

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.

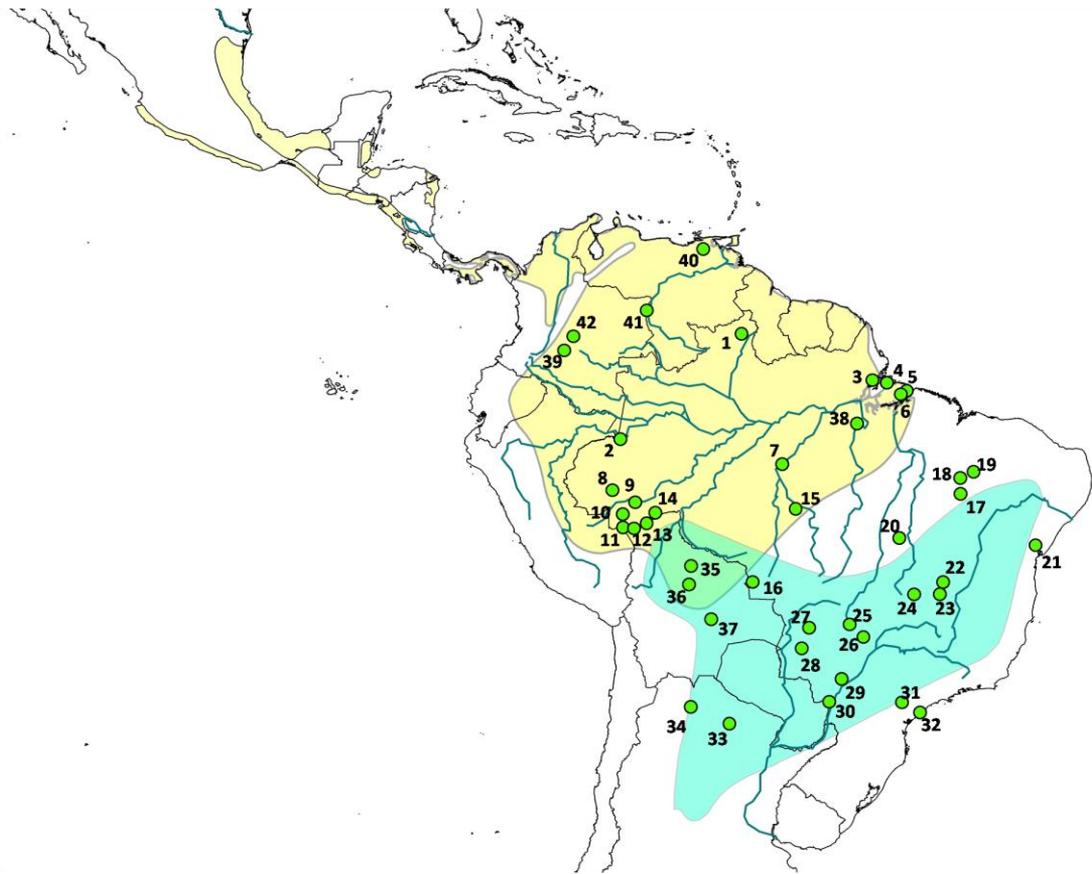


Figura 1: Distribuição geográfica de *Amazona aestiva* em turquesa e de *Amazona ochrocephala* em amarelo (INFONATURA, 2007). Os pontos verdes indicam localidades amostradas (ver Tabela 1).

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).

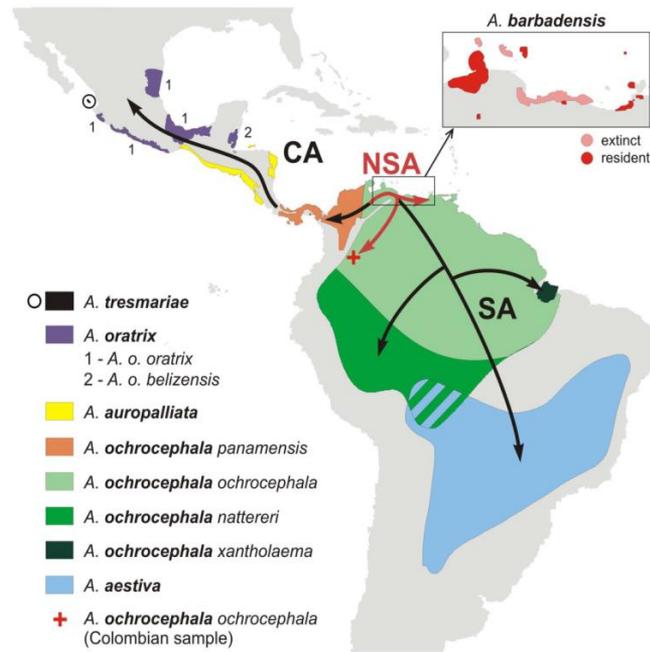


Figura 2. Hipótese de um possível cenário de diversificação do complexo *A. aestiva/A. ochrocephala*. Fonte: Urantówka *et al.* (2014).

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”).

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 carpentarian 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.