247.
- Pennington, R.T.; Prado, D.E.; Pendry, C.A. (2000) Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography** 27: 261-273.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945-959.
- Rambaut, A.; Suchard, M.A.; Xie, D.; Drummond, A.J. (2014) Tracer v1.6. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins, S.; Rozas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality test against population growth. **Molecular Biology and Evolution** 19: 2092-2100.
- Rheindt, F.E.; Edwards, S.V. (2011) Genetic introgression: an integral but neglected component of speciation in birds. **The Auk** 128: 620-632.
- Ribas, C.C.; Miyaki, C.M. (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.C.; Tavares, E.S.; Yoshihara, C.; Miyaki, C.Y. (2007) Phylogeny and biogeography of yellow-headed and blue-fronted parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with special reference to the South American taxa. **Ibis** 149: 564-574.
- Ribas, C.C.; Aleixo, A.; Nogueira, A.C.; Miyaki, C.M.; Cracraft, J. (2011) A paleogeographical model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proceedings of Royal Society of London B** 279: 681-689.
- Rodríguez-Ramilo, S.T.; Toro, M.A.; Fernández, J. (2009) Assessing population genetic structure via the maximization of genetic distance. **Genetic Selection and Evolution** 41: 49.
- Rosenberg, N.A.; Nordborg, M. (2002) Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphism. **Nature Reviews** 3: 380-390.
- Rosenberg, N.A. (2004) *Distruct*: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes** 4: 137-138.
- Rosenblum, E.B.; Belfiore, N.M.; Moritz, C. (2007) Anonymous nuclear markers for the eastern fence lizard, *Sceloporus undulatus*. **Molecular Ecology Notes** 7: 113-116.

- Rossetti, D.F.; Toledo, P.M. (2006) Biodiversity from a historical geology perspective: a case study from Marajó Island, lower Amazon. **Geobiology** 4: 215-223.
- Rossetti, D.F.; Góes, A.M.; Valeriano, M.M.; Miranda, M.C.C. (2007) Quaternary tectonics in a passive margin: Marajó Island, northern Brazil. **Journal of Quaternary Science** 22: 1-15.
- Rull, V. (2008) Speciation timing and Neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology** 17: 2722-2729.
- Rull, V. (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology and Evolution** 26: 508-513.
- Rundle, H.D.; Nosil, P. (2005) Ecological Speciation. **Ecology Letters** 8: 336-352.
- Russello, M.A.; Amato, A. (2004) A molecular phylogeny of *Amazona*: implication for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 30: 421-437.
- Saetre, G.P.; Borge, T.; Lindroos, K.; Haavie, J.; Sheldon, B.C.; Primmer, C.; Syvanen, A.C. (2003) Sex chromosome evolution and speciation in *Ficedula* flycatchers. **Proceedings of Royal Society of London B** 270: 53-59.
- Schluter, D.; Conte, G.L. (2009) Genetics and ecological speciation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 106: 9955-9962.
- Schunck, F.; Somenzari, M.; Lugarini, C.; Soares, E.S. (2011) **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica** (Série Espécies Ameaçadas nº20). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Brasília.
- Servedio, M.R. (2016) Geography, assortative mating, and the effects of sexual selection on speciation with gene flow. **Evolutionary Applications** 9: 91-102.
- Smith, T.B.; Wayne, R.K.; Girman, D.J.; Bruford, M.W. (1997) A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. **Science** 276:1855-1857.
- Souza-Neves, T.; Aleixo, A.; Sequeira, F. (2013) Cryptic patterns of diversification of a widespread Amazonian woodcreeper species complex (Aves: Dendrocolaptidae) inferred from multilocus phylogenetic analysis: implication for historical biogeography and taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 68: 410-424.
- Storchová, R.; Reif, J.; Nachman, M.W. (2010) Female heterogamety and speciation: reduced introgression of the Z chromosome between two species of nightingales. **Evolution** 64: 456-471.
- Sundstrom, H.; Webster, M.T.; Ellegren, H. (2004) Reduced variation on the chicken Z chromosome. **Genetics** 167: 377-385.
- Tajima, F. (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. **Genetics** 123: 597-601.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum

- Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** 28: 2731-2739.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.
- Thomson, R.C.; Wang, I.J.; Johnson, J.R. (2010) Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. **Molecular Ecology** 19: 2184-2195.
- Turchetto-Zolet, A.C.; Pinheiro, F.; Salgueiro, F.; Palma-Silva, C. (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology** 22: 1193-1213.
- Urantówka, A.D.; Mackiewicz, P.; Strzala, T. (2014) Phylogeny of *Amazona barbadensis* and the Yellow-Headed Amazon complex (Aves: Psittacidae): A new look at South American parrot evolution. **Plos One** 9: e97228.
- Vanzolini, P.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: 1-298.
- Zink, R.M.; Barrowclough, G.F. (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology** 17: 2107-2121.
- Wakeley, J. (2002) Inferences about the structure and history of populations: coalescents and intraspecific phylogeography. *In*: Singh, R.; Uyenoyama, M; Jain, S. (eds.). **The Evolution of Population Biology – Modern Synthesis**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wallace, A.R. (1852) On the monkeys of the Amazon. **Proceedings of the Zoological Society of London** 20: 107-110.
- Weir, J.T.; Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. **Molecular Ecology** 17: 2321-2328.
- Werneck, F.P. (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews** 30: 1630-1648.
- Werneck, F.P.; Gamble, T.; Colli, G.R.; Rodrigues, M.T.; Sites Jr, J.W. (2012a) Deep diversification and long-term persistence in the south American ‘dry diagonal’: integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. **Evolution** 66: 3014-3034.
- Werneck, F.P.; Nogueira, C.; Colli, G.R.; Sites Jr, J.W.; Costa, G.C. (2012b) Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implication for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. **Journal of Biogeography** 39:1695-1706.