

Ana Cristina Fazza

Filogeografia de *Dendrocincla turdina* e de  
*Drymophila squamata* (Aves): subsidiando a  
reconstrução da história evolutiva de  
passeriformes da mata Atlântica

Phylogeography of *Dendrocincla turdina* and  
*Drymophila squamata* (Aves): reconstruction of the  
evolutionary history of passerine birds from the  
Atlantic forest

São Paulo  
2015

Ana Cristina Fazza

Filogeografia de *Dendrocincla turdina* e de *Drymophila squamata* (Aves): subsidiando a reconstrução da história evolutiva de passeriformes da mata Atlântica

Phylogeography of *Dendrocincla turdina* and *Drymophila squamata* (Aves): reconstruction of the evolutionary history of passerine birds from the Atlantic forest

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de doutor em Ciências Biológicas, na Área de Biologia-Genética

Orientadora: Cristina Yumi Miyaki

São Paulo  
2015

## Ficha catalográfica

Fazza, Ana Cristina

Filogeografia de *Dendrocincla turdina* e de *Drymophila squamata* (Aves): subsidiando a reconstrução da história evolutiva de passeriformes da mata Atlântica

97 páginas

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

1. Diversidade genética 2. Dendrocolaptidae  
3. Thamnophilidae 4. Biogeografia  
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).

---

Prof(a). Dr(a).

---

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

À minha sobrinha e afilhada Olivia,  
que traga muita luz ao mundo.  
Aos meus pais pelo amor  
e apoio incondicionais.

“Não obstante, o naturalista viajando de norte ao sul, por exemplo, não pode deixar de maravilhar-se pela maneira como grupos sucessivos de seres especificamente distintos, ainda que em estreita relação uns com os outros, se substituem reciprocamente. Veem-se aves carecidas: o seu canto é quase semelhante; os ninhos são construídos quase da mesma forma; os ovos são quase da mesma cor, contudo são espécies diferentes.”

Charles Darwin

A Origem das Espécies

Capítulo XII- Distribuição geográfica

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Cristina Y. Miyaki, pelo exemplo de ética profissional, pela confiança e paciência, pelo esmero com a correção dos nossos trabalhos, por ser sempre atenciosa e disposta a ajudar. A admiração, respeito e gratidão que eu tenho são imensuráveis, agradeço muito pela oportunidade em ter realizado esse trabalho sob sua orientação.

Aos amigos do LGEMA “antigos” Adriana, André, Bruno, Carol, Cibele, Danilo, Fábio, Henrique Batalha, Henrique Messias, Marcos, Natalia, Rafaella, Ricardo, Tiago e “novos” Ana Beatriz, Claydson, Denise, Erica, Fernanda, Maria, Greg, Yair pelo agradável convívio e valiosas discussões científicas, a troca de aprendizado e ajuda foram fundamentais, assim como os momentos de descontração.

To Mike Hickerson, for accepting me at his lab with joy and for his confidence in my work, even without any previous contact. It was a unique experience that influenced my professional life. I'm thankful for all the thoughts and considerations about my work.

To Hickerlab fellows Diego, John, J.T., Stephen, Terry, Tyler, Xander, for all helpful discussions and very friendly (and cozy) atmosphere, where I've learned a lot of new methods. And also for all the nice moments outside the lab, having a good time. These are happy memories.

Aos diversos colegas que me ensinaram a maioria do que eu sei sobre trabalho de campo e que foi um imenso prazer ter a oportunidade de ir coletar junto: Fábio Amaral, Henrique Batalha, Luciano Lima e Tiago Ribeiro (por compartilharem minha alegria em ver – e coletar - uma *Dendrocincla turdina* pela primeira vez!), Claydson Assis, Deborah Oliveira, Fábio Schunck, Gregory Thom, Lucas Araujo, Marco Antonio Rego, Marcos Maldonado e Vitor Piacentini, apenas essa citação nos agradecimentos é muito pouco pela minha gratidão pela ajuda nas coletas e pelos ensinamentos ornitológicos de cada um de vocês.

Aos diversos curadores que gentilmente nos emprestaram valiosas amostras para esse trabalho: Fabrício Santos e todos seus colaboradores que coletaram as amostras (UFMG), Henrique Rajão (PUC-RJ), Luiz Gonzaga (UFRJ), Marcos Raposo (MNRJ), Mercival R. Francisco e Pedro M. Galetti Jr (UFSCar), Rômulo Ribon (MZUFV).

Ao IBAMA e ao ICMBio pelas licenças para coleta.

À Lynx Edicions por gentilmente permitirem o uso das pranchas das espécies do Handbook of the Birds of the World Alive.

Aos funcionários da USP, principalmente do IB, por toda ajuda durante esse período Deisy, Lucileni, Shirlene, Erika, Eduardo, Genu, Maria, todos os secretários do Departamento de Genética e da pós-graduação.

À FAPESP, CAPES, CNPq, Pró-Reitoria de Pesquisa da USP, Instituto de Biociências, BioComp, NSF pelo financiamento do projeto. À CAPES e a FAPESP pelas bolsas de estudo.

Ao Marcos Maldonado Coelho por ter dado a ideia e incentivado o trabalho com *Drymophila squamata*.

To Ana Carnaval and all her lab students Amanda, Barbara, Brandon, Danielle, Ivandy, Ivan, Jason, Maria Strangas, Tony, Zoe, also from other labs Mariano, Peter, Robert, Jamie. You made my CCNY experience awesome.

Aos meus amigos da graduação da UNESP- S. J. Rio Preto que estão sempre que possível em contato e apoiando o meu trabalho. Em especial a Paulinha, que sempre se interessa e me incentiva com suas palavras de otimismo!

Aos meus amigos da Biologia que estão espalhados pelo Brasil e que mesmo assim sempre me animam para continuar o trabalho e me distraem quando preciso não pensar nele.

Aos meus amigos de São Paulo que estão mais presentes no dia a dia e contribuem para que sempre me inspirem a crescer pessoal e profissionalmente.

To my friends who helped me a lot when I was abroad: Lilian, Thiago, Diego, Enrique, Kayla, and Lola. Also I'm specially grateful to Stephen and Elodie, who kindly invited me to live at their home and made my US experience much more pleasant and happy.

Ao Fausto, por toda a paciência, compreensão e carinho.

À minha família, minhas irmãs Ana Carolina e Ana Karina, meu cunhado Cristiano, minhas sobrinhas Malu e Olivia, e especialmente aos meus pais Edson e Luci, por acreditarem em mim, por me incentivarem muito e serem curiosos em entender o que eu estudo, pelo apoio financeiro, por todo amor, carinho e cuidado que tem comigo.

À Deus, por toda inspiração.

## SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências bibliográficas	7
OBJETIVOS	13
1 CAPÍTULO 1 – Estrutura populacional e filogeografia de <i>Dendrocicla turdina</i>	
Resumo	17
Abstract	18
1.1 Introdução	19
1.2 Material e Métodos	21
1.3 Resultados	30
1.4 Discussão	36
1.5 Referências bibliográficas	41
2 CAPÍTULO 2 – Estudo filogeográfico de <i>Drymophila squamata</i>	
Resumo	49
Abstract	50
2.1 Introdução	51
2.2 Material e Métodos	53
2.3 Resultados	61
2.4 Discussão	69
2.5 Referências bibliográficas	78
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	85
Referências bibliográficas	89
APÊNDICES	91

## RESUMO

No presente trabalho nós investigamos a história filogeográfica de dois passeriformes: *Dendrocincla turdina* (Dendrocolaptidae) e *Drymophila squamata* (Thamnophilidae). As duas espécies são endêmicas de baixadas da Mata Atlântica e boa parte de suas distribuições é coincidente, mas *D. turdina* chega a altitudes maiores e *D. squamata* ocorre em uma região disjunta no nordeste onde *D. turdina* não ocorre. Foram analisadas a estrutura genética das duas espécies e suas histórias demográficas, também foram feitas inferências sobre os processos históricos que poderiam ter contribuído para a diversidade genética que observamos hoje. Para *D. turdina* foram utilizados sete microssatélites, um marcador mitocondrial e um íntron. Enquanto para *D. squamata* foram utilizados um marcador mitocondrial e dois íntrons. O primeiro capítulo da Tese aborda os dados de *D. turdina*, que mostraram ausência de estrutura geográfica e evidências de expansão populacional. A utilização de microssatélites reforçou a possibilidade de ser uma população única, uma vez que, dada a alta taxa de mutação desses marcadores, em geral é possível detectar divergências recentes. A expansão demográfica foi evidenciada e datada a partir do último máximo glacial (UMG) baseado no marcador mitocondrial e no íntron. A computação Bayesiana aproximada (ABC) foi utilizada para testar esse cenário de população única com expansão populacional baseado nos nove marcadores. Os parâmetros estimados foram congruentes com os resultados das outras análises. Parece ter ocorrido um gargalo genético seguido por aumento do tamanho populacional, sendo que no UMG o tamanho efetivo populacional era duas ordens de grandeza menor do que o atual. No segundo capítulo da Tese analisamos a espécie *D. squamata*, para a qual foram encontradas quatro linhagens mitocondriais separadas geograficamente. Sendo que as linhagens Sul, Centro e Norte parecem ter se divergido durante o Pleistoceno médio, enquanto o grupo Nordeste, composto pela população disjunta, parece ter se diversificado há mais tempo, cerca de 1,1 milhão de anos atrás. Para os clados Sul e Norte foram identificadas expansões demográficas no UMG. Tanto eventos geotectônicos quanto oscilações climáticas do Quaternário podem ter atuado no processo de diversificação; enquanto os rios podem ter contribuído para a manutenção

dessas divergências, ao menos entre os clados Norte e Centro. Os grupos genéticos encontrados no presente estudo não condizem com a distribuição geográfica descrita para as subespécies descritas de *D. squamata*, isso indica a necessidade de uma revisão taxonômica. A divergência do clado Nordeste parece ser bastante antiga e essa linhagem ocorre em uma área reduzida e impactada da mata Atlântica, além de geograficamente isolada das maior área de distribuição do táxon. Isso indica que o clado Nordeste merece atenção quanto à sua conservação. A presente Tese contribuiu com o melhor entendimento da distribuição da diversidade genética das espécies aqui estudadas e da história da biodiversidade da mata Atlântica, trazendo informações sobre dois táxons com histórias filogeográficas diferentes, embora possivelmente moldadas por processos semelhantes.

## ABSTRACT

Here we present the phylogeographic history of two Passerine birds: *Dendrocincla turdina* (Dendrocolaptidae) and *Drymophila squamata* (Thamnophilidae). Both are endemic species of the Atlantic Forest lowlands and their occurrence overlaps along most of their geographic distribution, but *D. turdina* reaches higher altitudes and *D. squamata* has in a disjunct population in the northeast, where *D. turdina* does not occur. The genetic structure and the demographic history of both species was studied, and inferences about potential historical processes that could have influenced their genetic diversity pattern were made. For *D. turdina* we used seven microsatellites and sequences of one mitochondrial (mtDNA) gene and one intron. For *D. squamata* sequences of one mtDNA gene and two introns were obtained. The first chapter shows that *D. turdina* does not present population genetic structure but has evidences of population expansion. Microsatellite analyses also show absence of structure and given their high mutation rates, this indicates that there is no evidence of any recent divergences. Results based on mtDNA and intron sequences showed that the demographic expansion started during the last glacial maximum (LGM). Approximate bayesian computation (ABC) was used to test this scenario of a unique population with expansion based on nine molecular markers. The results were congruent with those from other analyses. It seems that a bottleneck was followed by an increase of population size, and at the LGM the population effective size was two orders of magnitude lower than nowadays. The second chapter presents data on *D. squamata*. Four mitochondrial lineages that are geographically separated were observed. Lineages South, Center, and North seem to have diverged in the middle of the Pleistocene and the Northeast lineage, that grouped the disjunct population, seems to have diverged around 1.1 million years ago. Clades South and North presented evidences of demographic expansions during the LGM. Both geotectonic and climatic oscillations from the Quaternary could have been involved in the diversification process; while rivers may helped to maintain the lineages differentiated, at least clades North and Center. The geographic distribution of these lineages did not match the one described for *D. squamata* subspecies. Thus, indicating that a taxonomic revision is needed. The

divergence of the Northeast lineage seems to be old and it occurs in a reduced and deforested area, besides it is geographically isolated from the main distribution of the species. This highlights that the conservation of the Northeast lineage should be granted major attention. This thesis contributed with data on two avian species with distinct phylogeographic histories that could have been shaped by similar processes that occurred in the Atlantic forest.

## INTRODUÇÃO GERAL

Entender como e quando as espécies se diversificaram e porque algumas regiões apresentam riqueza maior do que outras têm intrigado os pesquisadores desde os primeiros naturalistas como, por exemplo, Darwin, Wallace e Humboldt (ANTONELLI & SANMARTÍN, 2011). O aumento da biodiversidade com a diminuição da latitude, ou seja, dos pólos em direção ao Equador, conhecido como gradiente latitudinal de biodiversidade, é um padrão biogeográfico bem descrito, como pode ser visualizado nos mapas que ilustram esse gradiente para espécies de vertebrados terrestres (Figura 1; MANNION *et al.*, 2014) e de aves (Figura 2; JENKINS *et al.*, 2013).

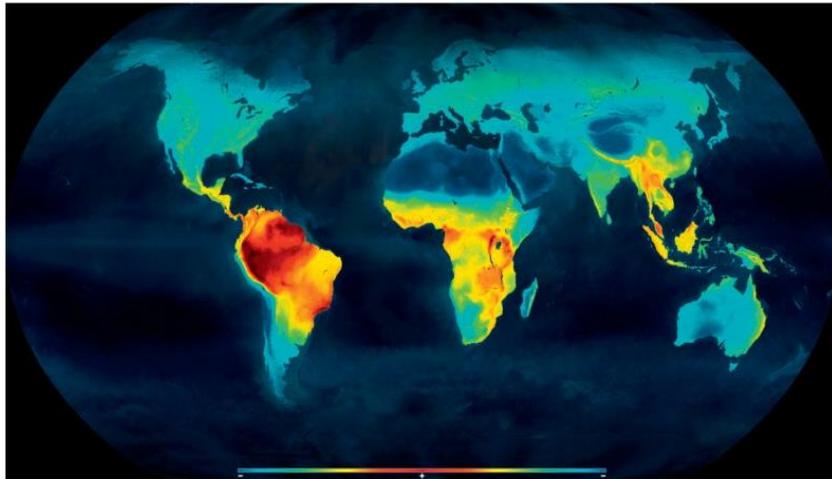


Figura 1. Mapa de gradiente latitudinal de biodiversidade de vertebrados terrestres. O gradiente do vermelho ao azul indica maior para menor riqueza de espécies (Fonte: MANNION *et al.*, 2014).

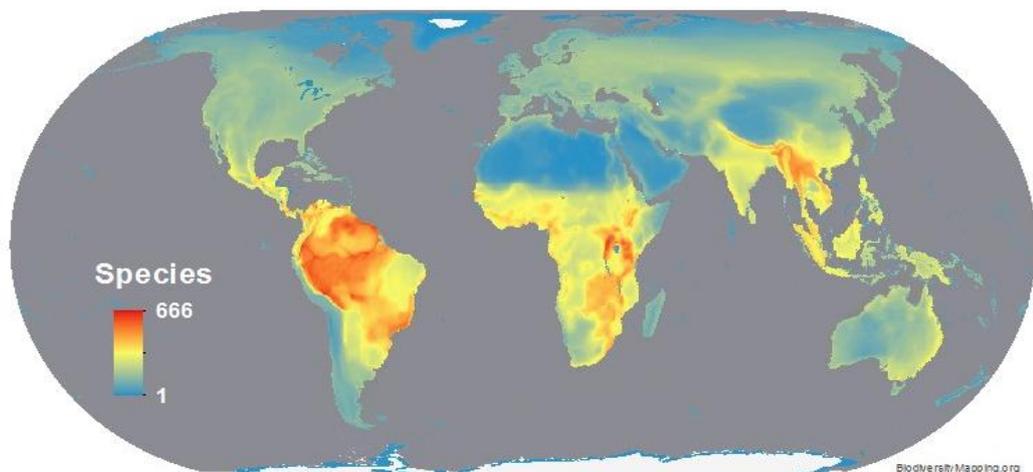


Figura 2. Mapa de gradiente latitudinal de biodiversidade de aves. O gradiente do vermelho ao azul indica maior para menor riqueza de espécies (Fonte: [www.biodiversitymapping.org](http://www.biodiversitymapping.org), baseado em JENKINS *et al.*, 2013).

Não há um consenso sobre o que gerou e mantém esse gradiente de biodiversidade, mesmo existindo algumas hipóteses que buscam explicar sua origem (KRUG *et al.*, 2009; JABLONSKI *et al.*, 2006; RULL, 2011; MANNION *et al.*, 2014). Contudo, a enorme diversidade observada na região tropical é inquestionável.

A região zoogeográfica neotropical contém tanto a região tropical quanto a região temperada e apresenta alta concentração de endemismos, como a encontrada na mata Atlântica (MYERS *et al.*, 2000), que é o bioma em foco no presente estudo. A mata Atlântica, segunda maior floresta tropical do continente sul americano, tem sua cobertura original estimada em 1.315.460 km<sup>2</sup> (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2009) com ocorrência na costa leste do Brasil desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul e estende-se pelo interior do país até o nordeste da Argentina (Misiones) e sul do Paraguai (DINERSTEIN *et al.*, 1995, FIASCHI & PIRANI, 2009). O bioma encontra-se atualmente isolado das outras formações florestais da América do Sul (Amazônia e Floresta Andina) pela diagonal seca formada pelos biomas Caatinga, Cerrado e Chaco (AB'SABER, 1977).

A área remanescente de mata Atlântica é estimada entre 11,4 a 16% da vegetação original (RIBEIRO *et al.*, 2009). O diferencial dessa estimativa em relação às de trabalhos anteriores, que estimavam de 7,5 a 8% de floresta restante (MYERS *et al.*, 2000), é a inclusão de fragmentos menores do que 100 ha e florestas secundárias em estágio intermediário de regeneração (RIBEIRO *et al.*, 2009). Apesar de aparentemente ser um valor mais elevado, infelizmente o estado geral de conservação do bioma é preocupante. A maioria dos fragmentos é menor do que 50 ha com distância média de 1,4 km entre eles (RIBEIRO *et al.*, 2009). As áreas mais extensas de mata se localizam ao sul e sudeste do Brasil (Figura 3) e apenas 9% se encontram em áreas de preservação (GUATURA, 1996; RANTA *et al.*, 1998; ZAÚ, 1998; MYERS *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2009).

Apesar de o bioma estar consideravelmente reduzido, ainda abriga uma enorme variedade de microhábitats, pois devido à sua grande extensão, abrange diferentes climas (ocorrendo acima e abaixo do trópico de Capricórnio), tipos de vegetação (formações abertas, mistas e densas, semi-decíduas e decíduas), tipos de solos e índices pluviométricos que estão relacionados à riqueza, abundância e endemismos observados (TABARELLI *et al.*, 2005). Em 2003, Silva e Casteletti

fizeram uma avaliação das subregiões biogeográficas observadas na mata Atlântica pela presença de espécies endêmicas e a dividiram em seis subregiões: Brejos nordestinos, Pernambuco, São Francisco, Diamantina, Bahia e Serra do Mar; e em duas subregiões de transição: Florestas de interior e Florestas de Pinheiros Brasileiros. Estas subregiões foram reavaliadas e refinadas por Ribeiro *et al.* (2011) utilizando 19 variáveis ambientais e altitude e resultaram em 55 subregiões biogeográficas, caracterizando a heterogeneidade do bioma.

O bioma abriga cerca de 20.000 espécies de plantas e 1.361 espécies de vertebrados, sendo 2,7 e 2,1% endêmicas, respectivamente (MYERS *et al.*, 2000). Em relação à avifauna, das 620 espécies observadas nesse bioma, 181 são endêmicas (uma das mais altas taxas de endemismo de aves em todo o mundo) e quase 68% dessas espécies são consideradas raras (GOERCK, 1997; MYERS *et al.*, 2000). Devido à sua megadiversidade, alto número de endemismos e grande perda da área original, a mata Atlântica abrange importantes áreas para conservação (JENKINS *et al.*, 2013). O modo como essa notável diversidade de espécies surgiu no bioma também é pouco conhecido.

Dentre os modelos teóricos acerca do processo de diversificação de espécies em florestas tropicais podemos citar a hipótese dos refúgios (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1970), a hipótese dos rios (WALLACE, 1876; AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992), a hipótese de distúrbio-vicariância (COLINVAUX, 1998) e a hipótese dos gradientes ecológicos (ENDLER, 1982; TERBORGH, 1985). Os três primeiros modelos consideram o isolamento geográfico das populações, que dado o devido tempo, pode promover diferenciação entre elas podendo levar à especiação. O quarto modelo considera a seleção natural como principal fator que levaria à diferenciação.

A hipótese dos refúgios foi proposta por Haffer (1969), visando explicar a especiação de aves da Amazônia, e por Vanzolini e Williams (1970), com o estudo do complexo *Anolis chrysolepis*. De acordo com essa hipótese, nos períodos de clima frio e seco durante as flutuações climáticas cíclicas do planeta, haveria a retração das áreas florestadas em pequenos fragmentos isolados uns dos outros por áreas abertas, o que causaria o isolamento das populações em “refúgios florestais”. As populações dependentes de floresta que teriam permanecido isoladas nesses

refúgios poderiam ter acumulado diferenças suficientes a ponto de resultar em especiação de alguns grupos. Assim, mesmo em períodos quentes e úmidos, quando as florestas se expandiriam e até se encontrariam, seus organismos já poderiam estar diferenciados permanecendo como entidades independentes (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1970). Essa hipótese não foi refutada em estudos filogeográficos de espécies de diversos grupos presentes na mata Atlântica, como *Xiphorhynchus fuscus* (ave; CABANNE *et al.*, 2008), *Sclerurus scansor* (ave; D'HORTA *et al.*, 2011), *Hypsiboas albomarginatus*, *H. semilineatus* e *H. faber* (anfíbios; CARNAVAL *et al.*, 2009), *Desmodus rotundus* (mamífero; MARTINS *et al.*, 2009) e *Dalbergia nigra* (planta; RIBEIRO *et al.*, 2010). Mas para mamíferos do gênero *Trinomys* os refúgios não parecem ter sido responsáveis pela diversificação do grupo, embora possam ter influenciado e modelado a distribuição atual de suas espécies e populações (LARA & PATTON, 2000). E ainda, em um estudo de paleomodelagem climática utilizando o anfíbio *Rhinella crucifer*, a hipótese do refúgio foi refutada como principal mecanismo envolvido na diversificação, sendo que as quebras filogeográficas coincidiam com algumas barreiras geográficas (THOMÉ *et al.*, 2010).

Incongruências entre os resultados obtidos para diferentes espécies evidenciam que seja pouco provável que uma única hipótese possa explicar os padrões gerais de diversificação em uma região geograficamente complexa como a mata Atlântica. Ou seja, outras hipóteses também poderiam explicar os padrões encontrados e, portanto, eles não podem ser considerados mutuamente exclusivos (LARA & PATTON, 2000; THOMÉ *et al.*, 2010). Assim, outra hipótese bastante citada é a dos rios como barreiras (WALLACE, 1876; AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992), segundo a qual a origem de rios poderia agir como barreira geográfica limitando a dispersão em determinadas espécies que, na condição de alopatria, poderiam acumular diferenças em margens opostas dos rios. Essa hipótese dos rios foi evocada para explicar o padrão geográfico do complexo *Gymnodactylus darwinii* amostrado na mata Atlântica (réptil; PELLEGRINO *et al.*, 2005).

Ao contrário desses modelos que consideram o isolamento geográfico entre as populações, existe a hipótese dos gradientes ecológicos. Ela postula que a seleção natural agiria como fator principal na diversificação de espécies que habitam

áreas contíguas com diferenças ecológicas entre elas, como ocorre com alguns grupos de aves dos Andes (SMITH *et al.*, 1997; TERBORGH, 1985).

Essas hipóteses de diversificação podem ser testadas (com diferentes níveis de precisão) pela análise da distribuição geográfica dos táxons e estudos filogenéticos ou filogeográficos (BATES *et al.*, 1998). A filogeografia foi definida por John C. Avise em 1987 como o estudo dos “...princípios e processos que determinam a distribuição geográfica da diversidade genética intraespecífica” (AVISE, 1987; AVISE, 1998). Na mata Atlântica os estudos filogeográficos têm sido realizados para diversos grupos de organismos, contribuindo na compreensão da história biogeográfica desses táxons, como aves (CABANNE *et al.*, 2008; D’HORTA *et al.*, 2011; MALDONADO-COELHO, 2012; AMARAL *et al.*, 2013), anfíbios (CARNAVAL *et al.*, 2009; FITZPATRICK *et al.*, 2009; BRUNES *et al.*, 2010; THOMÉ *et al.*, 2010; AMARO *et al.*, 2012; BELL *et al.*, 2012), répteis (PELLEGRINO *et al.*, 2005; GRAZZIOTIN *et al.*, 2006), mamíferos (HARRIS *et al.*, 2005; MORAES-BARROS *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2009), insetos (BATALHA FILHO *et al.*, 2010) e plantas (PINHEIRO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2010).

Esses trabalhos apresentam alguns resultados comparáveis, como por exemplo, nos táxons em que se observa estruturação genética populacional, existe certa congruência na sua distribuição geográfica, com três quebras principais ao longo da mata Atlântica: na região do Rio São Francisco, na região do Rio Doce e na região próxima ao Rio Paraíba do Sul. Embora haja alguma congruência espacial, nem sempre há concordância temporal dessas quebras filogeográficas, as quais foram datadas em alguns casos para o Pleistoceno e, em outros, no Plioceno. Por outro lado, algumas espécies de aves da mata Atlântica não apresentaram estrutura geográfica, mas possuem sinais de expansão demográfica (CABANNE *et al.*, 2012; BATALHA FILHO *et al.*, 2012).

Nos estudos filogeográficos é importante considerar que as populações naturais podem possuir histórias complexas, e uma metodologia que permite avaliar as forças que podem ter influenciado a variabilidade genética dentro e entre populações é a simulação computacional de diferentes cenários evolutivos com base em um conjunto de dados moleculares (CSILLÉRY *et al.*, 2010). Em 2002, Beaumont *et al.* propuseram um método para realizar inferência estatística

Bayesiana chamado de ABC (*Approximate Bayesian Computation*), que utiliza estatísticas sumárias (valores calculados a partir dos dados para representar o máximo de informação na sua forma mais simples) e simulações, possibilitando inferir qual(is) modelo(s) simulado(s) melhor explicaria(m) os dados (HEY & NIELSEN, 2007; CSILLÉRY *et al.*, 2010; BEAUMONT *et al.*, 2010).

Inferências filogeográficas estatísticas baseadas em testes de modelos têm sido bastante utilizadas recentemente e permitiram muitos avanços nos estudos filogeográficos. Por exemplo, no início do desenvolvimento da filogeografia, os estudos eram basicamente descritivos, ou seja, a história demográfica de um táxon era inferida a partir da interpretação direta de uma genealogia de um único loco (HICKERSON *et al.*, 2010). Atualmente, a filogeografia está se transformando em uma disciplina mais integrativa, deixando de ser apenas uma ponte entre a filogenia e a genética de populações (HICKERSON *et al.*, 2010). A área passou a incluir o uso de modelos coalescentes para estimar parâmetros, a testar modelos *a priori*, estimando histórias demográficas espacialmente explícitas e a testar se há congruências espaciais e/ou temporais entre os táxons com distribuições geográficas comparáveis (HICKERSON *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o presente trabalho utilizou a filogeografia estatística para analisar a história evolutiva de duas espécies endêmicas de passeriformes da mata Atlântica. *Dendrocincla turdina* (Dendrocolaptidae) que ocorre na costa leste do Brasil desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, estendendo a distribuição para o interior do Brasil até o nordeste da Argentina (Misiones) e leste do Paraguai (SICK, 1997; MARANTZ *et al.*, 2003) e seu estudo filogeográfico é apresentado no Capítulo 1. Já *Drymophila squamata* (Thamnophilidae) ocorre desde a Bahia até o nordeste do Rio Grande do Sul, incluindo uma população disjunta em Alagoas (SICK, 1997; ZIMMER & ISLER, 2003) e seu estudo é apresentado no Capítulo 2. As duas espécies ocorrem em áreas de baixada da mata Atlântica, sendo que a distribuição mais restrita de *D. squamata* se sobrepõe à de *D. turdina*, exceto em Alagoas, e *D. squamata* é observada apenas até 900 m de altitude, enquanto *D. turdina* ocorre até 1250 m acima do nível do mar (SICK, 1997; MARANTZ *et al.*, 2003; ZIMMER; ISLER, 2003). Comparações dos resultados das duas espécies são abordadas no capítulo final (Discussão geral e conclusões) da presente Tese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER AN (1977) Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* 52: 1-22.

AMARAL FR, ALBERS PK, EDWARDS SV, MIYAKI CY (2013) Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic forest antbirds (*Myrmeciza*). *Molecular ecology* 22: 3996-4013.

AMARO RC, RODRIGUES MT, YONENAGA-YASSUDA Y, CARNAVAL AC (2012) Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 880-888.

ANTONELLI A, SANMARTÍN I (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60: 403-414.

AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA, SAUNDERS NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

AVISE JC, WALKER D, JOHNS GC (1998) Speciation duration and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 265: 1707-1712.

AYRES JMC, CLUTTON-BROCK TH (1992) River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist* 140: 531-537.

BATALHA FILHO H, CABANNE GS, MIYAKI CY (2012) Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892-902.

BATALHA FILHO H, WALDSCHMIDT AM, CAMPOS LAO, TAVARES MG, FERNANDES-SALOMÃO TM (2010) Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 534-547.

BATES JM, HACKETT SJ, CRACRAFT J (1998) Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *Journal of Biogeography* 25: 783-793.

BEAUMONT MA (2010) Approximate bayesian computation in evolution and ecology. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 41: 379-406.

BEAUMONT MA, ZHANG W, BALDING DJ (2002) Approximate bayesian computation in population genetics. *Genetics* 162: 2025-2035.

- BELL RC, BRASILEIRO CA, HADDAD CFB, ZAMUDIO KR (2012) Evolutionary history of *Scinax* treefrogs on land-bridge islands in south-eastern Brazil. *Journal of Biogeography* 39: 1733–1742.
- BRUNES TO, SEQUEIRA F, HADDAD CFB, ALEXANDRINO J (2010) Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: genetic diversification in the Brazilian Atlantic forest and the origin of a polyploidy species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 1120-1133.
- CABANNE GS, D'HORTA FM, SARI EHR, SANTOS FR, MIYAKI CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760–773.
- CABANNE GS, SARI HER, MEYER D, SANTOS FR, MIYAKI CY (2012) Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic greenish schiffornis *Schiffornis virescens*. *Journal of Ornithology* 154: 371-384.
- CARNAVAL AC, HICKERSON MJ, HADDAD CFB, RODRIGUES MT, MORITZ C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785-789.
- COLINVAUX PA (1998) A new vicariance model for Amazonian endemics. *Global Ecology and Biogeography Letters* 7: 95: 96.
- CSILLÉRY K, BLUM AGB, GAGGIOTTI OE, FRANÇOIS O (2010) Approximate bayesian computation (ABC) in practice. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 410-418.
- D'HORTA FM, CABANNE GS, MEYER D, MIYAKI CY (2011) The genetic effects of late quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1923-1935.
- DINERSTEIN E, OLSON, DM, GRAHAM PJ, WEBSTER AL, PRIMM, SA, BOOKBINDER MP, LEDEC G (1995) A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean. The World Bank, Washington D.C.
- ENDLER J.A. (1982) Pleistocene forest refuges: fact or fancy? In: Prance GT (ed) *Biological Diversification in the Tropics*. Columbia University Press, New York, pp. 641 – 657
- FIASCHI P, PIRANI JR (2009) Review of plant biogeographic studies in Brazil. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 477-496.
- FITZPATRICK SW, BRASILEIRO CA, HADDAD CFB, ZAMUDIO KR (2009) Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology* 18: 2877-2896.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (2009) Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2005-2008, São Paulo.

GOERCK JM (1997) Patterns of rarity in the birds of the Atlantic forest of Brazil. *Conservation Biology* 11: 112-118.

GRAZZIOTIN FG, MONZEL M, ECHEVERRIGARAY S, BONATTO SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Ecology* 15: 3969-3982.

GUATURA IN, CORRÊA F, COSTA JPO, AZEVEDO PUE (1996) A questão fundiária: roteiro para a solução dos problemas fundiários nas áreas protegidas da Mata Atlântica. Roteiro para a conservação de sua biodiversidade. Série Cadernos da Reserva da Biosfera, Caderno nº 1, 47 p.

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

HARRIS EE, GIFALLI-IUGHETTI C, BRAGA ZH, KOIFFMANN CP (2005) Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler monkey (*Alouatta guariba*) from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. *Neotropical Primates* 13: 16-21.

HEY J, NIELSEN R (2007) Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 2785-2790.

HICKERSON MJ, CARSTENS BC, CAVENDER-BARES J, CRANDALL KA, GRAHAM CH, JOHNSON JB, RISSLER L, VICTORIANO PF, YODER AD (2010) Phylogeography's past, present, future: 10 years after *Avise*, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291-301.

JABLONSKI D, ROY D, VALENTINE JW (2006) Out of the tropics: evolutionary dynamics of the latitudinal diversity gradient. *Science* 314: 102-106.

JENKINS CN, PIMM SL, JOPPA LN (2013) Global patterns of terrestrial vertebrate diversity and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110: 2602-2610.

KRUG AZ, JABLONSKI D, VALENTINE JW, ROY K (2009) Generation of Earth's first-order biodiversity pattern. *Astrobiology* 9: 113-124.

LARA MC, PATTON JL (2000) Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimididae) in the Atlantic forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society* 130: 661-686.

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.

MANNION PD, UPCHURCH P, BENSON RBJ, GOSWAMI A (2014) The latitudinal biodiversity gradient through deep time. *Trends in Ecology and Evolution* 29: 42-50.

MARANTZ C, ALEIXO A, BEVIER LR, PATTEN MA (2003) Family *Dendrocolaptidae* (Woodcreepers). In: del Hoyo J, Elliott A, Christie D (eds). *Handbook of the Birds of*

the World, volume 8, Broadbills to Tapaculos. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 358-447.

MARTINS FM, TEMPLETON AR, PAVAN ACO, KOHLBACH BC, MORGANTE JS (2009) Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 9: 294-307.

MORAES-BARROS N, SILVA JAB, MIYAKI CY, MORGANTE JS (2006) Comparative phylogeography of the Atlantic forest endemic sloth (*Bradypus torquatus*) and the widespread three-toed sloth (*Bradypus variegatus*) (Bradypodidae, Xenarthra). *Genetica* 126: 189-198.

MYERS N, MITTERMEIER RA, MITTERMEIER CG, FONSECA GAB, KENT J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

PELLEGRINO KCM, RODRIGUES MT, WAITE AN, MORANDO M, YASSUDA YY, SITES JR JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13-26.

PINHEIRO F, BARROS F, PALMA-SILVA C, FAY MF, LEXER C, COZZOLINO S (2011) Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography* 38: 1923-1935.

RANTA P, BLOM T, NIEMELÄ J, JOENSUU E, SIITONEN M (1998) The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. *Biodiversity and Conservation* 7: 385-403.

RIBEIRO MC, MARTENSEN AC, METZGER JP, TABARELLI M, SCARANO F, FORTIN MJ (2011) The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In Zachos FE, Habel JC (eds.) *Biodiversity Hotspots*. Springer, Berlin, pp. 405-434.

RIBEIRO MC, METZGER JP, MARTENSEN AC, PONZONI FJ, HIROTA MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.

RIBEIRO RA, LEMOS-FILHO JP, RAMOS ACS, LOVATO MB (2010) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46–57.

RULL V (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 508-513.

SICK H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

SILVA JMC, CASTELETTI CH (2003) Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (eds). *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook*. Island Press, Washington, pp. 43–59.

SMITH TB, WAYNE RK, GIRMAN DJ, BRUFORD MW (1997) A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* 276: 1855–1857.

TABARELLI M, PINTO LP, SILVA JMC, HIROTA M, BEDÊ L (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. *Conservation Biology* 19: 695-700.

TERBORGH J (1985) The role of ecotones in the distribution of Andean birds. *Ecology* 66: 1237-1246.

THOMÉ MTC, ZAMUDIO KR, GIOVANELLI JGR, HADDAD CFB, BALDISSERA JR. FA, ALEXANDRINO J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-pliocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018-1031.

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

WALLACE AR (1876) *The Geographic Distribution of Animals*, volume 1. Macmillan, London.

ZAÚ AS (1998) Fragmentação da Mata Atlântica: aspectos teóricos. *Floresta e Ambiente* 5: 160-170.

ZIMMER KJ, ISLER ML (2003) Family *Thamnophilidae* (typical antbirds). In: del Hoyo J, Elliott A, Christie D (Eds). *Handbook of the Birds of the World*, volume 8, Broadbills to Tapaculos. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 448-681.



## OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Caracterizar a estrutura genética populacional e filogeográfica de *Dendrocincla turdina* na sua área de ocorrência, utilizando dados de sequências mitocondriais e dados nucleares (microsatélites e sequências de íntron) e teste de modelo usando ABC;
- Analisar a estrutura filogeográfica de *Drymophila squamata* ao longo da mata Atlântica utilizando dados de sequências mitocondriais e nucleares e testar cenários evolutivos para a espécie;
- Comparar a história evolutiva de *D. turdina* e *D. squamata*, espécies de baixada na mata Atlântica.



## **CAPÍTULO 1**

Estrutura populacional e filogeografia de *Dendrocincla turdina*



## Resumo

Investigamos a estrutura populacional e a história filogeográfica de *Dendrocincla turdina* (Dendrocolaptidae), um passeriforme endêmico da mata Atlântica. Foram analisadas 141 amostras utilizando nove marcadores moleculares: um mitocondrial (ND2 com 1011pb), um íntron nuclear (FIB7 com 822pb) e sete microssatélites (SSRs) polimórficos espécie-específicos. Análises baseadas nos SSRs não indicaram presença de estrutura populacional, mas evidenciaram a ocorrência de gargalo populacional recente. A ausência de estrutura foi corroborada pelas redes de haplótipos construídas baseadas no ND2 e no FIB7 separadamente, com haplótipos centrais com alta frequência que ocorrem ao longo de toda distribuição do táxon e haplótipos periféricos de baixa frequência com um ou poucos passos mutacionais separando-os. Esse padrão de rede de haplótipos indicou expansão populacional. Tal expansão também foi evidenciada na análise por *extended bayesian skyline plot* baseado nos dados de ND2 e FIB7 e parece ter se iniciado a partir do último máximo glacial (UMG). Considerando essas evidências de uma população única que teria sofrido um gargalo seguido de expansão populacional, criamos um modelo utilizando computação bayesiana aproximada e estimamos os parâmetros desse cenário. Os resultados dessas análises suportaram os indícios de gargalo com aumento da população até os dias atuais, sendo que há aproximadamente 21 mil anos atrás (no UMG) o tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) parece ter sido duas ordens de grandeza menor do que o atual. Esse padrão de ausência de estruturação em passeriformes só foi publicado para outras três espécies na mata Atlântica (*Basileuterus leucoblepharus*, *Schiffornis virescens* e *Myrmeciza squamosa*), contrastando com todas as demais publicações até o momento. Isso sugere que a história evolutiva do bioma é bastante complexa, com táxons respondendo de formas distintas às mudanças pretéritas na mata Atlântica.

## Abstract

Here we investigated the population structure and phylogeographic history of *Dendrocincla turdina* (Dendrocolaptidae) an Atlantic forest endemic passerine. Nine molecular markers - one mitochondrial (ND2, 1011bp), one nuclear intron (FIB7, 822bp), and seven polymorphic species-specific microsatellites (SSRs) – were analyzed from 141 individuals. SSRs data did not show any population structure, but a recent bottleneck was detected. The haplotype networks based on ND2 and FIB7 corroborated the absence of structure, with most frequent and central haplotypes found along all the taxon's range and its star-like shape was a sign of population expansion. An extended bayesian skyline plot analysis based on ND2 and FIB7 suggested that the expansion started in the last glacial maximum (LGM). These results suggested the presence of only one population that suffered a bottleneck followed by a demographic expansion. This scenario was used to create a model that was tested with approximate bayesian computation. The results supported the presence of a past bottleneck followed by population expansion until nowadays, and around 21k year ago (at LGM) the population effective number ( $N_e$ ) was estimated as being two orders of magnitude lower than today. This pattern of no population structure along the Atlantic forest was reported for only three other passerines (*Basileuterus leucoblepharus*, *Schiffornis virescens* and *Myrmeciza squamosa*) and is in contrast with all other data published for Atlantic forest passerine birds. This suggests that the evolutionary history from this biome is quite complex, once taxa seem to have responded differently to past changes of the Atlantic forest.

## 1.1 Introdução

A família Dendrocolaptidae, cujos membros são conhecidos como arapaçus, é composta por 52 espécies distribuídas pela região neotropical, e possui adaptações para escalar troncos de árvores (retrizes com raques rígidas) e vasculhá-los à procura de alimento (bicos compridos e estreitos; CLENCH, 1995; MOYLE *et al.*, 2009). Dessas espécies, seis pertencem ao gênero *Dendrocincla*: *D. turdina*, *D. fuliginosa*, *D. tyrannina*, *D. anabatina*, *D. merula* e *D. homochroa* (MARANTZ *et al.* 2003a).

Weir e Price (2011) investigaram o processo de diversificação do gênero *Dendrocincla* e propuseram que o soerguimento dos Andes possivelmente teve um papel muito importante promovendo a diversificação tanto por vicariância no início quanto por dispersão posterior. Já para os táxons da mata Atlântica (*D. turdina* e *D. fuliginosa taunayi*) esses autores propuseram que um único evento de colonização a partir da Amazônia tenha sido responsável pela presença do gênero no bioma, no qual teria ocorrido posterior diversificação *in situ*. Ainda de acordo com esses autores, foi feita a sugestão de inclusão da subespécie *D. fuliginosa taunayi*, que ocorre no norte da mata Atlântica, como táxon irmão de *D. turdina* e não proximamente relacionado ao complexo *D. fuliginosa* como era considerada até então.

*D. turdina* também já foi considerada como subespécie do complexo *D. fuliginosa*, mas hoje já é reconhecida como espécie plena pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) e pelo *South American Classification Committee* (SACC). É um passeriforme endêmico da mata Atlântica, com ocorrência descrita para a costa leste do Brasil desde a Bahia até o norte do Rio Grande do Sul, se estendendo pelo interior do país até o oeste do Paraná e Santa Catarina, pelo leste e centro do Paraguai e pelo nordeste da Argentina (em Misiones e nordeste de Corrientes; MARANTZ *et al.*, 2003a).

Popularmente conhecida como arapaçu-liso, *D. turdina* possui plumagem castanho-oliváceo relativamente uniforme, garganta amarelo claro e retrizes levemente avermelhadas, é um passarinho de porte médio com cerca de 19 a 21 cm e peso entre 29 a 45 g, possui bico curto e reto (Figura 1; MARANTZ *et al.*,

2003a,b). Alimenta-se predominantemente de insetos e é observada com frequência em bandos mistos e seguindo formigas de correição (MARANTZ *et al.*, 2003a; GHIZONI-JR & AZEVEDO, 2005).



Figura 1. Desenho ilustrativo de um espécime de *Dendrocincla turdina* (MARANTZ *et al.*, 2003b).

Habita o sub-bosque da mata Atlântica, desde o nível do mar até cerca de 1250 m de altitude, em áreas com florestas primárias, secundárias em estágio avançado de crescimento e algumas vezes bordas (MARANTZ *et al.*, 2003a). Tem sido descrita na literatura como uma espécie vulnerável à fragmentação ambiental, não tendo sido observada em locais com intenso efeito de borda e sub-bosque denso, porém é comum em áreas de grande extensão com estratificação vertical bem definida e sub-bosque espaçado (POLETTI *et al.*, 2004).

Em acordo com a sensibilidade a hábitat degradado, temos sua extinção local em Viçosa, localizada no sudeste de Minas Gerais (RIBON *et al.*, 2003); a classificação como espécie criticamente em perigo de extinção no Rio Grande do Sul desde 2002 e recentemente confirmada como ameaçada pela publicação no Diário Oficial de 09/09/2014 com base em um levantamento feito em 2013 pela Fundação Zoobotânica desse estado (MARQUES *et al.*, 2002); a ausência em fragmentos pequenos estudados no norte do Paraná, sendo encontrada apenas nos maiores do que 180 ha (ANJOS, 2001; ANJOS, 2006); e relatada como a espécie de

arapaçu com requerimentos ecológicos mais específicos dentre cinco espécies estudadas da mesma família, tendo maior ocorrência em locais mais conservados e de maior extensão (POLETTO *et al.*, 2004).

As características ecológicas de *D. turdina*, bem como sua distribuição geográfica a tornam um bom modelo para um estudo filogeográfico de um organismo da mata Atlântica. A espécie ocorre em boa parte da mata Atlântica, inclusive em ambos os lados de algumas barreiras que tem sido descritas na literatura como barreiras filogeográficas, tais como os rios Doce e Jequitinhonha. Assim, analisando a distribuição da variabilidade genética de *D. turdina* podemos avaliar se essas barreiras foram importantes na história do táxon.

Para analisar a assinatura genética que eventos demográficos passados deixaram nessa espécie foram utilizadas sequências de regiões do genoma nuclear e do genoma mitocondrial dos indivíduos. Baseando-nos nas informações inferidas com os dados produzidos testamos um modelo de história da espécie utilizando a metodologia de aproximação bayesiana computacional (ABC).

Em face do exposto nesse capítulo e na Introdução, nossos objetivos foram: a) caracterizar a estrutura genética populacional de *D. turdina* ao longo da mata Atlântica; b) inferir possíveis processos que poderiam ter modelado a estrutura observada, e c) simular um cenário evolutivo a partir das evidências obtidas com os marcadores utilizados.

## **1.2 Material e métodos**

Foram analisados 141 indivíduos de 41 localidades amostradas ao longo da distribuição da espécie (Figura 2). Parte das amostras foi coletada durante o presente trabalho, parte já estava depositada na coleção do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo onde foi desenvolvido esse estudo e parte foi doada por diversos museus/coleções de universidades (Tabela 1).

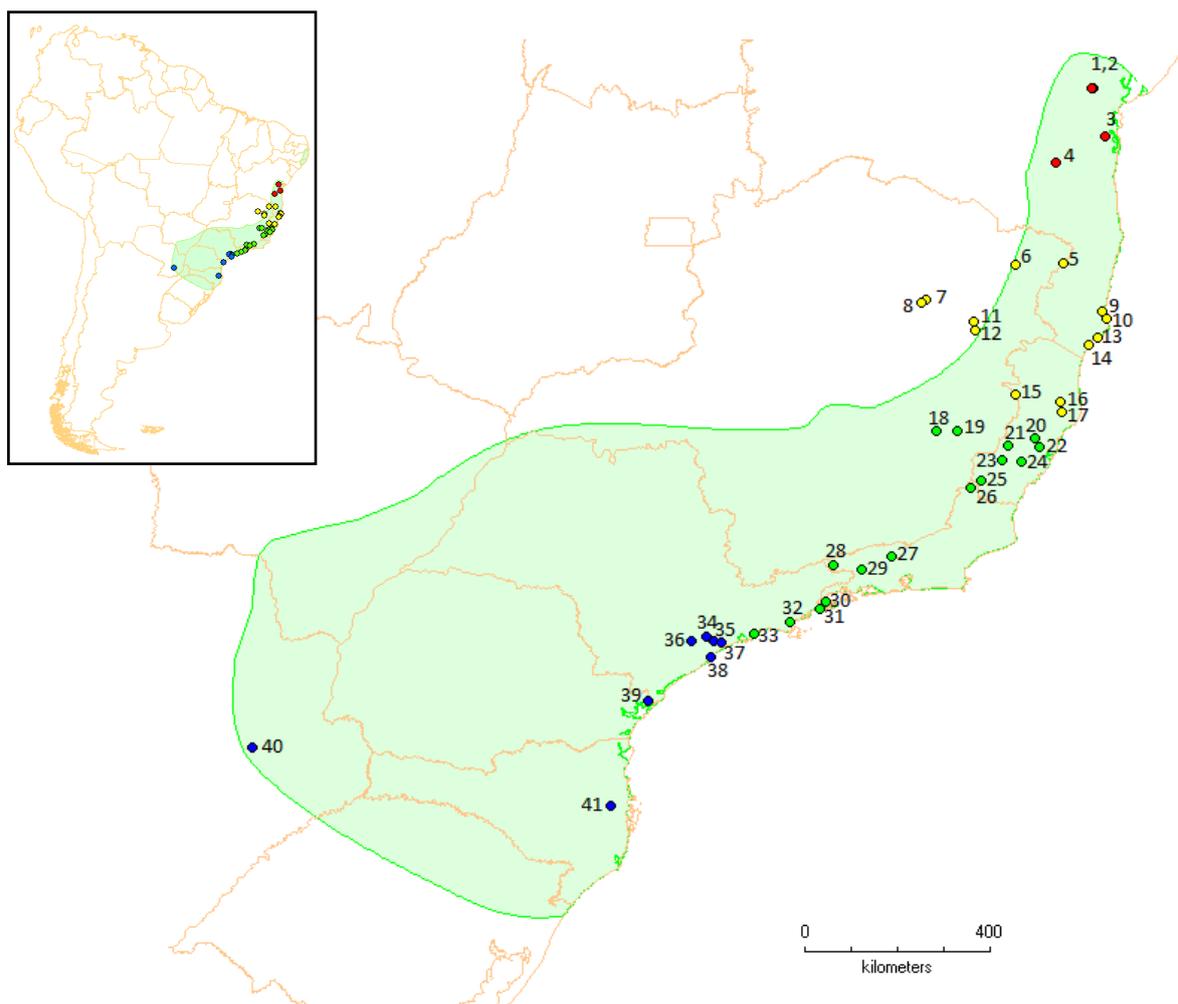


Figura 2. Distribuição geográfica de *Dendrocincla turdina* em verde (INFONATURA, 2007). Pontos coloridos indicam as localidades amostradas (ver Tabela 1). As cores (vermelho, amarelo, verde e azul; do norte ao sul) agrupam localidades que poderiam representar possíveis grupos filogeográficos segundo a literatura.

Tabela 1. Amostras de *Dendrocincla turdina*. Número da localidade no mapa da Figura 2 (#Mapa); localização geográfica (Localidade, Estado, Latitude, Longitude); identificação na coleção (Amostra).

#Mapa	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra
1	Santa Terezinha	BA	-12.8603	-39.4738	DA762 <sup>4</sup> , DA765 <sup>4</sup>
2	Elísio Medrado	BA	-12.8704	-39.4781	14961 <sup>1</sup> , 14962 <sup>1</sup> , 14992 <sup>1</sup>
3	Igrapiúna	BA	-13.8414	-39.2411	14785 <sup>1</sup> , 14883 <sup>1</sup> , 14884 <sup>1</sup> , 14921 <sup>1</sup> , 14922 <sup>1</sup>
4	Boa Nova	BA	-14.3625	-40.2075	13402 <sup>1</sup>
5	Santa Maria do Salto	MG	-16.4121	-40.0555	15465 <sup>1</sup> , 15509 <sup>1</sup> , 15521 <sup>1</sup> , 15527 <sup>1</sup>
6	Jequitinhonha	MG	-16.4333	-41.0000	B0920 <sup>2</sup> , B0921 <sup>2</sup> , B0922 <sup>2</sup> , B0923 <sup>2</sup>
7	Leme do Prado	MG	-17.1333	-42.7667	B2157 <sup>2</sup> , B2158 <sup>2</sup> , B2159 <sup>2</sup> , B2160 <sup>2</sup> , B2701 <sup>2</sup> , B2718 <sup>2</sup>
8	Turmalina	MG	-17.2000	-42.8500	B2693 <sup>2</sup>

Continuação da Tabela 1.

#Mapa	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra
9	Prado	BA	-17.3833	-39.2833	B2442 <sup>2</sup>
10	Alcobaça	BA	-17.5194	-39.1956	11804 <sup>1</sup> , 11814 <sup>1</sup> , 11816 <sup>1</sup> , 11817 <sup>1</sup> , 11854 <sup>1</sup> , B2540 <sup>2</sup> , 11895 <sup>1</sup>
11	Ladainha	MG	-17.5721	-41.8019	15399 <sup>1</sup> , 15403 <sup>1</sup> , 15409 <sup>1</sup> , UFV1760 <sup>5</sup>
12	Poté	MG	-17.7383	-41.7866	15420 <sup>1</sup> , 15421 <sup>1</sup>
13	Nova Viçosa	BA	-17.8919	-39.3719	11843 <sup>1</sup> , 15871 <sup>1</sup> , 15872 <sup>1</sup>
14	Mucuri	BA	-18.0555	-39.5497	15853 <sup>1</sup> , 15859 <sup>1</sup>
15	Alto Rio Novo	ES	-19.0333	-40.9833	B2735 <sup>2</sup>
16	Sooretama	ES	-19.1969	-40.0978	11863 <sup>1</sup> , 15807 <sup>1</sup> , B2511 <sup>2</sup> , B2521 <sup>2</sup> , 11864 <sup>1</sup> , 11868 <sup>1</sup> , 11892 <sup>1</sup> , 11898 <sup>1</sup>
17	Linhares	ES	-19.3909	-40.0715	15926 <sup>1</sup> , 15929 <sup>1</sup>
18	Marliéria	MG	-19.7667	-42.5500	B1005 <sup>2</sup>
19	Caratinga	MG	-19.7833	-42.1333	B0641 <sup>2</sup> , B0915 <sup>2</sup> , B0917 <sup>2</sup> , B0919 <sup>2</sup>
20	Santa Teresa	ES	-19.9356	-40.6003	B2288 <sup>2</sup> , MNA4673 <sup>6</sup> , MNA4685 <sup>6</sup> , MNA4691 <sup>6</sup> , MNA4775 <sup>6</sup>
21	Afonso Claudio	ES	-20.0742	-41.1239	11746 <sup>1</sup>
22	Santa Leopoldina	ES	-20.1025	-40.5292	11772 <sup>1</sup> , 11773 <sup>1</sup>
23	Conceição do Castelo	ES	-20.3683	-41.2439	11776 <sup>1</sup> , 11785 <sup>1</sup>
24	Domingos Martins	ES	-20.3833	-40.8833	B2728 <sup>2</sup> , MNT2584 <sup>6</sup> , MNT2613 <sup>6</sup> , MNT2633 <sup>6</sup> ,
25	Guaçuí	ES	-20.7762	-41.6759	15869 <sup>1</sup>
26	Varre-Sai	RJ	-20.9308	-41.8689	RBO301 <sup>3</sup> , RBO350 <sup>3</sup> , RBO353 <sup>3</sup> , RBO383 <sup>3</sup> , RBO385 <sup>3</sup>
27	Cambuci	RJ	-21.5753	-41.9108	RBO581 <sup>3</sup> , RBO646 <sup>3</sup> , RBO648 <sup>3</sup> , RBO653 <sup>3</sup> , RBO655 <sup>3</sup> , RBO665 <sup>3</sup> , RBO696 <sup>3</sup> , RBO697 <sup>3</sup>
28	Mendes	RJ	-22.3200	-43.4400	RBO797 <sup>3</sup> , RBO826 <sup>3</sup>
29	Itatiaia	RJ	-22.4961	-44.5633	1718 <sup>1</sup> , 1725 <sup>1</sup> , 1726 <sup>1</sup> , 1727 <sup>1</sup> , 1732 <sup>1</sup>
30	Mangaratiba	RJ	-22.5700	-44.0200	RBO020 <sup>3</sup> , RBO072 <sup>3</sup> , RBO076 <sup>3</sup> , RBO077 <sup>3</sup> , RBO116 <sup>3</sup> , RBO117 <sup>3</sup>
31	Parati	RJ	-23.2178	-44.7131	dhf117 <sup>6</sup>
32	Picinguaba	SP	-23.3775	-44.8397	1695 <sup>1</sup> , 1696 <sup>1</sup> , 1697 <sup>1</sup> , 1698 <sup>1</sup> , h49055 <sup>7</sup>
33	Caraguatatuba	SP	-23.6203	-45.4131	1690 <sup>1</sup> , 1691 <sup>1</sup> , 1692 <sup>1</sup> , 1693 <sup>1</sup> , 1694 <sup>1</sup>
34	Bertioga	SP	-23.8544	-46.1386	10321 <sup>1</sup>
35	Juquitiba	SP	-23.9326	-47.0669	2392 <sup>1</sup> , 2417 <sup>1</sup> , 15234 <sup>1</sup> , 15240 <sup>1</sup> , 15242 <sup>1</sup>
36	Peruíbe	SP	-24.0140	-47.3605	h511027, h511037, h511047, h511057, h511067

Continuação da Tabela 1.

#Mapa	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra
37	Itanhaém	SP	-24.0399	-46.7766	15082 <sup>1</sup> , 15101 <sup>1</sup> , 15102 <sup>1</sup> , 15103 <sup>1</sup> , 15104 <sup>1</sup> , 15105 <sup>1</sup> , 15106 <sup>1</sup> , 15118 <sup>1</sup>
38	Tapiraí	SP	-24.3200	-46.9983	12240 <sup>1</sup> , 12246 <sup>1</sup>
39	Guaraqueçaba	PR	-25.2031	-48.2322	14649 <sup>1</sup> , 14665 <sup>1</sup> , 14708 <sup>1</sup> , 14709 <sup>1</sup>
40	Caazapá (Paraguay)		-26.1666	-56.0000	977662 <sup>8</sup>
41	Nova Trento	SC	-27.3254	-48.9622	14628 <sup>1</sup> , 14646 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>LGEMA: Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves da Universidade de São Paulo; <sup>2</sup>UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>3</sup>UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Ornitologia e Bioacústica; <sup>4</sup>MZUEFS: Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana; <sup>5</sup>MZUFV: Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa; <sup>6</sup>MNRJ: Museu Nacional da Universidade do Rio de Janeiro; <sup>7</sup>UFSCar: Universidade Federal de São Carlos; <sup>8</sup>NRM: *Natural History Museum of Denmark*.

### *Extração de DNA*

A extração de DNA foi realizada de acordo com Bruford *et al.* (1992). Cada amostra de sangue ou músculo foi digerida por 4 h a 55°C em uma solução contendo 300 µl de TNE (50 mM Tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de EDTA), 30 µl de Tris-HCl 1M (pH 7,5), 10 µl de SDS 20%, 20 µl de proteinase K (20 mg/ml). Após a digestão acrescentamos 400 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), o material foi misturado e centrifugado por 10 minutos a 12 krpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 800 µl de etanol absoluto. A seguir foi realizada uma lavagem com 300 µl de etanol 70% e foi centrifugado por 10 minutos a 12 krpm. O precipitado foi seco em uma bomba a vácuo por 30 minutos e ressuspendido em 100 µl de TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA).

### *Obtenção e análise de genótipos*

Foram genotipados 133 indivíduos para oito microssatélites espécie-específicos (Dft01, Dft02, Dft06, Dft07, Dft09, Dft10, Dft11, Dft16; FAZZA & GALETTI, 2011). Os microssatélites foram amplificados de acordo com Schuelke (2000): volume final de 10µl de reação contendo 0,8 pmol de *primer* M13 com fluorescência FAM, HEX ou TET, 0,2 pmol de *primer forward* com uma extensão idêntica ao *primer* fluorescente, 0,8 pmol do *primer reverse* sem extensão, tampão 1X contendo 0,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase

(GE Healthcare) e 10 ng de DNA. A condição de amplificação foi: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos na temperatura específica de hibridação dos *primers* e 45 segundos a 72°C, 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C e 45 segundos a 72°C, seguidos por 10 minutos de extensão final a 72°C.

Os produtos de PCR foram verificados quanto a seu tamanho e quantidade em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium) e comparados a marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare). Esses produtos foram diluídos em água milliQ na proporção de 1:15. A seguir foram adicionados 0,08 µl do marcador GeneScan™-350 ROX™ (Applied Biosystems) e 7,92 µl de formamida HiDi™ (Applied Biosystems). As genotipagens foram realizadas no sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP, São Paulo). Os genótipos foram analisados no programa GeneMarker v.1.95 (Soft Genetics, State College, PA).

O desequilíbrio de ligação entre os locos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram analisados no programa Genepop 4.0.10 (RAYMOND & ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008) e os valores de *p* foram corrigidos pelo método sequencial de Bonferroni, o qual corrige a probabilidade de erros de Tipo I de análises múltiplas mantendo o valor de  $\alpha=0,05$  sem aumentar a probabilidade de erro do Tipo II (RICE, 1989). O número de alelos, heterozigosidades observada e esperada e o coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foram calculados no programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001).

O programa Bottleneck (PIRY *et al.*, 1999) foi utilizado para verificar sinal de existência de eventos demográficos recentes. Esse teste de gargalo populacional assume que após uma redução recente no tamanho efetivo há uma diminuição do número de alelos mais rápida do que a diminuição da diversidade genética (LUIKART *et al.*, 1998). Foi realizado o teste de Wilcoxon, que pode ser utilizado para menos de 20 locos com alto poder estatístico. Seguindo recomendação de PIRY *et al.* (1999) foi adotado o modelo de mutação *two phase* (TPM) que considera os modelos de alelos infinitos (IAM) e *stepwise mutation* (SMM), pois o IAM é o modelo mais usado para alozimas e SMM para microssatélites com repetições

dinucleotídicas. Ainda seguindo a recomendação desses autores, foi adotada probabilidade de 5% de mutações terem ocorrido por IAM e de 95% por SMM.

O programa Structure 2.3.1 (PRITCHARD *et al.*, 2000) foi usado para avaliar a estrutura populacional, assumindo modelo que permite fluxo gênico entre as populações (*admixture model*). Foram realizadas vinte corridas independentes para valores de K (número de grupos) variando de 2 a 5, usando 5 milhões de gerações e 10% de *burn-in*. O melhor K foi selecionado utilizando o método de Evanno (EVANNO *et al.*, 2005) implementado no Structure Harvester (EARL & VANHOLDT, 2012). Cada conjunto de corridas por K foi resumido utilizando o CLUMPP (JAKOBSSON & ROSENBERG, 2007) e os resultados foram plotados usando a plataforma R.

#### *Obtenção e análise das sequências*

Foram sequenciados o gene mitocondrial subunidade 2 da NADH desidrogenase (ND2) e o íntron 7 do gene nuclear  $\beta$ -fibrinogênio (FIB7). O ND2 foi amplificado com os *primers* GLN5146L (5'-GAACCTACACARAAGRGATCA-3'; Pereira, comunicação pessoal) e H6313TRP (SORENSEN *et al.*, 1999). Para algumas amostras foi necessário utilizar os *primers* internos H5766 (SORENSEN *et al.*, 1999) e L5602 (5'-GATTCCCAGAAGTTCTTCAAGG-3'; RIBAS, comunicação pessoal). O FIB7 foi amplificado utilizando os *primers* FIB-B17U e FIB-B17L (PRYCHITKO & MOORE, 1997). Todas as PCRs foram realizadas em volume final de 25  $\mu$ l contendo tampão 1X com 0,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 pmol de *primer* F, 0,4 pmol de *primer* R, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare) e 10 ng de DNA genômico. As condições da PCR foram: 95°C por 5 minutos; 10 ciclos a 95°C por 30 segundos, *touchdown* iniciado a 60°C e diminuindo 1°C por ciclo por 30 segundos, 72°C por 40 segundos; 35 ciclos à 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos; extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação dos fragmentos por PCR foi verificada em gel de agarose da mesma forma como descrita para os microssatélites. Os produtos foram purificados utilizando 0,25  $\mu$ l de Exonuclease I (Fermentas, 20 U/ $\mu$ l) e FastAP Alkaline Phosphatase (Fermentas, 1 U/ $\mu$ l) misturadas na proporção 1:4, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C. Após a purificação foi

realizada a reação de sequenciamento utilizando os mesmos *primers* da reação de PCR e o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Parte do sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) no GaTE Lab-USP (Prof<sup>a</sup>. Marie-Anne Van Sluys) e parte pela empresa MacroGen Inc. (USA). As sequências foram verificadas e editadas para análise no programa CodonCode Aligner v.3.7.1.

As sequências foram alinhadas usando o ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997). As reconstruções dos haplótipos para o FIB7 foram realizadas utilizando o método bayesiano do Phase (STEPHENS *et al.*, 2001; STEPHENS & DONNELLY, 2003). O teste phi foi realizado no programa SplitsTree versão 4.13.1 (BRUEN *et al.*, 2006; HUSON & BRYANT, 2006) para identificar se havia sinal de presença de recombinação no FIB7.

O cálculo do número de sítios segregantes (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica ( $\pi$ ), testes de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989) e  $F_s$  de Fu (FU, 1997), teste de crescimento populacional R2 (RAMOS-ONSINS & ROZAS, 2002) de Ramos-Onsins e Rozas's, e *mismatch distribution* (modelo população crescimento-declínio) (ROGERS & HARPENDING, 1992) foram realizados no DnaSP v.5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009). As significâncias de todos os testes foram obtidas com base em 1.000 simulações coalescentes.

Para inferir a estrutura populacional foram construídas redes de haplótipos usando o algoritmo *median-joining* disponível no programa Network v.4.6 (BANDELT *et al.*, 1999) e foi realizado um teste AMOVA usando Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER *et al.*, 2005a).

O programa BEAST 1.6.1 (DRUMMOND & RAMBAUT, 2007) foi usado para inferir mudanças no tamanho populacional ao longo do tempo utilizando apenas o ND2 para o método *Bayesian Skyline Plot*, e utilizando os dados de ND2 e FIB7 no método *Extended Bayesian Skyline Plot* (HELED & DRUMMOND, 2008). Em ambas as análises foi utilizada uma árvore inicial obtida por UPGMA, 10 milhões de passos de MCMC, frequência de amostragem estabelecida a cada 1.000 passos, 10% de *burn-in* e modelo evolutivo HKY selecionado pelo jModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012;

GUINDON & GASCUEL, 2003) para ambos marcadores. A taxa utilizada para o relógio molecular para o ND2 foi de 1,05% por linhagem por milhão de anos (WEIR & SCHLUTER, 2008) e para o FIB7 foi de 0,135% por linhagem por milhão de anos (ELLEGREN, 2007).

#### *Análises de microssatélites e de sequências*

Foram realizadas simulações utilizando computação bayesiana aproximada (ABC), com auxílio do programa DIYABC 2.0.3 (CORNUET *et al.*, 2014) que acomoda dados de microssatélites e de sequências de DNA na análise. Esse método de ABC utiliza uma medida de similaridade entre os dados simulados e os dados observados, e para melhorar a aproximação da distribuição *a posteriori* dos parâmetros foi usado um ajuste linear local ponderado (BEAUMONT *et al.*, 2002). Em resumo, foram realizados três passos gerais para a análise de ABC (EXCOFFIER *et al.*, 2005b): a) simulação de valores de estatísticas sumárias, b) seleção dos valores simulados de estatísticas sumárias mais próximos aos dados observados, e c) estimativa das distribuições *a posteriori* dos parâmetros por meio de uma regressão linear local.

Como os resultados não evidenciaram presença de diferenciação populacional, foi assumido que as sequências do DNA mitocondrial, do íntron nuclear e de sete microssatélites dos 141 indivíduos analisados pertenciam a uma única população. Assim, a tabela de referência com um milhão de valores aleatórios de estatísticas sumárias foram obtidos a partir dos seguintes parâmetros iniciais (*priors*) com distribuições uniformes (U) dos tamanhos efetivos populacionais ( $N_e$ ) e tempos (t):

$N_e \text{ U } [10^2; 10^6]; t_0 \text{ U } [10; 10^4]$

$N_{e1} \text{ U } [10; 10^5]; t_1 \text{ U } [10; 10^5]$

$N_{e2} \text{ U } [10; 8 \times 10^5]; t_2 \text{ U } [5 \times 10^3; 6 \times 10^5]$

$N_{e3} \text{ U } [10; 8 \times 10^5]; t_3 \text{ U } [5 \times 10^3; 10^6]$

Onde  $N_e$  é o tamanho efetivo populacional com distribuição uniforme variando entre  $10^2$  e  $10^6$  estimado no tempo ( $t_0$ ) com distribuição uniforme entre 10 gerações e  $10^4$  gerações.  $N_{e1}$  é o tamanho efetivo populacional no  $t_1$  no passado com as distribuições descritas acima, e assim por diante. Sendo que  $t_0 < t_1 < t_2 < t_3$ , uma vez

que os intervalos das suas distribuições se sobrepõem. Esses intervalos de valores de *priors* foram escolhidos a partir dos resultados do *extended bayesian skyline plot* que identificou e estimou quando a expansão populacional se iniciou, foi então estabelecido um intervalo que incluía esse tempo estimado, porém muito mais amplo. Foi assumida para as simulações dos microssatélites a taxa de mutação com distribuição uniforme entre  $10^{-9}$  e  $10^{-3}$  por sítio por geração. Essa distribuição foi adotada baseada em análises iniciais no programa, nas quais foi verificado que a taxa sugerida pelo programa superestimava a taxa de mutação para esses marcadores. Também foi adotado o modelo de mutação *generalized stepwise mutation* (GSM) que é um dos mais simples e assume que o número de unidades de repetição de um microssatélite é aumentado ou diminuído devido a uma mutação seguindo uma distribuição geométrica (ESTOUP *et al.*, 2002). A distribuição uniforme da taxa de mutação utilizada para as simulações das sequências mitocondriais e íntrons foi entre  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  por sítio por geração, abrangendo as taxas sugeridas por Weir e Schluter (2008) para o DNA mitocondrial e por Ellegren (2007) para íntrons, com modelo de mutação HKY inferido no jModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003).

As estatísticas sumárias para cada uma das quais um milhão de valores foram simulados estão discriminadas abaixo:

- para os microssatélites: número médio de alelos por microssatélite, diversidade genética média de cada microssatélite, variância do tamanho médio dos alelos dos microssatélites, média do índice Garza-Williamson (M) de cada loco (o índice M é o número de alelos dividido pelo intervalo de tamanho dos alelos e pode ser usado para identificar reduções no  $N_e$ , GARZA & WILLIAMSON, 2001) ;
- para as sequências mitocondriais e nucleares (íntron): número de haplótipos distintos, número de sítios segregantes, média da diferença par a par, variância da diferença par a par, D de Tajima, número de sítios segregantes privados, média dos números do nucleotídeo mais raro nos sítios segregantes e variância dos números do nucleotídeo mais raro nos sítios segregantes.

Dentre o milhão de valores simulados de cada estatística sumária, foi selecionado 1 % dos valores mais próximos aos dados observados (valor sugerido no artigo que descreve o programa DIYABC; CORNUET *et al.*, 2008) para realizar a

inferência da distribuição *a posteriori* dos parâmetros. Após a estimativa dos parâmetros baseados nas distribuições *a posteriori* foi verificado quão bem esse modelo explicou corretamente os dados observados, isso foi feito pela análise dos componentes principais no DIYABC 2.0.3 (CORNUET *et al.*, 2014).

### 1.3 Resultados

#### *Microsatélites*

Todos microsatélites se apresentaram em equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção sequencial de Bonferroni. O loco Dft07 apresentou desequilíbrio de ligação e foi excluído das análises. A diversidade alélica (Na) por microsatélite variou de três a seis alelos, a diversidade gênica de Nei (He) variou de 0,031 a 0,521, e o coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) não foi significativamente diferente de zero (Tabela 2).

Tabela 2. Estatísticas sumárias dos dados de microsatélites para *D. turdina*. Número de indivíduos genotipados (N), número de alelos (Na), heterozigosidades observada (Ho) esperada (He), coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e seu respectivo valor de p ( $p F_{IS}$ ).

<b>Microsatélite</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>p F_{IS}</math></b>
Dft-01	117	6	0,384	0,355	-0,083	0,175
Dft-02	128	4	0,484	0,521	0,070	0,968
Dft-06	132	6	0,424	0,406	-0,046	0,150
Dft-09	112	3	0,089	0,102	-0,128	0,750
Dft-10	132	3	0,219	0,225	0,023	0,887
Dft-11	124	3	0,258	0,266	0,030	0,950
Dft-16	130	3	0,031	0,031	-0,009	0,950

Foi detectado sinal de gargalo populacional pelo programa Bottleneck, que apresentou valor significativo no teste de Wilcoxon ( $p=0,015$ ), rejeitando a hipótese de a população estar em equilíbrio de mutação-deriva.

A análise com o Structure foi realizada com dados de sete microsatélites. O melhor K, pelo método de Evanno, foi o igual a 2, o que indica a possibilidade de existirem dois grupos populacionais. No entanto, parece haver alto fluxo gênico, já que pela Figura 3, que resume 20 corridas para o  $K=2$ , não é possível distinguir grupos ou estrutura populacional.

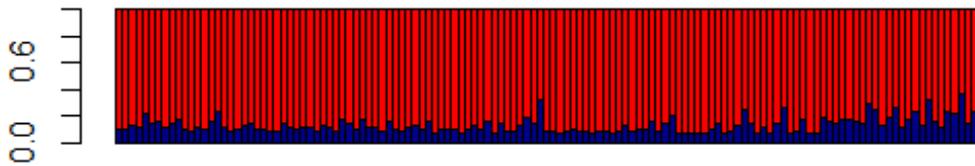


Figura 3. Gráfico consenso de 20 corridas para K=2 com base em dados de sete microssatélites de *Dendrocincla turdina*.

### Sequências

Foram obtidos 1011 pb do ND2 para 118 espécimes, sem códons de parada, sugerindo que são regiões funcionais do DNA mitocondrial. A diversidade nucleotídica foi de 0,00249. Foram identificados 26 haplótipos e a diversidade haplotípica estimada foi de 86,4% (Tabela 3). Os testes de neutralidade de D de Tajima e Fs de Fu foram negativos e significativos, e o teste de crescimento populacional  $R_2$  foi significativo (Tabela 3).

Para o FIB7, foram obtidos 822 pb de 114 indivíduos, dos quais 109 puderam ter suas fases gaméticas resolvidas com probabilidade posterior maior do que 60% (HARRIGAN *et al.*, 2008). O teste phi não identificou evidência de recombinação ( $p=0,2635$ ). As estatísticas sumárias para o FIB7 estão descritas na Tabela 3. Os testes D de Tajima e Fs de Fu foram significativos para todos os marcadores, sugerindo a ocorrência de expansão demográfica ou seleção positiva. Esses resultados são congruentes com os do teste  $R_2$  que foi significativo para todos os marcadores e indica expansão populacional.

Tabela 3. Estatísticas sumárias obtidas baseadas nas sequências de ND2 (1011 pb) e FIB7 (822 pb) de *Dendrocincla turdina*. Número de sequências analisadas (N), número de caracteres na matriz de dados alinhada (Sítios), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), número de haplótipos (H), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (Hd), testes de neutralidade de D de Tajima e Fs de Fu, e teste demográfico  $R_2$ .

	N	Sítios	$\pi$	H	S	Hd	D de Tajima	Fs de Fu	$R_2$
<b>ND2</b>	118	1.011	0,00249	26	30	0,864	-1,7525*	-15,699*	0,091*
<b>FIB7</b>	218	822	0,000467	11	10	0,32	-1,7865*	-10,58*	0,0211*

\* $p < 0,05$

As análises de *mismatch distribution* baseadas nos dados de ND2 e FIB7 (Figura 4, Tabela 4) indicam expansão populacional para ambos marcadores, exceto para a expansão súbita do ND2 (Figura 4A).

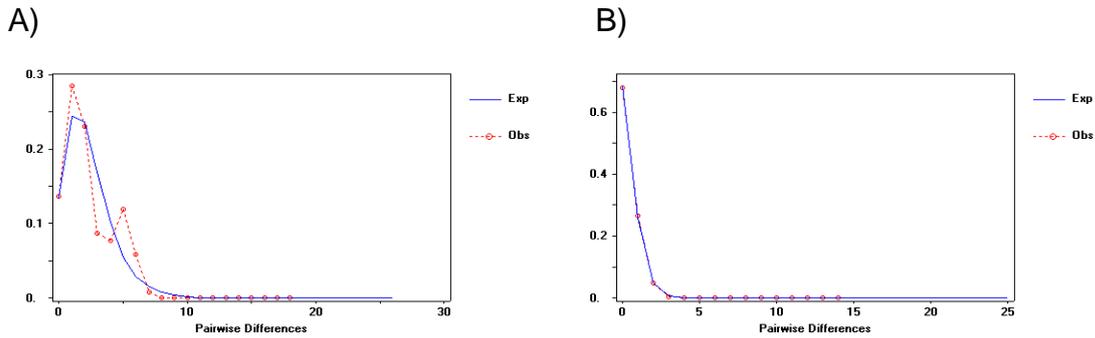


Figura 4. Resultado do teste *mismatch distribution* de *Dendrocincla turdina*. Gráficos obtidos assumindo o modelo esperado de crescimento-declínio populacional baseados em 1.011 pb do ND2 (A) e 822 pb do FIB7 (B). Linhas em azul mostram a distribuição esperada dos valores e linhas pontilhadas em vermelho, a observada.

Tabela 4. Valores da soma dos desvios quadráticos (SSD) e seu valor de p, e valores do índice *raggedness* (r) e seu valor de p.

	SSD	p SSD	R	p r
<b>ND2</b>				
Expansão súbita	0.01898	0.004*	0.05354	0.257
Expansão espacial	0.01131	0.129	0.05354	0.251
<b>FIB7</b>				
Expansão súbita	0.00039	0.500	0.36078	0.610
Expansão espacial	0.00001	0.850	0.36078	0.600

\*p<0,05

As redes de haplótipos construídas com 118 sequências de ND2 e 218 sequências de FIB7 (Figura 5) não apresentam estrutura geográfica evidente, com haplótipos centrais mais frequentes presentes em diferentes regiões geográficas. As redes ainda indicam um possível sinal de expansão populacional com diversos haplótipos de baixa frequência proximamente conectados (um ou poucos passos mutacionais) a haplótipos centrais, gerando um padrão de estrela nas redes.

A estrutura populacional também foi avaliada pelo teste de AMOVA que identificou que a maior parte da variação genética está dentro das localidades (61.57%) e, portanto, menor variação entre as localidades, o que reforça ausência de forte estrutura genética populacional.

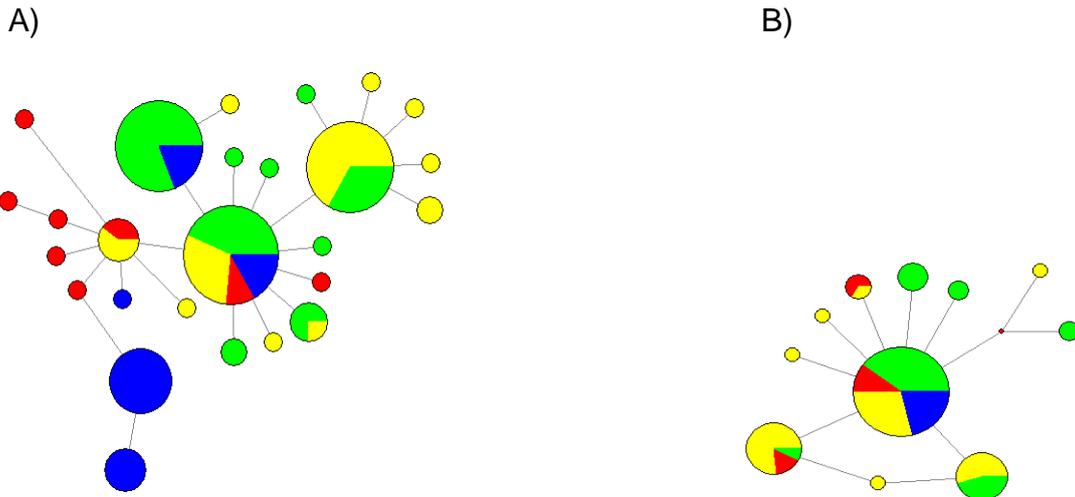


Figura 5. Redes de haplótipos de *Dendrocincla turdina* construídas baseadas em 1.011 pb de ND2 (A) e 822 pb de FIB7 (B). Cores correspondem às áreas de coleta do mapa de distribuição (Figura 2).

O *bayesian skyline plot* construído baseado apenas nos dados de ND2 é congruente com os resultados dos testes de expansão populacional, e sugere que a expansão tenha se iniciado após o último máximo glacial (UMG), cerca de 21k anos atrás (Figura 6).

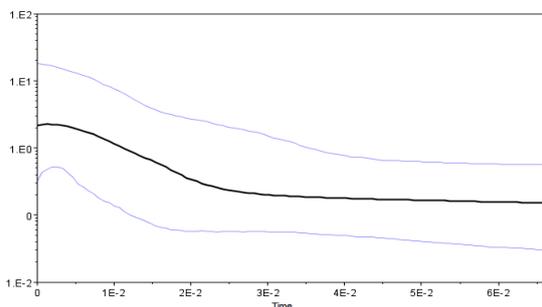


Figura 6. *Bayesian skyline plot* de *Dendrocincla turdina* com base em 1.011 pb de ND2. O eixo y mostra o tamanho populacional em escala logarítmica e o eixo x mostra o tempo em milhões de anos. A linha preta central representa a média da densidade posterior e as azuis os 95% HPD.

O *extended bayesian skyline plot* foi construído com os dados de ND2 e FIB7 e também indicou ocorrência de expansão a partir do UMG, como ilustrado na Figura 7, e confirmado no Tracer que indicou que o número de mudanças demográficas foi maior do que zero.

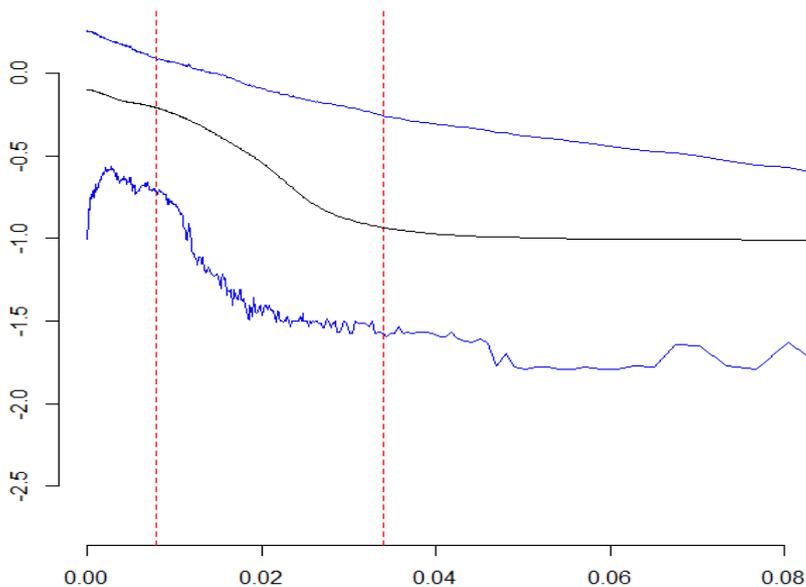


Figura 7. *Extended bayesian skyline plot* de *Dendrocincla turdina* com base em dados concatenados de 1011 pb de ND2 e 822 pb de FIB7. O eixo x representa o tempo em milhões de anos e o eixo y, o tamanho populacional em escala logarítmica. A curva interna preta mostra a distribuição das medianas e os traços externos azuis representam os limites da distribuição dos 95% HPD. As linhas verticais em vermelho representam o intervalo proposto para o UMG ( $21\text{ka} \pm 8\text{ka}$ ).

Como todos os resultados indicaram que *D. turdina* não apresenta estrutura geográfica populacional, para a análise de ABC foi testado um cenário de uma população única (Figura 8). Na figura 9 encontra-se o gráfico da análise de componentes principais das estatísticas sumárias obtidas usando os conjuntos de dados simulados com as distribuições *a priori* dos parâmetros, os conjuntos de dados da distribuição *a posteriori* e os dados reais. Podemos verificar que o cenário modelado se adequa aos dados reais, pois os dados observados (em amarelo) se encontram dentro da nuvem de pontos que representa os dados da distribuição *a posteriori*. O valor *a posteriori* de  $Ne_1$  foi menor do que  $Ne$ ,  $Ne_2$  e  $Ne_3$  indicando que pode ter ocorrido uma redução drástica no tamanho efetivo populacional de duas ordens de grandeza no tempo  $t_1$  ( $2,08 \times 10^4$ ) seguido por um aumento no período mais recente (Tabela 5).

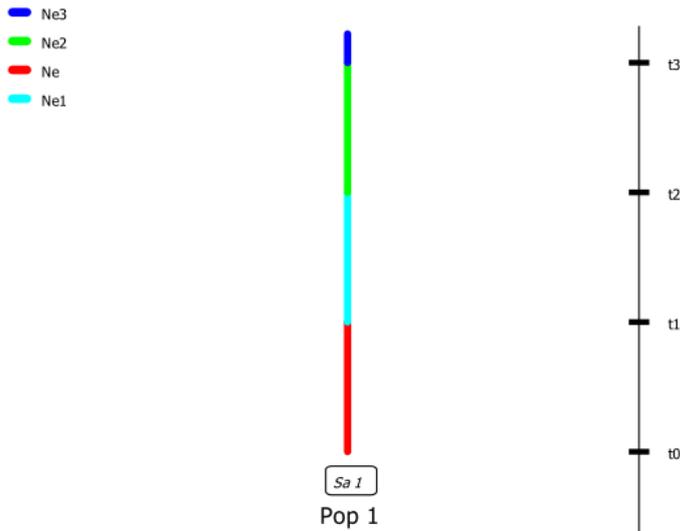


Figura 8. Cenário histórico testado para *Dendrocincla turdina*. Ne (vermelho) é o tamanho efetivo populacional no presente, Ne1 (ciano) estimado no tempo t1 (passado), Ne2 (verde) estimado no tempo t2, Ne3 (azul) estimado no tempo t3. O tempo no cenário não segue nenhuma escala.

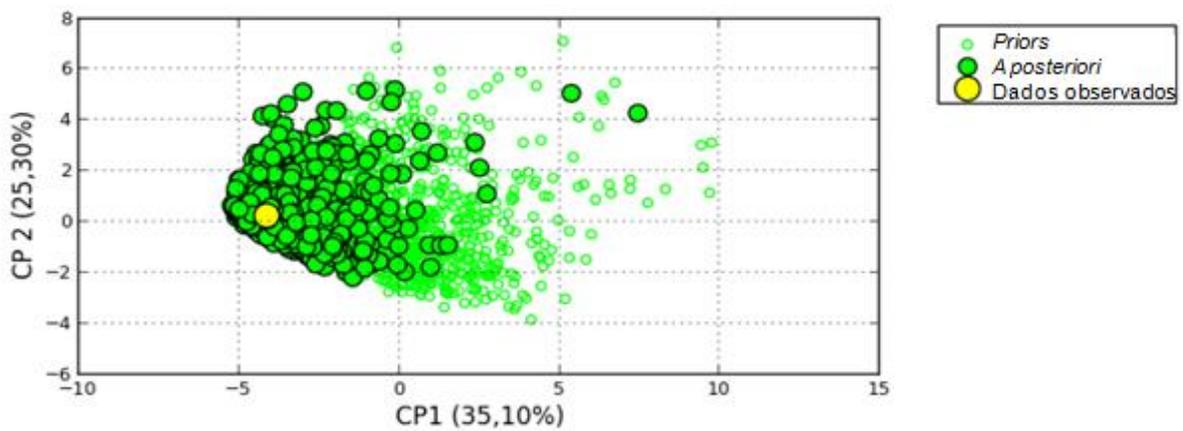


Figura 9. Análise de componentes principais. Cada círculo verde aberto representa um conjunto de dados simulados a partir da tabela de referência (*priors*), os círculos verdes circundados em preto representam os dados calculados *a posteriori* e o ponto em amarelo indica a distribuição do conjunto de dados observados.

Tabela 5. Parâmetros avaliados, média, mediana, moda e intervalos de credibilidade (5%, 25%, 75% e 95%) dos valores estimados *a posteriori* para *Dendrocincla turdina*.

Parâmetro	Média	Mediana	Moda	5%	25%	75%	95%
t0	$4,93 \times 10^3$	<b><math>4,92 \times 10^3</math></b>	$2,20 \times 10^3$	$4,88 \times 10^2$	$2,41 \times 10^3$	$7,45 \times 10^3$	$9,47 \times 10^3$
Ne	$4,38 \times 10^5$	<b><math>3,83 \times 10^5</math></b>	$1,74 \times 10^5$	$6,78 \times 10^4$	$1,97 \times 10^5$	$6,59 \times 10^5$	$9,53 \times 10^5$
t1	$2,86 \times 10^4$	<b><math>2,08 \times 10^4</math></b>	$9,57 \times 10^3$	$3,14 \times 10^3$	$1,02 \times 10^4$	$4,08 \times 10^4$	$8,15 \times 10^4$
Ne1	$1,71 \times 10^4$	<b><math>9,70 \times 10^3</math></b>	$3,02 \times 10^2$	$6,21 \times 10^2$	$3,71 \times 10^3$	$2,28 \times 10^4$	$6,21 \times 10^4$
t2	$2,90 \times 10^5$	<b><math>2,75 \times 10^5</math></b>	$1,74 \times 10^5$	$6,84 \times 10^4$	$1,63 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$5,57 \times 10^5$
Ne2	$3,91 \times 10^5$	<b><math>3,86 \times 10^5</math></b>	$2,38 \times 10^4$	$3,37 \times 10^4$	$1,86 \times 10^5$	$5,94 \times 10^5$	$7,59 \times 10^5$
t3	$6,42 \times 10^5$	<b><math>6,60 \times 10^5</math></b>	$8,54 \times 10^5$	$2,49 \times 10^5$	$4,79 \times 10^5$	$8,30 \times 10^5$	$9,66 \times 10^5$
Ne3	$4,07 \times 10^5$	<b><math>4,14 \times 10^5</math></b>	$5,58 \times 10^5$	$4,26 \times 10^4$	$2,08 \times 10^5$	$6,06 \times 10^5$	$7,60 \times 10^5$

## 1.4 Discussão

*Dendrocincla turdina* não apresentou estrutura genética populacional e possui evidências de expansão populacional. As análises populacionais realizadas com os microssatélites não recuperaram nenhum agrupamento congruente com distribuição geográfica (Figura 3), o que pode ser interpretado como ausência de estruturação genética. No entanto, também podemos considerar que talvez o número de microssatélites utilizados não contivesse informação suficiente (polimorfismo) para separar possíveis linhagens. Porém, esse mesmo padrão foi observado nas redes de haplótipos com um marcador mitocondrial e um íntron nuclear (Figura 5), reforçando a hipótese de *D. turdina* ser constituída por uma população única ou possuir estruturação tão fraca que não foi detectada por nenhuma abordagem utilizada nesse trabalho.

Com relação aos sinais de expansão demográfica, tanto nas análises populacionais com os microssatélites quanto nas análises com sequências foram verificados indícios de diminuição da população em um tempo passado, seguido de aumento no tamanho efetivo populacional mais recentemente (Figuras 4 a 7; Tabelas 3 a 5). Todos os testes aplicados para detectar expansão nos dados de ND2 e no FIB7 foram significativos. Segundo Ramos-Onsins e Rozas (2002) o teste  $R_2$  e  $F_s$  de  $F_u$  são os mais robustos para detectar crescimento populacional, e no presente estudo, até mesmo o teste de *mismatch distribution* que é o mais conservador, de acordo com esses autores, indicou expansão populacional (Figura 4; Tabelas 3 e 4).

Esse padrão de ausência de estruturação e aumento populacional foi descrito apenas recentemente em aves da mata Atlântica nos trabalhos com *Basileuterus leucoblepharus* (BATALHA-FILHO *et al.*, 2012), *Schiffornis virescens* (CABANNE *et al.*, 2012) e *Myrmeciza squamosa* (AMARAL *et al.*, 2013). Batalha-Filho *et al.* (2012) discutem que a ausência de estrutura genética em *B. leucoblepharus* possa ser devido à tolerância dessa espécie à fragmentação florestal, ou seja, a espécie possivelmente não é afetada pelas barreiras que poderiam impedir o fluxo gênico atual e histórico. Para entendermos mais sobre a capacidade de dispersão de *D. turdina* e saber como potenciais barreiras poderiam agir, seria necessário realizar

estudos específicos, como, por exemplo, de translocação de indivíduos e monitoramento de sua dispersão através de diferentes tipos de paisagens. Infelizmente não pudemos realizar estudos desse tipo e tampouco encontramos dados sobre isso na literatura.

Contudo, em estudos de dispersão feitos com uma espécie da mesma família (*Xiphorynchus fuscus*) e com outras dez espécies de aves tropicais foi notado que as espécies estudadas não tendem a dispersar longas distâncias (>100m) a menos que haja alguma conexão entre os fragmentos que possibilite o pouso durante o movimento entre áreas (BOSCOLO *et al.*, 2008; MOORE *et al.*, 2008). Considerando essa informação e que *D. turdina* é descrita na literatura como uma espécie altamente sensível à degradação ambiental, com baixa abundância e extinção local em certas áreas mais impactadas (RIBON *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2002; ANJOS, 2001; ANJOS, 2006; POLETTO *et al.*, 2004), parece pouco provável que a tolerância à fragmentação da floresta, como utilizada para explicar a ausência de estrutura populacional em *B. leucoblepharus*, poderia ser uma boa hipótese para a ausência de grupos geneticamente diferenciados em *D. turdina*.

*S. virescens* também é descrita como vulnerável à fragmentação e também apresenta ausência de estrutura genética (CABANNE *et al.*, 2012). Os autores desse trabalho levantaram algumas explicações para esse achado e que, para o presente trabalho, também poderiam ser evocados: a) quanto ao gargalo e a expansão populacional: a expansão demográfica teria ocorrido após um gargalo populacional que por sua vez teria reduzido a diversidade genética, eliminando linhagens intraespecíficas o que resultaria na ausência de estrutura observada, b) quanto à hipótese de refúgio florestal: o tamanho efetivo populacional teria sido reduzido durante o Pleistoceno possivelmente resultando em uma população restrita a um único refúgio, e c) quanto à distribuição geográfica: a maioria da distribuição da espécie está no sul da mata Atlântica que foi a região mais afetada pelas oscilações climáticas, o que difere de outros táxons que apresentaram estruturação geográfica na literatura e cuja distribuição geográfica abrange áreas historicamente estáveis de floresta (CARNAVAL & MORITZ, 2008; CABANNE *et al.*, 2008; D`HORTA *et al.*, 2011; THOMÉ *et al.*, 2010).

Vários testes baseados em dados de sequências indicaram que houve expansão demográfica em *D. turdina* e um teste baseado nos microssatélites indicou que houve um gargalo populacional recente (Figuras 4 a 7; Tabelas 3 a 5). A diversidade nucleotídica mitocondrial foi baixa ( $\pi = 0,00249$ ; Tabela 3), assim como a de *S. virescens* ( $\pi = 0,00187$ ). A diversidade dos microssatélites também foi baixa (He médio = 0,272) e a diversidade do íntron foi ainda menor que a mitocondrial ( $\pi = 0,000467$ ; Tabelas 2 e 3). Já as diversidades genéticas encontradas em *B. leucoblepharus* foram mais elevadas (mitocondrial  $\pi = 0,00562$ , íntron  $\pi = 0,00536$ ), mesmo tendo sinal de expansão e ausência de estrutura, porém sem evidências de gargalo. Assim, não é possível descartar a hipótese de ter ocorrido erosão da diversidade genética, possivelmente devido a um gargalo populacional passado como proposto para *S. virescens* (CABANNE *et al.*, 2012), que poderia ter contribuído para a extinção de linhagens intraespecíficas. Ressaltamos que a comparação desses valores de diversidade deve ser tomada com cuidado uma vez que diferentes marcadores foram analisados nessas espécies.

Considerando que foi encontrada baixa taxa de sobrevivência de populações viáveis de *D. turdina* em pequenos fragmentos (ANJOS, 2001; ANJOS, 2006; RIBON *et al.*, 2003), poderíamos especular que, durante as retrações florestais, as populações que ficaram em fragmentos muito pequenos poderiam ter se extinguido, enquanto populações que permaneceram em fragmentos maiores teriam se mantido viáveis, ainda que sua diversidade possa ter sido diminuída pelo gargalo populacional. Se assumirmos um cenário hipotético de que só teria restado uma população de um único refúgio, como foi proposto por Cabanne *et al.* (2012) isso poderia explicar a ausência de estruturação observada, os indícios de expansão demográfica e a baixa diversidade genética em todos marcadores analisados no presente estudo. O teste de expansão populacional que calcula de forma diferencial expansão demográfica e expansão espacial foi significativo para ambos (Tabela 4), indicando que se possa se tratar de uma população que teve seu tamanho efetivo populacional aumentado ou ter expandido geograficamente, sendo que a expansão geográfica deixa os mesmos sinais na *mismatch distribution* que uma expansão demográfica em uma população panmítica, sob a condição de que os demes troquem muitos migrantes (>50/geração; RAY *et al.*, 2003; EXCOFFIER, 2004). Ou

seja, não podemos afirmar que a espécie tenha se mantido em único refúgio ou que tenha se mantido em vários que poderiam ter se expandido e reconectado dependendo das condições climáticas.

Com relação à distribuição geográfica das espécies da mata Atlântica com ausência de estrutura genética descritas até o momento, todas têm sua maior distribuição geográfica na parte mais ao sul do bioma (abaixo da região do Rio Doce). Acredita-se que essa região sofreu mais mudanças durante as oscilações climáticas do Quaternário (CABANNE *et al.*, 2012; CARNAVAL & MORITZ, 2008; BEHLING, 2002; BEHLING *et al.*, 2002). Porto *et al.* (2013) propuseram que tenha existido um grande refúgio no sudeste do Brasil e um menor no sudeste do Mato Grosso do Sul e ainda reforçaram que a existência desse refúgio já havia sido proposta com dados climáticos, de vegetação e de diversidade de espécies. Em 2014, Carnaval *et al.*, discutiram que a porção sul e norte da floresta estão certamente sujeitas a diferentes pressões climáticas atuais e passadas, o que pode contribuir para os padrões que observamos para as espécies com distribuição predominante ao sul.

Dadas as evidências de expansão populacional, utilizamos algumas metodologias para estimar quando ela teria ocorrido. Os resultados do *bayesian skyline plot* e *extended bayesian skyline plot* sugerem que a expansão tenha se iniciado no último máximo glacial - UMG (Figuras 6 e 7). As simulações de ABC indicaram um notável gargalo populacional durante o UMG ( $N_e1$ ,  $t1$  da Figura 8, Tabela 5), seguido por uma recuperação atual do tamanho efetivo ( $N_e$ ; Figura 8 e Tabela 5). Esse cenário é similar ao que foi obtido nas simulações feitas com *S. virescens*, cujos modelos coalescentes que não foram rejeitados sugerem redução do seu tamanho efetivo populacional seguido por uma recuperação no  $N_e$  durante o Pleistoceno (CABANNE *et al.*, 2012). Ainda, esse cenário é similar ao observado para *Myrmeciza squamosa* com expansão populacional há 20k anos (AMARAL *et al.*, 2013). Para *B. leucoblepharus* foi observado um crescimento populacional que se iniciou há cerca de 300 mil anos (BATALHA-FILHO *et al.*, 2012) e estabilidade no tamanho populacional durante o período estimado de expansão para *D. turdina* (UMG).

Embora as simulações com ABC se baseiem no método de rejeição de alguns possíveis cenários evolutivos, para *D. turdina* a metodologia foi utilizada de forma relativamente simplificada, pois incluiu um único cenário para estimar diversos parâmetros. Assim, foi testado o cenário de uma população panmítica e simulados os parâmetros de tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) no tempo atual ( $t_0$ ), e em outros três tempos sequenciais no passado ( $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ; Figura 8). No primeiro tempo estimado no passado ( $t_1$ ) teria ocorrido uma diminuição no  $N_e$  de duas ordens de grandeza durante o UMG, seguido de recuperação (expansão) do  $N_e$ . Esses dados estão de acordo com as outras informações obtidas com as análises de gargalo populacional com microssatélites, teste demográfico  $R_2$ , *mismatch distribution*, *extended bayesian skyline plot* (Tabela 3; Figuras 4 e 7).

Batalha-Filho *et al.* (2012) publicaram o primeiro trabalho com um passeriforme da mata Atlântica sem estrutura genética populacional e questionaram se a ausência de estrutura genética e estabilidade no tamanho populacional durante o UMG seria um novo padrão revelado para organismos desse bioma. No mesmo ano foi publicado o trabalho com *Schiffornis virescens* (CABANNE *et al.*, 2012). Em 2013 foi publicado o estudo de *Myrmeciza squamosa* e *M. loricata* (AMARAL *et al.*, 2013). Com a adição do presente trabalho, mostramos que existem passeriformes da mata Atlântica que não apresentam estrutura genética populacional com expansão populacional no Pleistoceno. Assim, parece que a ausência de estrutura também ocorre com frequência e talvez tenha sido pouco encontrado dado a escassez de estudos, bem como um relativo viés de escolha de modelos de estudo com problemas taxonômicos que já sugerem algum tipo de diferenciação ao longo do bioma.

Esses resultados evidenciam a complexidade da história evolutiva dos passeriformes na mata Atlântica e também fornecem novas questões a serem respondidas, tais como: existem diferenças de respostas evolutivas entre passeriformes com distribuição predominante ao sul ou norte da mata Atlântica (tendo como referência o rio Doce)? As espécies com distribuição potencial no passado (UMG) restrita ao sul da mata Atlântica tendem a apresentar sinais de expansão? Como as diferenças ecológicas entre os táxons (ex. sensibilidade à

fragmentação e degradação do habitat) influenciam na sua resposta as oscilações climáticas do Quaternário?

Para *D. turdina* podemos concluir, com os dados aqui apresentados, que seu padrão filogeográfico é mais similar àquele descrito para *S. virescens* (CABANNE *et al.*, 2012). Possivelmente o táxon sofreu uma drástica redução em seu tamanho populacional durante o Quaternário, sendo que no período correspondente ao UMG iniciou a recuperação do seu Ne devido a expansão demográfica. Assim, o presente estudo se soma a outros baseados em organismos da mata Atlântica, em especial os passeriformes, que indicam que ainda é necessário descrever os padrões de distribuição geográfica e temporal da diversidade genética para melhor compreendermos a história biogeográfica deste bioma.

## 1.5 Referências bibliográficas

AMARAL FR, ALBERS PK, EDWARDS SV, MIYAKI CY (2013) Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic forest antbirds (*Myrmeciza*). *Molecular Ecology* 22: 3996-4013.

ANJOS L (2001) Bird communities in five Atlantic forest fragments in southern Brazil. *Ornitologia Neotropical* 12: 11–27.

ANJOS L (2006) Bird species sensitivity in a fragmented landscape of the Atlantic forest in southern Brazil. *Biotropica* 38: 229–234.

BANDELT HJ, FORSTER P, RÖHL A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

BATALHA-FILHO H, CABANNE GS, MIYAKI CY (2012) Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892-902.

BEAUMONT MA, ZHANG W, BALDING DJ (2002) Approximate bayesian computation in population genetics. *Genetics* 162: 2025-2035.

BEHLING H, ARZ HW, PATZOLD J, WEFER G (2002) Late Quaternary vegetational and climate dynamics in southeastern Brazil, inferences from marine cores GeoB 3229–2 and GeoB 3202–1. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 179: 227–243.

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

- BOSCOLO D, CANDIA-GALLARDO C, AWADE M, METZGER JP (2008) Importance of interhabitat gaps and stepping-stones for lesser woodcreepers (*Xiphorhynchus fuscus*) in the Atlantic forest, Brazil. *Biotropica* 40: 273–276.
- BRUEN TC, PHILIPPE H, BRYANT D (2006) A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172: 2665–2681.
- BRUFORD MW, HANOTTE O, BROOKFIELD JF, BURKE T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprint. In: Hoebel AR (ed). *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 225-269.
- CABANNE GS, D'HORTA FM, SARI EHR, SANTOS FR, MIYAKI CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760–773.
- CABANNE GS, SARI HER, MEYER D, SANTOS FR, MIYAKI CY (2012) Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic greenish schiffornis *Schiffornis virescens*. *Journal of Ornithology* 154: 371-384.
- CARNAVAL AC, MORITZ C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187–1201.
- CARNAVAL AC, WALTARI E, RODRIGUES MT, ROSAUER D, VANDERWAL J, DAMASCENO R, PRATES I, STRANGAS M, SPANOS Z, RIVERA D, PIE MR, FIRKOWSKI CR, BORNSCHEIN MR, RIBEIRO LF, MORITZ C (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 281: 20141461.
- CLENCH MH (1995) Body pterylosis os woodcreepers and ovenbirds. *The Auk* 112: 800-804.
- CORNUET JM, SANTOS F, BEAUMONT MA, ROBERT CP, MARIN JM, BALDING DJ, ESTOUP A (2008) Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* 24: 2713-2719.
- CORNUET JM, PUDLO P, VEYSSIER J, DEHNE-GARCIA A, GAUTIER M, LEBLOIS R, ESTOUP A (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics* 30: 1187-1189.
- D'HORTA FM, CABANNE GS, MEYER D, MIYAKI CY (2011) The genetic effects of late quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1923-1935.
- DARRIBA D, TABOADA GL, DOALLO R, POSADA D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772-772.

- DRUMMOND AJ, RAMBAUT A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- EARL DA, VANHOLDT BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- ELLEGREN H (2007) Molecular evolutionary genomics of birds. *Cytogenetic Genome Resources* 117: 120–130.
- ESTOUP A, JARNE P, CORNUET JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and 32 their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604.
- 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, ESTOUP A, CORNUET JM (2005b) Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics* 169, 1727-1738.
- EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S (2005a) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- EXCOFFIER L (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13: 853-864.
- FAZZA AC, GALETTI JR PM (2011) Isolation and characterization of microsatellite loci in the plain-winged woodcreeper *Dendrocincla turdina* (Aves, Dendrocolaptidae). *Conservation Genetics Resources* 3: 5-7.
- FU YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- GARZA JC, E WILLIAMSON (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite DNA. *Molecular Ecology* 10: 305-318.
- GHIZONI-JR, AZEVEDO, MAG (2005) Composição de bandos mistos de aves florestais de sub-bosque em áreas de encosta e planície da Floresta Atlântica de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas* 19: 47-53.
- GOUDET J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- GUINDON S, GASCUEL O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.

HARRIGAN RJ, MAZZA ME, SORENSON MD (2008) Computation vs. cloning: evaluation of two methods for haplotype determination. *Molecular Ecology Resources* 8: 1239–1248.

HELED J, DRUMMOND AJ (2008) Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolution Biology* 8: 289.

HUSON DH, BRYANT D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.

INFONATURA: Birds, mammals, and amphibians of Latin America [web application] (2007) Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Disponível em: <http://infonatura.natureserve.org>. Acessado em: 23 de fevereiro de 2011.

JAKOBSSON M, ROSENBERG NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.

LIBRADO P, ROZAS J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

LUIKART G, ALLENDORF FW, CORNUET JM, SHERWIN WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89: 238-247.

MARANTZ C, ALEIXO A, BEVIER LR, PATTEN MA (2003a) Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). In: del Hoyo J, Elliott A, Christie D (eds). *Handbook of the Birds of the World, volume 8, Broadbills to Tapaculos*. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 358-447.

MARANTZ CA, ALEIXO A, BEVIER LR, PATTEN MA (2003b) Plain-winged woodcreeper (*Dendrocincla turdina*). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E (eds.) (2014). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Disponível em: <http://www.hbw.com/node/56596>. Acessado em: março de 2015.

MARQUES AAB, FONTANA CS, VÉLEZ E, BENCKE GA, SCHNEIDER M, REIS RE (2002) Lista de referência da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Decreto nº41.672, de 11 de junho de 2002. FZB/MCT-PUCRS/PANGEA (Publicações Avulsas FZB,11), Porto Alegre.

MOORE RP, ROBINSON WD, LOVETTE IJ, ROBINSON TR (2008) Experimental evidence for extreme dispersal limitation in tropical forest birds. *Ecology Letters* 11: 960-968.

MOYLE RG, CHESSER RT, BRUFIELD RT, TELLO JG, MARCHESE DJ, CRACRAFT J (2009) Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariides). *Cladistics* 25: 1–20.

- PIRY S, LUIKART G, CORNUET JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *The Journal of Heredity* 90: 502-503.
- POLETTO F, ANJOS L, LOPES EV, VOLPATO GH, SERAFINI PP, FAVARO FL (2004) Caracterização do microhabitat e vulnerabilidade de cinco espécies de arapaçus (Aves: Dendrocolaptidae) em um fragmento florestal do norte do estado do Paraná, sul do Brasil. *Brazilian Journal of Ornithology* 12: 89-96.
- PORTO TJ, CARNAVAL AC, DA ROCHA PLB (2013) Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. *Diversity and Distributions* 19: 330–340.
- PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- PRYCHITKO TM, MOORE WS (1997) The utility of DNA sequences of an intron from the  $\beta$ -fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 193-204.
- RAMOS-ONSINS S, ROZAS J (2002) Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092–2100.
- RAY N, CURRAT M, EXCOFFIER L (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20: 76-86.
- RAYMOND M, ROUSSET F (1995) Genepop, version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- RIBON R, SIMON JE, MATTOS GT (2003) Bird extinctions in Atlantic forest fragments of the Viçosa region, southeastern Brazil. *Conservation Biology* 6:1827-1839.
- RICE WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- ROGERS AR, HARPENDING H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- ROUSSET F (2008) Genepop'007: a complete reimplementations of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- SCHUELKE M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- SORENSEN MD, AST JC, DIMCHEFF DE, YURI T, MINDELL DP (1999) Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 105–114.
- STEPHENS M, SMITH N, DONNELLY P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal Human Genetics* 68: 978–989.

STEPHENS M, DONNELLY P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics* 73: 1162-1169.

TAJIMA F (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597–601.

THOMÉ MTC, ZAMUDIO KR, GIOVANELLI JGR, HADDAD CFB, BALDISSERA JR FA, ALEXANDRINO JMB (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018–1031.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG (1997) The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.

WEIR JT, PRICE M (2011) Andean uplift promotes lowland speciation through vicariance and dispersal in *Dendrocincla* woodcreepers. *Molecular Ecology* 20: 4550-4563.

WEIR JT, SCHLUTER D (2008) Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17: 2321-2328.

## **CAPÍTULO 2**

Estudo filogeográfico de *Drymophila squamata*



## Resumo

*Drymophila squamata* é endêmica da mata Atlântica e ocorre em áreas de baixa altitude. Foram analisados 1032 pb de um marcador mitocondrial (ND2), 849 pb de um íntron (FIB7) e 426 pb de outro íntron (G3PDH) de 69 indivíduos amostrados em 19 localidades ao longo da distribuição da espécie. A análise filogenética baseada no ND2 revelou quatro linhagens com alto suporte: uma na margem esquerda do rio São Francisco (Nordeste), uma entre a margem direita do rio São Francisco e a margem esquerda do rio Pardo (Norte), uma entre o rio Pardo e a margem direita do rio Doce (Centro) e uma ao sul do rio Paraíba do Sul (Sul). A árvore de espécie e a análise de testes de modelo utilizando computação bayesiana aproximada sugeriram que o Nordeste se diferenciou dos demais clados no Pleistoceno inferior, enquanto a diferenciação entre os três outros clados teria sido mais recente, durante o Pleistoceno médio. As linhagens Norte e Sul apresentaram evidências de alterações demográficas no último máximo glacial que poderiam estar relacionadas às oscilações climáticas do Quaternário. Assim, a diversificação desses grupos pode estar associada tanto a eventos geotectônicos quanto a climáticos, bem como os rios poderiam agir como barreiras secundárias ao fluxo gênico. O presente estudo contribuiu com a investigação da história biogeográfica da mata Atlântica com a descrição filogeográfica de mais um táxon e sua contextualização nesse complexo cenário biogeográfico que envolve diversos e complementares processos históricos e as respostas específicas dos organismos.

## Abstract

*Drymophila squamata* is an endemic to the Atlantic forest and occurs in lowlands. We obtained 1032 bp of mitochondrial DNA (ND2), 849 bp of an intron (FIB7) and 426 bp of another intron (G3PDH) from 69 specimens from 19 localities. ND2 recovered four genetic lineages: one on the left bank of São Francisco river (Northeast), another between the right bank of São Francisco river and left bank of Pardo river (North), one between the right bank of Pardo river and the right bank of Doce river (Center), and the forth to the south to Paraíba do Sul river (South). The results of species tree and approximate Bayesian computation suggested that Northeast was the first to differentiate from the other clades during the late Pleistocene, while the differentiation among the remaining three groups was dated in the middle of the Pleistocene. The North and South lineages presented evidences of demographic changes in the Quaternary. Thus, the diversification process of *D. squamata* could have been shaped by geotectonic and/or climatic events, as well as by rivers as secondary barriers for gene flow. This study contributed with the investigation of the biogeographic history of the Atlantic forest. It described the phylogeography of another taxon and put it in the context of this intricate biogeographic scenario that involves several and complementary historical processes and organism specific responses.

## 2.1 Introdução

A família Thamnophilidae compreende um grupo monofilético e muito diverso com distribuição restrita à região neotropical (IRESTED *et al.*, 2004; ZIMMER & ISLER, 2003a). Pertencente a essa família, o gênero *Drymophila* é composto por oito espécies, das quais seis são endêmicas da mata Atlântica (*D. squamata*, *D. ferruginea*, *D. genei*, *D. malura*, *D. ochropyga*, *D. rubricollis*), uma ocorre na Amazônia (*D. devillei*) e uma ocorre nos Andes (*D. caudata*; ZIMMER & ISLER, 2003a).

Goerck (1999) estudou a filogenia das espécies desse gênero, tendo recuperado três grupos filogenéticos com alto suporte: 1) *D. ferruginea* e *D. rubricollis*, 2) *D. genei* e *D. ochropyga* e 3) *D. caudata* e *D. devillei*; enquanto *D. malura* e *D. squamata* não apresentaram alto suporte de agrupamento com nenhum dos clados.

*D. squamata*, táxon de estudo do presente capítulo, ocorre desde a Bahia até o nordeste do Rio Grande do Sul, incluindo uma população disjunta em Alagoas (SICK, 1997; ZIMMER & ISLER, 2003a). *D. squamata* é observada principalmente em áreas de baixada de 0 a 600m, podendo ocorrer em altitudes maiores com até 900m principalmente na Bahia (RAJÃO & CERQUEIRA, 2006). Existem duas subespécies descritas com base em diferenças na plumagem: *D. s. squamata* e *D. s. stictocorypha* (Figura 1). A área de ocorrência da primeira é de Alagoas a Bahia e *D. s. stictocorypha* tem ocorrência descrita para o sudeste do Brasil (PINTO, 1978; ZIMMER & ISLER, 2003a).

No entanto, existem discordâncias acerca dos caracteres morfológicos utilizados para a identificação dessas subespécies e dentro de determinadas localidades foi encontrada variação entre os indivíduos (GOERCK, 1999). Ainda, no estudo de Goerck (1999) foi observado que *D. squamata* apresentou diferenciação entre indivíduos amostrados ao sul do rio do Paraíba do Sul e aqueles amostrados ao norte do rio Doce (5,2 a 5,9% de distância genética baseada em DNA mitocondrial). Infelizmente não foram obtidas amostras de aves entre esses dois rios, mas de qualquer forma, esses grupos diferenciados não coincidem com as subespécies descritas.

Também foram encontradas diferenças nos comportamentos de forrageamento e uso do substrato entre esses dois grupos geneticamente diferenciados, além de uma associação do grupo do norte com bambus, o que não é esperado para *D. squamata* (GOERCK, 1999; RIDGELY & TUDOR, 1994). Portanto, no presente trabalho nós não consideramos a distinção em subespécies.



Figura 1. *Drymophila squamata squamata* macho à esquerda e fêmea à direita, e abaixo, detalhes das cabeças de *D. s. stictocorypha* (ZIMMER & ISLER, 2003b).

Dentro do contexto apresentado aqui e na Introdução da Tese, *D. squamata* foi selecionada como modelo para investigar como sua diversificação e história demográfica podem ajudar a revelar os processos históricos que ocorreram na mata Atlântica. Para isso foram utilizados três marcadores moleculares, um mitocondrial e dois íntrons. Assim, no presente capítulo nós investigamos o padrão filogeográfico de *D. squamata*, com o intuito de responder as seguintes questões: a) qual é a estrutura genética populacional da espécie baseada em uma amostragem mais abrangente?, b) havendo diferenciação significativa entre filogrupos, qual o tempo de divergência entre eles?, c) qual a história demográfica dos filogrupos?, d) qual(is) cenário(s) históricos simulados por computação bayesiana aproximada (ABC) melhor explica(m) os padrões observados?

## 2.2 Material e métodos

### Amostragem

Foram analisados 69 indivíduos amostrados em 19 localidades ao longo da distribuição da espécie (Figura 2 e Tabela 1). Parte das amostras foi coletada durante esse trabalho, parte já estava depositada na coleção do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo onde foi desenvolvido esse estudo e parte foi cedida por diversos museus/coleções de universidades (Tabela 1).

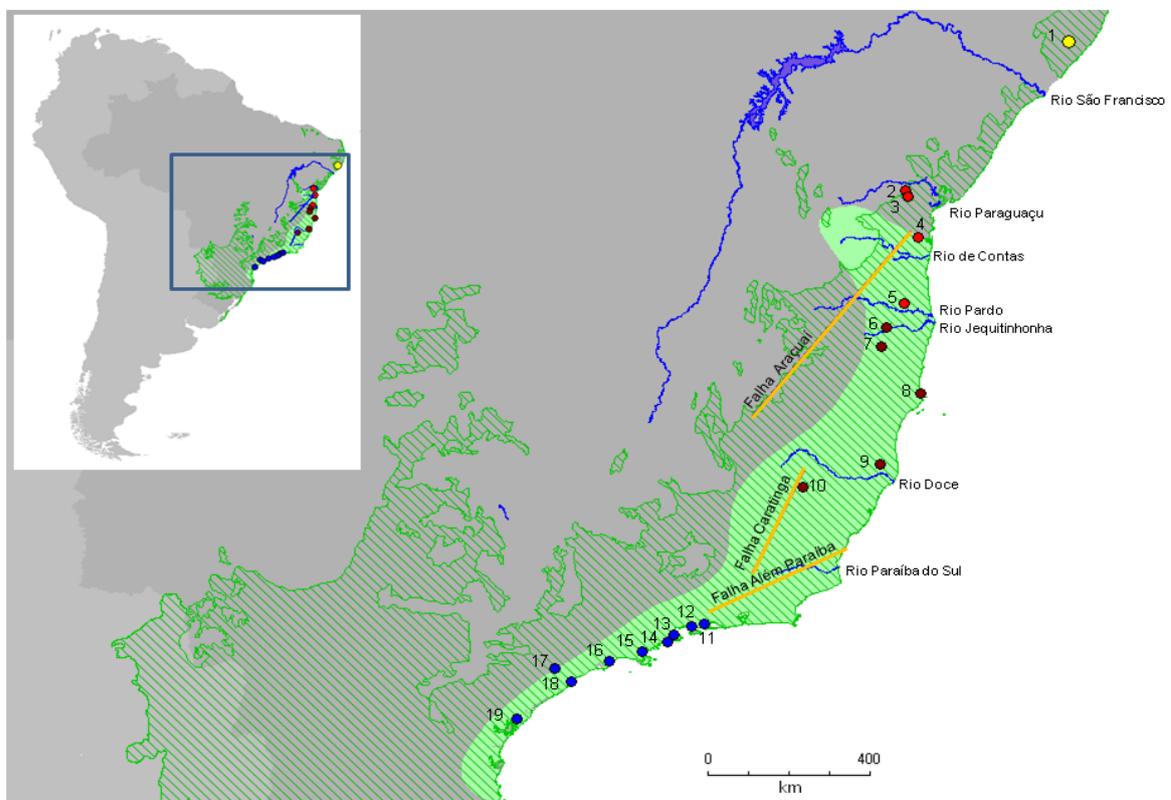


Figura 2. Mapa com as localidades amostradas representadas pelos círculos coloridos, os números estão de acordo com a Tabela 1. A área em verde claro corresponde à distribuição de *Drymophila squamata* (INFONATURA, 2007), a área hachurada em verde corresponde à área original de mata Atlântica, em cinza escuro o território brasileiro e em cinza claro os demais países da América do Sul. Os principais rios e três falhas geográficas que ocorrem ao longo do bioma estão indicados. No canto superior esquerdo encontra-se o mapa da América do Sul mostrando a área em destaque.

Tabela 1. Amostras de *Drymophila squamata*. Número da localidade no mapa da Figura 2 (#Mapa); localização geográfica (Localidade, Estado, Latitude, Longitude); identificação na coleção (Amostra).

#Mapa	Localidade	Estado	Latitude	Longitude	Amostra
1	Murici	AL	-9.22119	-35.87919	15912 <sup>1</sup> , 15913 <sup>1</sup>
2	Santa Terezinha	BA	-12.74980	-39.51840	DA786 <sup>2</sup> , DA788 <sup>2</sup>
3	Elísio Medrado	BA	-12.87042	-39.47808	14955 <sup>1</sup> , 14999 <sup>1</sup> , 15003 <sup>1</sup> , 15011 <sup>1</sup> , 15027 <sup>1</sup> , 15038 <sup>1</sup> , 15040 <sup>1</sup>
4	Igrapiúna	BA	-13.84136	-39.24111	14792 <sup>1</sup> , 14866 <sup>1</sup> , 14867 <sup>1</sup> , 14906 <sup>1</sup> , 14924 <sup>1</sup> , 14938 <sup>1</sup> , 16116 <sup>1</sup> , 16160 <sup>1</sup>
5	Camacan	BA	-15.39411	-39.56231	SSB132 <sup>1</sup> , SSB133 <sup>1</sup> , SSB134 <sup>1</sup> , SSB136 <sup>1</sup> , SSB137 <sup>1</sup>
6	Salto da Divisa	MG	-15.98333	-39.95000	B0606 <sup>3</sup> , B0607 <sup>3</sup> , B0609 <sup>3</sup>
7	Santa Maria do Salto	MG	-16.41206	-40.05553	15444 <sup>1</sup> , 15452 <sup>1</sup> , 154681 <sup>1</sup> , 15488 <sup>1</sup> , 15499 <sup>1</sup>
8	Alcobaça	BA	-17.51944	-39.19556	B3289 <sup>3</sup> , B4155 <sup>3</sup>
9	Sooretama	ES	-19.19694	-40.09778	10293 <sup>1</sup> , B3500 <sup>3</sup>
10	Caratinga	MG	-19.78333	-42.13333	B0647 <sup>3</sup> , B0626 <sup>3</sup> , B0645 <sup>3</sup> , B0648 <sup>3</sup> , B0649 <sup>3</sup> , B0650 <sup>3</sup> , B0662 <sup>3</sup> , B0668 <sup>3</sup> , B0669 <sup>3</sup>
11	Mangaratiba	RJ	-22.95970	-44.04110	RBO138 <sup>6</sup> , RBO139 <sup>6</sup> , RBO140 <sup>6</sup>
12	Angra dos Reis	RJ	-23.01000	-44.31840	DS01 <sup>4</sup> , DS08 <sup>4</sup> , DS13 <sup>4</sup> , DS18 <sup>4</sup>
13	Paraty	RJ	-23.21778	-44.71306	12010 <sup>1</sup> , DHF106 <sup>6</sup> , DHF089 <sup>6</sup> , DHF091 <sup>6</sup>
14	Picinguaba	SP	-23.37750	-44.83973	S353 <sup>5</sup> , S354 <sup>5</sup> , S355 <sup>5</sup> , S356 <sup>5</sup> , S357 <sup>5</sup>
15	Caraguatatuba	SP	-23.62028	-45.41306	S177 <sup>5</sup> , S178 <sup>5</sup> , S179 <sup>5</sup>
16	Bertioga	SP	-23.85444	-46.13861	10329 <sup>1</sup> , 10330 <sup>1</sup>
17	São Paulo	SP	-24.02778	-47.60111	12242 <sup>1</sup>
18	Peruíbe	SP	-24.37778	-47.04028	12061 <sup>1</sup>
19	Guaraqueçaba	PR	-25.20306	-48.23222	14670 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>LGEMA: Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves da Universidade de São Paulo; <sup>2</sup>MZUEFS: Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana; <sup>3</sup>UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>4</sup>PUC RJ: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro; <sup>5</sup>UFSCar: Universidade Federal de São Carlos; <sup>6</sup>UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### *Extração de DNA*

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo modificado de Bruford *et al.* (1992). Cada amostra (sangue ou músculo) foi digerida por 4 h a 55°C em uma solução contendo 300 µl de TNE (50 mM Tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de EDTA), 30 µl de Tris-HCl 1M (pH 7,5), 10 µl de SDS 20%, 20 µl de proteínase K (20 mg/ml). Após a digestão acrescentamos 400 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), o material foi misturado e centrifugado por 10 minutos a 12 krpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 800 µl de etanol absoluto. A seguir foi realizada uma lavagem com 300 µl de etanol 70% e foi centrifugado por 10 minutos a 12 krpm. O precipitado foi seco em bomba à vácuo por 30 minutos e ressuspendido em 100 µl de TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA).

### *Obtenção de sequências*

O DNA genômico foi amplificado para três marcadores moleculares: a subunidade 2 do gene mitocondrial NADH desidrogenase (ND2), o íntron 7 do gene nuclear β-fibrinogênio (FIB7) e o íntron 11 do gene nuclear gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PDH). O ND2 foi inicialmente amplificado com os *primers* externos GLN5146L (5'-GAACCTACACARAAGRGATCA-3'; Pereira, comunicação pessoal) e H6313TRP (SORENSEN *et al.*, 1999). No entanto, a análise posterior das sequências obtidas revelou que o produto possivelmente era uma cópia nuclear (*numt*). Assim, outro *primer forward* (L5215, 5'-TATCGGCCCATACCCCGAAAAT-3'; HACKETT, 1996) foi utilizado com o *primer* H6313TRP para amplificar o ND2. O FIB7 foi amplificado utilizando os *primers* FIB-BI7U e FIB-BI7L (PRYCHITKO & MOORE, 1997). Para o G3PDH foram utilizados os *primers* G3PL890 e G3PH950 (FRIESEN *et al.*, 1997). As PCRs foram realizadas em volume final de 25 µl contendo 1x OneTaq®HS Quick-Load® com tampão padrão, *primer* a 10µM e 10 ng de DNA genômico. As condições de amplificação foram: 95°C por 5 minutos; 30 ciclos à 95°C por 30 segundos, temperatura de *annealing* específica para cada par de *primers* (ver a seguir) por 30 segundos e 72°C por 40 segundos; extensão final a 72°C por 10 minutos. Para o par L5215/H6313TRP a temperatura de *annealing*

usada foi 51°C, para FIB-BI7U/FIB-BI7U foi 55°C e para o G3PL890/G3PH950 foi 56°C.

Os fragmentos amplificados foram verificados em gel de agarose e purificados utilizando 0,25 µl de Exonuclease I (Fermentas, 20 U/µl) e FastAP Alkaline Phosphatase (Fermentas, 1 U/µl) misturadas na proporção 1:4 e incubadas por 30 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C. Os produtos foram sequenciados pela empresa Macrogen Inc. (USA), exceto as sequências de ND2 para as quais após a purificação foi realizada a reação de sequenciamento utilizando os mesmos *primers* da reação de PCR (L5215 e H6313TRP) e o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento do ND2 foi realizado no sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) no GaTE Lab-USP (Prof<sup>a</sup>. Marie-Anne Van Sluys).

#### *Alinhamentos e análise da diversidade genética das sequências*

As sequências foram verificadas e editadas no programa CodonCode Aligner v.3.7.1. A seguir foram alinhadas usando o método Muscle (EDGAR, 2004). As reconstruções dos haplótipos para o FIB7 e G3PDH foram realizadas utilizando o método bayesiano do Phase (STEPHENS *et al.*, 2001; STEPHENS & DONNELLY, 2003). O teste phi foi realizado no programa SplitsTree versão 4.13.1 (BRUEN *et al.*, 2006; HUSON & BRYANT, 2006) para identificar se havia sinal de presença de recombinação nos marcadores.

Os cálculos de número de sítios segregantes (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e nucleotídica ( $\pi$ ) foram realizados no DnaSP v.5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009).

#### *Análises de estrutura genética e demográficas*

A estrutura populacional foi avaliada por meio da análise das redes de haplótipos obtidas usando o algoritmo *median-joining* disponível no programa Network v.4.6.13 (BANDELT *et al.*, 1999). Para avaliar se havia estrutura significativa entre os grupos de haplótipos observados na rede foi realizado um teste de  $F_{ST}$  e uma análise de variância molecular (AMOVA) usando o programa Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

Para cada marcador foi obtida uma árvore de máxima verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap* no programa Mega 6 (TAMURA *et al.*, 2013) e utilizando o modelo de substituição indicado para cada marcador no jModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003). Uma árvore foi obtida por inferência bayesiana baseado no ND2 utilizando o programa \*BEAST (HELED & DRUMMOND, 2010) implementando no BEAST 1.8.1 (DRUMMOND *et al.*, 2012). Embora esse método seja mais usado para análises multilocos, também é recomendado para ser utilizado com um único gene, uma vez que possibilita uma avaliação mais realística do suporte posterior dos cladogramas, ou seja, aumenta os intervalos de credibilidade dos agrupamentos (DRUMMOND, comunicação pessoal). Nessa análise foram utilizadas como grupo externo para enraizamento as sequências de *Dryomophila genei* (BRUMFIELD *et al.*, 2007) e de *Hypocnemis cantator* (NAKA *et al.*, 2012) disponíveis no GenBank.

Foram realizados testes de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989) e  $F_s$  de Fu (FU, 1997), teste de crescimento populacional  $R_2$  (RAMOS-ONSINS & ROZAS, 2002) e análise de *mismatch distribution* (modelo população crescimento-declínio; ROGERS & HARPENDING, 1992) no DnaSP v.5.1 (LIBRADO & ROZAS, 2009). As significâncias de todos os testes foram obtidas com base em 1.000 simulações coalescentes.

O programa BEAST 1.8.1 (DRUMMOND *et al.*, 2012) foi usado para inferir mudanças no tamanho populacional ao longo do tempo utilizando o método *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) incluindo todos os marcadores, como sugerido por Heled & Drummond (2008). Para a análise do EBSP utilizamos os seguintes parâmetros: modelos evolutivos de substituição nucleotídica calculados pelo programa jModelTest para cada marcador (DARRIBA *et al.*, 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003); taxa de substituição nucleotídica do DNAm de 1,05% por linhagem por milhão de anos (WEIR & SCHLUTER, 2008). As taxas para os íntrons foram estimadas com relação ao DNAm. Foi utilizada uma árvore inicial obtida por UPGMA e modelo linear; e 100 a 300 milhões de passos de MCMC dependendo da qualidade da análise verificada pelo programa Tracer 1.6 (RAMBAUT *et al.*, 2014), com estimativas independentes a cada 100 milhões de passos. A frequência de amostragem foi estabelecida a cada 1.000 passos e 10% de *burn-in*. Para os casos

em que a cadeia de MCMC foi maior de 100 milhões de passos, os resultados das corridas independentes foram combinados pelo LogCombiner 1.8.1 (extensão do BEAST 1.8.1). A seguir os gráficos resultantes foram plotados utilizando o *script* EBSPlot na plataforma R (CAMPOS JUNIOR, comunicação pessoal).

#### *Árvores de espécies e tempos de divergência*

A árvore de espécie foi calculada pelo método bayesiano \*BEAST (HELED & DRUMMOND, 2010) implementando no BEAST 1.8.1 (DRUMMOND *et al.*, 2012). Uma limitação dessa análise é a necessidade de inclusão de dados completos dos indivíduos, ou seja, indivíduos sem sequência de um dos marcadores não podem ser incluídos. Assim, a árvore de espécies foi obtida com 37 dos 69 indivíduos devido a falhas no sequenciamento ou baixa probabilidade de determinação da fase gamética. Pelo mesmo motivo utilizamos como grupo externo para enraizar a árvore um gênero de *Thamnophilidae* para o qual havia sequências de todos os marcadores disponíveis no GenBank (ND2 de *Pyriglena leucoptera*, MALDONADO COELHO, 2012; FIB7 de *Pyriglena leucoptera*, CHESSER, 2004 e G3PDH de *Pyriglena leuconota*, IRESTED *et al.*, 2004). Ainda para essa análise, foi incluída a informação da existência das quatro linhagens identificadas nas análises anteriores de estrutura populacional (Nordeste, Norte, Centro e Sul; ver resultados). O modelo de substituição adotado para cada marcador foi o indicado pelo jModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012; GUINDON & GASCUEL, 2003). Para inferir a árvore de espécies no BEAUti 1.8.1 (parte do pacote BEAST 1.8.1), os modelos de substituição nucleotídica, a taxa de substituição nucleotídica e a estimativa de árvores de genes foram considerados independentemente para cada marcador. Foi adotada a taxa de substituição nucleotídica de 1,05% por linhagem por milhão de anos para o ND2 (WEIR & SCHLUTER, 2008). As taxas de substituição dos íntrons foram estimadas em relação à taxa mitocondrial no BEAST 1.8.1 e verificadas no Tracer 1.6 (RAMBAUT *et al.*, 2014). O processo de Yule foi adotado como *prior* para a árvore de espécies e foi assumido modelo de tamanho populacional *piecewise linear & constant root*. Foram realizadas três corridas independentes de mesmo comprimento, sendo  $10^8$  passos de MCMC cada, amostrados a cada 1000 passos, com *burn-in* de 10%. Os resultados foram analisados no programa Tracer 1.6

(RAMBAUT *et al.*, 2014) para monitorar os valores de *effective sample size* (ESS). As três corridas e suas respectivas árvores foram combinadas no LogCombiner 1.8.1 (DRUMMOND *et al.*, 2012). A construção e edição da árvore de espécies foram feitas nos programas TreeAnnotator 1.8.1 (parte do pacote BEAST 1.8.1) e FigTree 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

#### *Simulações com computação Bayesiana aproximada (ABC)*

Foram realizadas simulações de quatro cenários de diversificação para entender a relação entre os filogrupos (Nordeste, Norte, Centro e Sul) utilizando o programa DIYABC 2.0.4 (CORNUET *et al.*, 2014). Foram considerados todos os 69 indivíduos e seus três marcadores (ND2, FIB7 e G3PDH).

No cenário A, foi considerado que a primeira divergência ocorreu entre o Nordeste e as demais linhagens, a segunda divergência ocorreu entre Sul em relação a Norte e Centro, e a terceira separou Norte e Centro (Apêndice 1). No cenário B, a primeira divergência teria ocorrido entre Nordeste e as demais linhagens, a segunda divergência teria separado Norte de Centro e Sul, e a terceira, Centro e Sul (Apêndice 1). No cenário C, a primeira divergência separou Nordeste das demais linhagens e a segunda divergência separou Norte, Centro e Sul ao mesmo tempo (Apêndice 1). No cenário D, os quatro filogrupos teriam divergido entre si ao mesmo tempo (Apêndice 1).

Para cada cenário proposto foram simulados 250.000 valores para cada estatística sumária (ver a seguir), ou seja, na simulação dos quatro cenários de divergência foi gerada uma tabela de referência com um milhão de valores simulados para cada estatística sumária. As estatísticas sumárias calculadas para cada linhagem foram: número de haplótipos, número de sítios segregantes, média de diferenças par a par, variância no número de diferenças par a par, D de Tajima, número de sítios segregantes privados (presentes em apenas uma linhagem) e média do número de nucleotídeos mais raros dentre o sítios segregantes. As estatísticas sumárias calculadas entre cada par de linhagens foram: número de haplótipos diferentes, número de sítios segregantes, média de diferenças par a par dentro de cada linhagem, média de diferenças par a par entre as populações e  $F_{ST}$  entre as linhagens.

Esses valores foram simulados de acordo com os seguintes *priors*:

$N_e \sim U [10; 10^6]$

$t_2 \sim U [10^3; 10^6]$

$t_3 \sim U [10^3; 10^6]$

$t_4 \sim U [10^3; 3 \times 10^6]$

Onde  $N_e$  é o tamanho efetivo populacional com distribuição uniforme variando entre 10 e  $10^6$  para cada linhagem que aqui foram chamados de NE o grupo com as amostras do Nordeste, N o grupo com as amostras do Norte, C o grupo com as amostras do Centro e S o grupo com as amostras do Sul (ver resultados). Os tempos de divergências  $t_2$ ,  $t_3$  e  $t_4$  também foram estimados com *priors* uniformes conforme determinado acima e foi imposta a condição de  $t_2 < t_3 < t_4$ , uma vez que os intervalos estipulados na distribuição uniforme para esses tempos são sobrepostos.

Para decidir qual dos cenários melhor se adequou aos valores de estatísticas sumárias observadas, ou seja, qual possuiu as estatísticas sumárias simuladas mais próximas às observadas, foram usadas duas metodologias. Inicialmente todos os valores simulados para os cenários foram organizados dos mais próximos aos dados observados até os mais distantes. Em seguida, dentre o um milhão de valores simulados de estatística sumária, 1% (segundo recomendação do programa DIYABC) dos dados mais próximos aos dados observados foram selecionados, ou seja, 10000 valores de cada estatística sumária, sendo 2500 valores para cada cenário. Pela metodologia direta, o cenário que gerou o maior número desses valores simulados seria selecionado. Já a metodologia baseada em regressão logística requereu o cálculo de uma regressão logística ponderada baseada em 1 % (por recomendação do programa DIYABC) de valores simulados de estatística sumária. As proporções de cada cenário foram consideradas como as variáveis dependentes e as diferenças entre as estatísticas sumárias obtidas com esses valores simulados e as observadas foram as variáveis independentes. Os pontos de intercepção das regressões dos quatro cenários (que correspondem à identidade entre as estatísticas sumárias simuladas e as dos dados observados) foram usados como estimativas pontuais das probabilidades dos cenários (BEAUMONT, 2008). E o cenário com maior probabilidade foi selecionado. As duas metodologias resultaram no mesmo melhor cenário (ver Resultados). Foi também realizada uma análise para

verificar erros de tipo I e II na seleção do melhor cenário. Ou seja, o melhor cenário foi comparado com o segundo e terceiro melhores cenários para avaliar se a escolha foi confiável no DIYABC.

Para o cenário escolhido foram estimados o tamanho efetivo populacional de cada linhagem e seus tempos de divergência. Também foram avaliados quão bem os cenários e as *priors* escolhidas para os parâmetros se adequaram aos dados observados pela análise de avaliação do modelo (*model checking*) disponível no programa (CORNUET *et al.*, 2010; 2014).

### 2.3 Resultados

Foram obtidos 1032 pb do ND2 para 53 amostras. Não foram observados códons de parada inesperados ou bases ambíguas nos eletroferogramas dessas sequências, sugerindo que sejam funcionais. Para os íntrons obtivemos 849 pb do FIB7 para 55 amostras e 416 pb do G3PDH para 60 amostras. O teste phi não indicou evidência de recombinação em nenhum dos dois marcadores e após a resolução da fase gamética pelo Phase, obtivemos 102 sequências para o FIB7 e 118 para o G3PDH com alta probabilidade. No FIB7 foi encontrado um *indel* de 5pb em algumas sequências, que não correspondeu a nenhuma linhagem específica.

A rede de haplótipos baseada nos dados do ND2 (Figura 3A) apresentou quatro linhagens com congruência com suas distribuições geográficas: Nordeste (amostras do Estado de Alagoas), Norte (amostras do norte da distribuição até as proximidades do rio Jequitinhonha), Centro (amostras de Salto da Divisa, margem esquerda do rio Jequitinhonha até Caratinga na margem direita do rio Doce) e Sul (amostras coletadas ao sul do rio Paraíba do Sul). Essas linhagens não foram recuperadas nas redes de haplótipos dos íntrons, exceto o agrupamento das amostras do Nordeste (Figura 3B, C).

As árvores de máxima verossimilhança (Figura 4) e bayesiana (Figura 5) obtidas baseadas no ND2 recuperaram as mesmas quatro linhagens. Na análise de máxima verossimilhança foi observado alto suporte ( $>0,97$ ) para os filogrupos Nordeste e Sul (Figura 4). Assim, essa análise indica uma politomia com três filogrupos: Nordeste, Centro+Norte e Sul. Já a análise bayesiana recuperou as



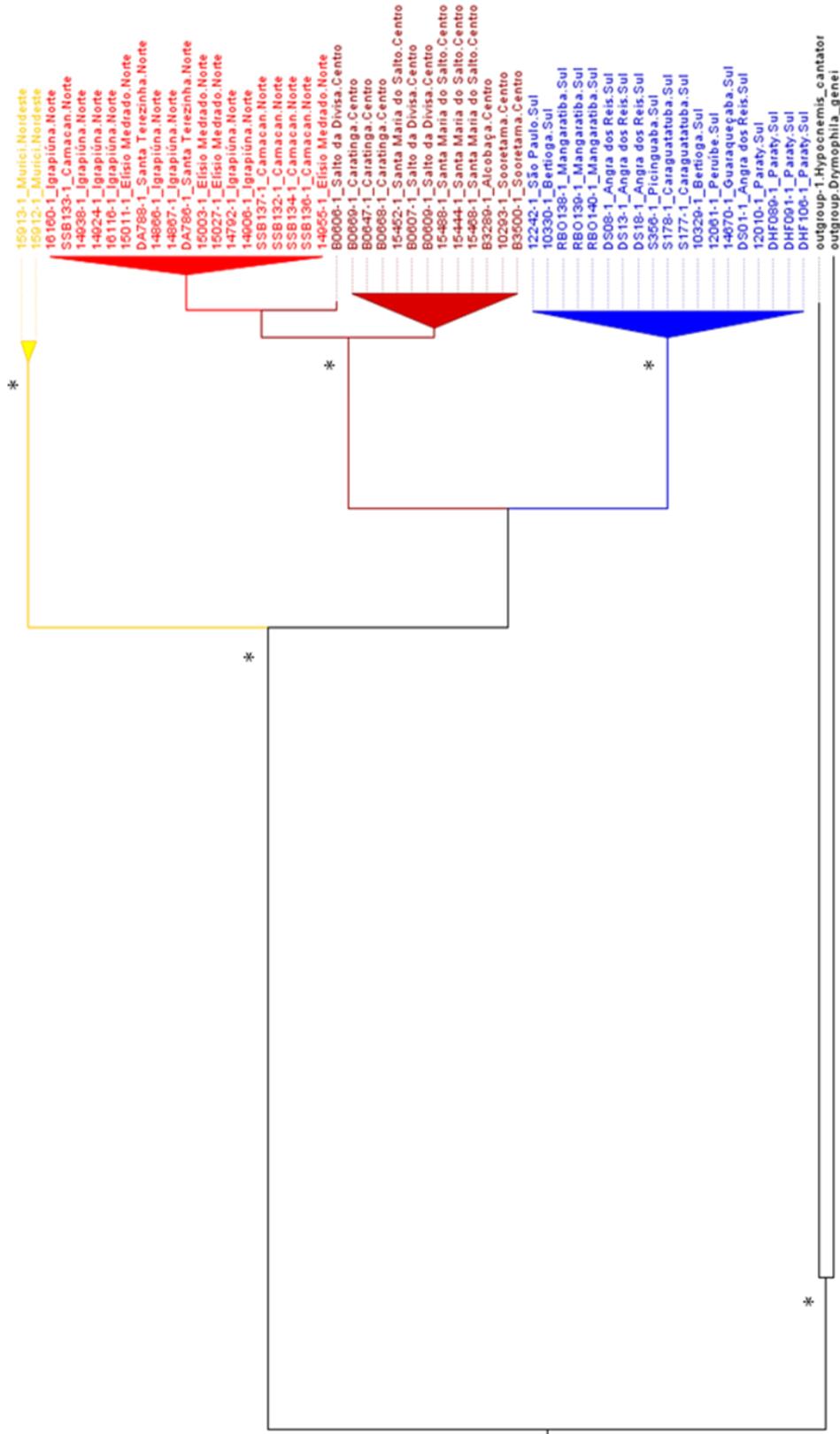


Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança baseada em 1032 pb do ND2 de *Drymophila squamata*. Nós com *bootstrap* acima de 0,97 estão indicados com asterisco. As cores correspondem aos grupos de localidades da Figura 2: nordeste – amarelo, norte – vermelho, centro – vinho e sul – azul.

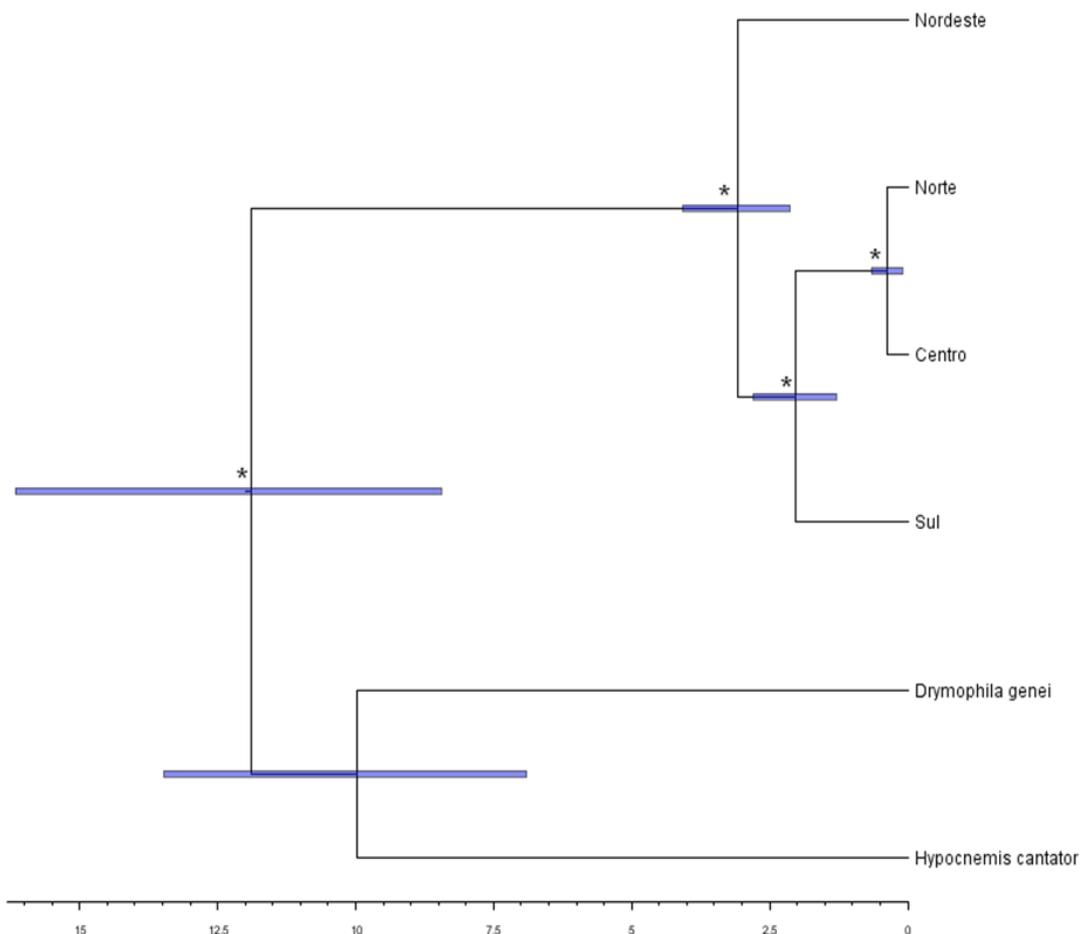


Figura 5. Árvore obtida por inferência bayesiana com base em 1032 pb do ND2 de *Drymophila squamata*. Nós com valores de probabilidade posterior maiores que 98% estão indicados com asteriscos.

Para verificar o grau de diferenciação entre as quatro linhagens observadas nas análises das redes de haplótipos e das árvores de máxima verossimilhança e bayesiana, foi calculado o  $F_{ST}$  entre as linhagens com base nos dados do ND2. Os valores de  $F_{ST}$  foram todos elevados e significativos, indicando grande diferenciação entre eles (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da estatística  $F_{ST}$  entre grupos baseado em 1032 pb de ND2 de *Drymophila squamata*.

	Nordeste	Norte	Centro	Sul
Nordeste	0			
Norte	0.97422*	0		
Centro	0.97157*	0.85438*	0	
Sul	0.98072*	0.96884*	0.9709*	0

p<0,05

A análise de variância molecular (AMOVA) baseada nos dados mitocondriais corroborou esse resultado. Foi encontrado que 96,1% da diversidade genética ocorreu entre os grupos e apenas 3,9% da diversidade, dentro de cada grupo, ou seja, os grupos apresentam grande variação entre eles e baixa variação dentro das localidades de cada grupo.

Foram calculadas as estatísticas sumárias (Tabela 3) e realizadas as análises demográficas (Tabela 3, Figura 6, Apêndice 4) considerando cada uma das quatro linhagens separadamente. Foram identificadas evidências de expansão populacional nas linhagens Norte e Sul. No grupo Norte os valores de  $F_s$  de  $F_u$  foram negativos e significativos para o ND2 e para o G3PDH e o teste populacional  $R_2$  foi significativo (Tabela 3). O teste de *mismatch distribution* também indicou expansão baseado no ND2 e G3PDH (Apêndice 4). No grupo Sul os dados de ND2 resultaram em D de Tajima e  $F_s$  de  $F_u$  negativos e significativos e  $R_2$  significativo (Tabela 3). O *mismatch distribution* do ND2 e G3PDH também indicaram expansão (Apêndice 4). A análise multilocus EBSP evidenciou expansão demográfica recente para o Norte, a qual teria se iniciado no último máximo glacial (UGM; Figura 6A), e para o Sul, tendo se iniciado após o UMG (cerca de 10 mil anos atrás; Figura 6C). Embora o intervalo de credibilidade seja amplo, a expansão foi confirmada pela análise no Tracer, no qual foi identificada mudança no tamanho populacional. Não foi possível realizar a análise de EBSP para a linhagem Nordeste, pois somente duas sequências de ND2 foram obtidas (necessário pelo menos três). Para a linhagem Centro nenhuma das estatísticas sumárias (Tabela 3) indicou evidência de expansão demográfica, nem os testes *mismatch distribution* (Apêndice 4) e nem a análise de EBSP (Figura 6B).

Tabela 3. Estatísticas sumárias de *Drymophila squamata* considerando quatro filogrupos. Número de sequências analisadas (N), tamanho da sequência alinhada em pares de base (pb), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), testes de neutralidade D de Tajima (D) e  $F_s$  de  $F_u$  ( $F_s$ ) e teste demográfico de Ramos-Onsins e Rozas's ( $R_2$ ).

	N	pb	S	h	Hd	$\pi$	D	$F_s$	$R_2$
<b>Nordeste</b>									
ND2	2	1032	3	2	1	0.0029	s.d.	1.099	0.5
FIB7	4	849	12	2	0.5	0.0071	-0.841	4.419	0.4330
G3PDH	4	416	0	1	0	0	s.d.	s.d.	s.d.

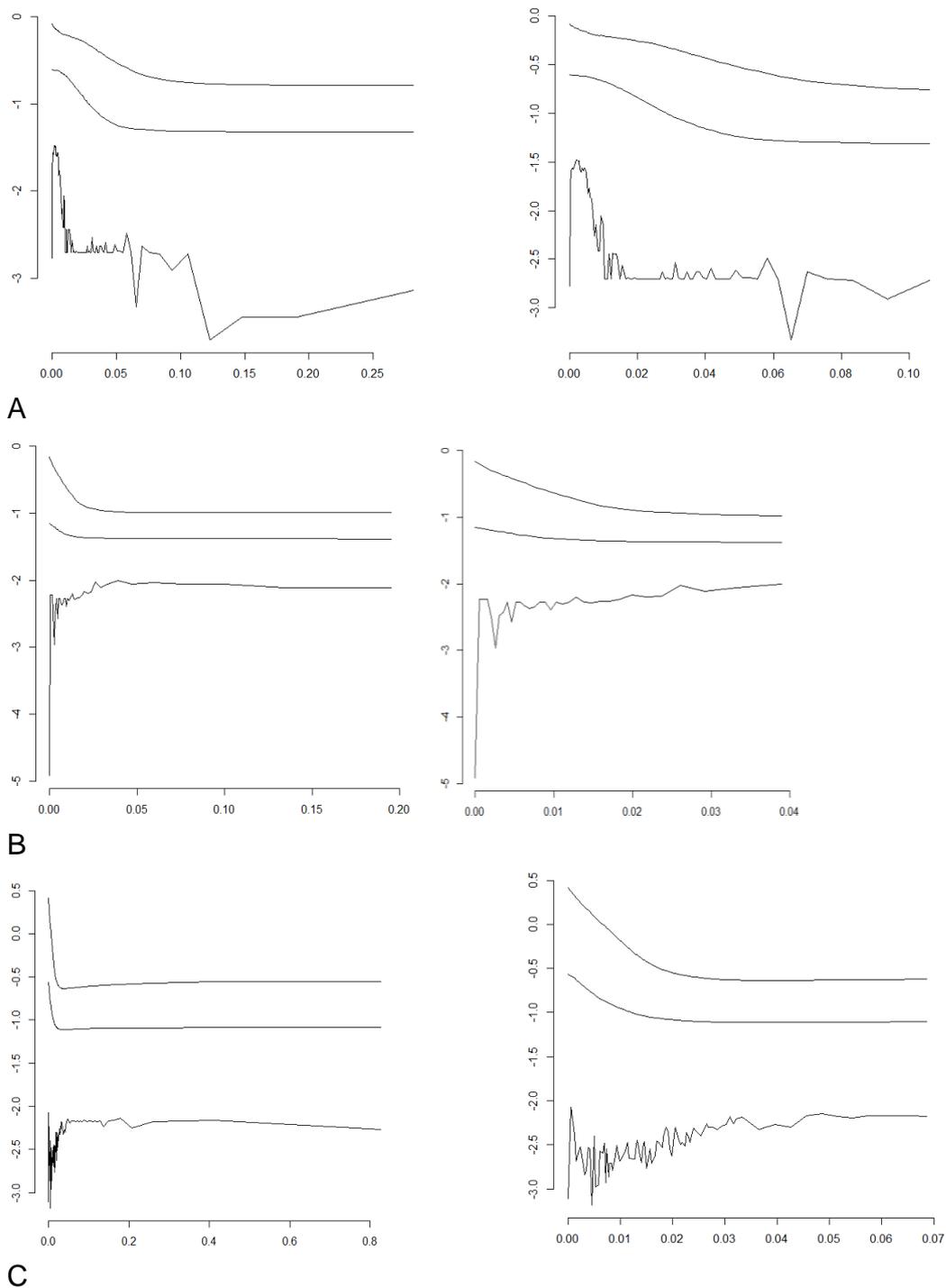
Continuação da Tabela 3.

	<b>N</b>	<b>pb</b>	<b>S</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b>Π</b>	<b>D</b>	<b>F<sub>s</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>Norte</b>									
ND2	19	1032	7	8	0.854	0.0013	-1.038	-3.763*	0.0899*
FIB7	36	849	30	18	0.917	0.0071	-0.566	-3.853	0.0966
G3PDH	42	416	3	5	0.225	0.0009	-1.041	-3.114*	0.0727
<b>Centro</b>									
ND2	13	1032	7	5	0.628	0.0014	-1.378	-0.863	0.1285
FIB7	28	849	27	15	0.868	0.0087	0.2122	-1.81	0.1305
G3PDH	24	416	0	1	0	0	s.d.	s.d.	s.d.
<b>Sul</b>									
ND2	19	1032	6	6	0.602	0.0009	-1.517*	-2.638*	0.0785*
FIB7	42	849	21	10	0.757	0.0078	1.1634	2.748	0.1552
G3PDH	48	416	1	2	0.284	0.0007	0.3517	0.844	0.1418

\*  $p < 0,05$ ;

s.d.: sem dados suficientes para realizar a análise.

A inferência da árvore de espécie foi realizada baseada nos três marcadores e apresentou alto suporte para o filogrupo Nordeste e para o agrupamento dos filogrupos Norte, Centro e Sul (probabilidade posterior >99%). Já o suporte do agrupamento dos filogrupos Centro e Sul foi muito baixo (47%; Figura 7). Os tempos estimados entre os filogrupos na árvore de espécies estão indicados nos nós da árvore na Figura 7 e indicam que o Nordeste teria divergido dos demais filogrupos no Pleistoceno inferior há 1,108 milhão de anos e os filogrupos Norte, Centro e Sul teriam divergido no Pleistoceno médio (Figura 7).



**C**  
 Figura 6. Análises demográficas multilocus *extended Bayesian skyline plot* (EBSP) baseadas em 1032 pb do ND2, 849 pb do FIB7 e 416 pb do G3PDH concatenados de *Drymophila squamata*. O eixo x representa o tempo em milhões de anos e o eixo y, o tamanho populacional em escala logarítmica. A curva interna mostra a distribuição das medianas e os traços externos representam os limites da distribuição dos 95% HPD. ,A) filogruppo Norte: à esquerda os últimos 250 mil anos e à direita os últimos 100 mil anos. B) filogruppo Centro: à esquerda os últimos 200 mil anos e à direita os últimos 40 mil anos. C) filogruppo Sul: à esquerda os últimos 800 mil anos e à direita os últimos 70 mil anos.

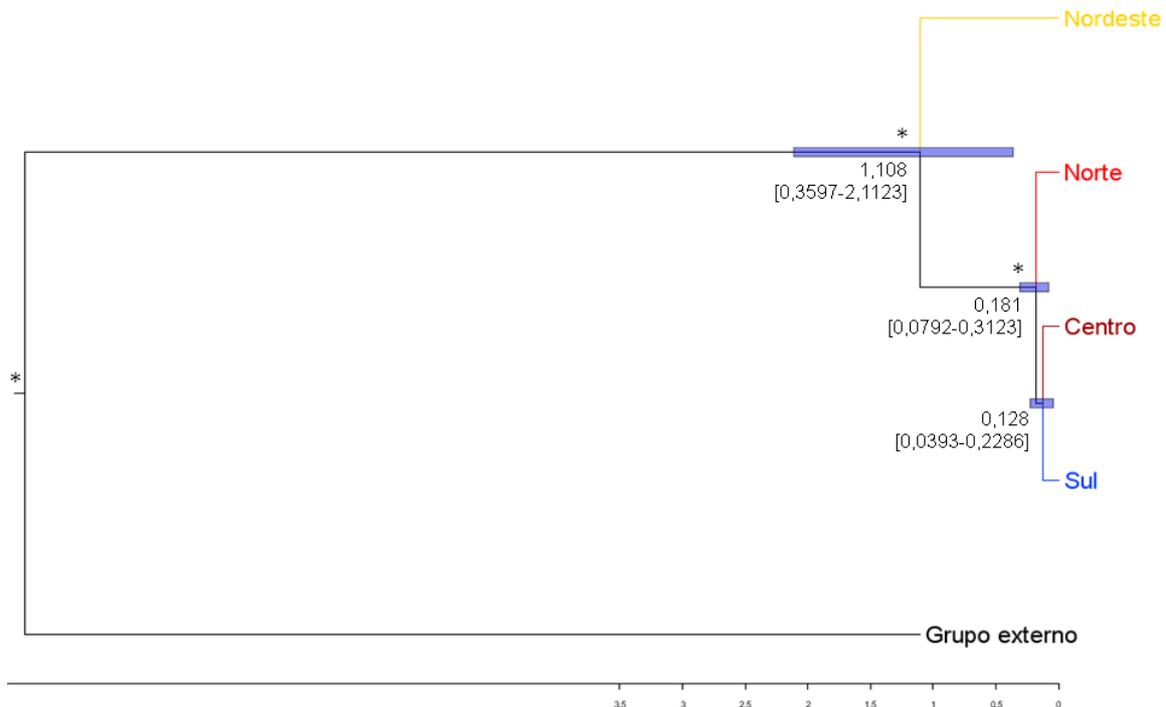


Figura 7. Árvore de espécie estimada baseada em 1032 pb do ND2, 849 pb do FIB7 e 416 pb do G3PDH concatenados de *Drymophila squamata*. Abaixo dos nós estão os valores médios das datas de divergência estimadas (em milhões de anos) e entre colchetes, os valores de 95% HPD (também representados pelas barras azuis). Os asteriscos indicam probabilidade posterior do nó maior que 0,99. A escala em baixo está em milhões de anos.

Baseado nos resultados, testamos quatro cenários para a diversificação de *D. squamata* (Apêndice 1). O cenário A (primeira divergência entre o Nordeste e as demais linhagens, segunda divergência separando Norte e Centro de Sul, e a terceira, Norte e Centro) apresentou a maior probabilidade posterior (Figura 8). O teste de credibilidade indicou que o cenário escolhido foi, de fato, recuperado com probabilidade posterior mais vezes do que os outros cenários.

Na tabela 4 estão as estimativas posteriores dos parâmetros de tamanho efetivo populacional de cada grupo e os tempos de divergências entre eles. Podemos verificar pelas datações estimadas que o clado Nordeste teria divergido há cerca de 1,1 Ma dos outros clados, os quais teriam divergido em tempos próximos no Pleistoceno médio, Norte e Centro divergido do Sul há 200 mil anos e Norte e Centro com a divergência mais recente há 114 mil anos (Tabela 4, mediana dos tempos de divergência).

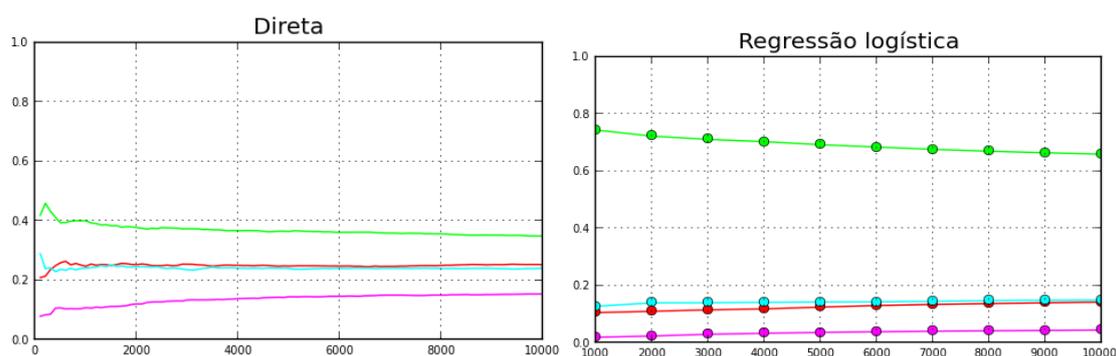


Figura 8. Estimativa direta e regressão logística para escolha do cenário de diversificação com maior probabilidade. Em verde cenário A, em vermelho cenário B, em azul ciano cenário C e em rosa cenário D. O eixo y indica a probabilidade posterior e o eixo x o número de simulações usado na estimativa.

Tabela 4. Valores de parâmetros estimados *a posteriori* para *Drymophila squamata* assumindo o cenário A. Valores de média, mediana, moda e de intervalos de credibilidade (5%, 25%, 75% e 95%).

Parâmetro	Média	Mediana	Moda	5%	25%	75%	95%
NE	$2.58 \times 10^5$	<b><math>1.98 \times 10^5</math></b>	$1.17 \times 10^5$	$4.56 \times 10^4$	$1.11 \times 10^5$	$3.45 \times 10^5$	$6.94 \times 10^5$
N	$5.47 \times 10^5$	<b><math>5.44 \times 10^5</math></b>	$5.24 \times 10^5$	$2.27 \times 10^5$	$4.03 \times 10^5$	$6.86 \times 10^5$	$8.95 \times 10^5$
C	$5.10 \times 10^5$	<b><math>5.06 \times 10^5</math></b>	$4.92 \times 10^5$	$2.21 \times 10^5$	$3.83 \times 10^5$	$6.31 \times 10^5$	$8.20 \times 10^5$
S	$4.85 \times 10^5$	<b><math>4.77 \times 10^5</math></b>	$5.09 \times 10^5$	$1.97 \times 10^5$	$3.55 \times 10^5$	$6.04 \times 10^5$	$8.12 \times 10^5$
t2	$1.35 \times 10^5$	<b><math>1.14 \times 10^5</math></b>	$8.79 \times 10^4$	$3.89 \times 10^4$	$7.60 \times 10^4$	$1.68 \times 10^5$	$3.01 \times 10^5$
t3	$2.63 \times 10^5$	<b><math>2.00 \times 10^5</math></b>	$1.03 \times 10^5$	$5.61 \times 10^4$	$1.19 \times 10^5$	$3.39 \times 10^5$	$7.20 \times 10^5$
t4	$1.22 \times 10^6$	<b><math>1.11 \times 10^6</math></b>	$8.42 \times 10^5$	$3.97 \times 10^5$	$7.60 \times 10^5$	$1.57 \times 10^6$	$2.48 \times 10^6$

NE: tamanho efetivo do grupo Nordeste, N: tamanho efetivo do grupo Norte, C: tamanho efetivo do grupo Centro, S: tamanho efetivo do grupo, t2: tempo de diversificação entre Norte e Centro, t3: tempo de diversificação entre Norte+Centro e Sul, t4: tempo de diversificação entre Nordeste e os demais grupos.

## 2.4 Discussão

Foi observada estruturação genética em *Drymophila squamata* nas análises baseadas em mtDNA (redes de haplótipos, árvores de máxima verossimilhança e bayesiana,  $F_{ST}$  e AMOVA) com quatro filogrupos, aqui chamados de Nordeste, Norte, Centro e Sul. A linhagem Nordeste corresponde à população disjunta da espécie no extremo norte da distribuição (Figura 2). O Norte agrupa amostras obtidas entre as latitudes -12,75 e -15,39, no norte da parte contínua da distribuição. O Centro inclui as amostras da região central da mata Atlântica (faixa latitudinal

entre -16,41 e -15,98). O Sul reúne as amostras coletadas ao sul do rio Paraíba do Sul.

No entanto, nas análises com base nos íntrons as linhagens mitocondriais não foram recuperadas, exceto a linhagem Nordeste nas análises com G3PDH (rede de haplótipos e árvore de máxima verossimilhança). Essa incongruência de resultados obtidos com os marcadores nucleares e os obtidos com marcador mitocondrial pode ocorrer por sorteamento incompleto das linhagens desses íntrons, devido ao maior tempo de coalescência para o DNA nuclear em relação ao mitocondrial. Isso está relacionado às taxas de mutação serem mais lentas para o FIB7 e G3PDH em relação à do ND2. Segundo a literatura, os íntrons de aves apresentam taxas de mutação 10 vezes menor do que a de genes mitocondriais (ELLEGREN, 2007; WEIR & SCHLUTER, 2008), a mesma proporção foi estimada no presente estudo.

Uma maneira de lidar com a aparente incongruência associada às características inerentes aos marcadores é inferir uma árvore de espécie, uma vez que o método acomoda as diferentes árvores de genes resultando em uma estimativa filogenética que deve ser mais acurada e ainda, permite calcular a incerteza associada aos agrupamentos (HELED & DRUMMOND, 2010). Na árvore de espécie obtida (Figura 7) o clado Nordeste é bem suportado como o primeiro a divergir, o que é congruente com outras análises (Figuras 3 a 5, Apêndice 3B). Já as relações entre Norte, Centro e Sul não parecem estar bem resolvidas, pois o clado contendo Centro e Sul foi recuperado com probabilidade posterior baixa (47%). Esse resultado é conflitante com os resultados das análises baseadas no ND2 que indicam Centro mais próximo de Norte com alto suporte (Figuras 4 e 5).

Nas simulações com ABC foram comparados os cenários de o grupo Centro e Sul como irmãos, de Centro e Norte como irmãos e ainda com Centro, Norte e Sul tendo divergido ao mesmo tempo. O cenário com maior probabilidade posterior foi o de diversificação mais recente entre Norte e Centro (Figura 8, Apêndice 1 – Cenário A). Podemos verificar que a topologia recuperada foi congruente com a árvore bayesiana calculada para o mtDNA (Figura 5) e não com a árvore de espécie (Figura 7). No entanto, dado que os mesmos marcadores foram usados na árvore de espécies e nas simulações, era esperado que seus resultados fossem congruentes.

As estimativas das datas de divergências (medianas da Tabela 4) foram bastante similares aos obtidos na árvore de espécies (Figura 7), com o clado Nordeste tendo divergido dos outros clados há cerca de 1,1 Ma e esses clados teriam divergido em tempos próximos no Pleistoceno médio (114-200 mil anos atrás) (Tabela 4, mediana dos tempos de divergência).

### *Inferências biogeográficas*

Podemos notar que os rios Jequitinhonha e Doce (Figura 2), que tem sido descritos como delimitadores (embora não necessariamente causadores) de filogrupos observados em outras espécies de aves como *Xyphorhynchus fuscus* (CABANNE *et al.*, 2007, 2008) e *Sclerurus scansor* (D'HORTA *et al.*, 2011), não parecem ser barreiras para *D. squamata*. Pois, no clado Centro amostras coletadas na margem direita do rio Doce (Caratinga, MG) agruparam com as amostras da sua margem esquerda até a margem direita do Jequitinhonha (Sooretama-ES, Alcobaça-BA, Santa Maria do Salto-MG) e também com amostras coletadas na margem esquerda do rio Jequitinhonha (Salto da Divisa-MG). Esse resultado sugere que esses rios não teriam sido os agentes causadores da estrutura observada na espécie. Isso contrasta, por exemplo, com o que foi observado na mata Atlântica para o complexo de lagartos *Gymnodactylus darwinii* (PELLEGRINO *et al.*, 2005) que apresenta boa concordância entre a distribuição geográfica dos grupos genéticos e a dos rios da floresta. Por outro lado, Maldonado-Coelho (2012) testou explicitamente a hipótese de rios como barreiras para *Pyriglena leucoptera* (Thamnophilidae) e a rejeitou como explicação para a diferenciação genética, tendo obtido, assim como no presente estudo, linhagens genéticas não divergentes em ambas as margens dos rios Doce e Jequitinhonha.

Goerck (1999) identificou diferenciação mitocondrial entre *D. squamata* amostradas ao norte do rio Doce e ao sul do rio Paraíba do Sul, sugerindo que o vale de um desses rios poderia ter agido como barreira para a espécie. No entanto, não havia amostragem entre esses dois vales, o que não permitiu elaborar inferências mais precisas. No presente estudo, a localidade Caratinga se encontra entre esses dois rios e se agrupa geneticamente ao grupo Centro, podendo indicar que a região do rio Doce não seria uma barreira para a espécie. Já a região do vale

do rio Paraíba do Sul poderia ter tido uma influência histórica na diversificação dos filogrupos. Essa região do vale do rio Paraíba do Sul já foi descrita como delimitadora de filogrupos em *Xiphorhynchus fuscus* (CABANNE *et al.*, 2007, 2008) e *Sclerurus scansor* (D'HORTA *et al.*, 2011) e das espécies irmãs *Myrmeciza squamosa* e *M. loricata* (AMARAL *et al.*, 2013).

Além disso, foi observada diferenciação entre os clados Norte e Centro (Figura 5, Tabelas 2 e 4), durante o Pleistoceno médio. As localidades amostradas mais próximas desses dois clados estão distantes aproximadamente de 80 km (Camacan-BA do clado Norte e Salto da Divisa-MG do clado Centro) e entre elas corre o rio Pardo. A data de formação da bacia do rio Pardo é estimada para ao redor de 670 milhões de anos atrás (PEDREIRA, 1999; EGYDIO-SILVA, 2011). Assim, a origem do rio Pardo não parece estar diretamente relacionada com essa divergência, mas poderia atuar como barreira secundária ao fluxo entre essas populações. O resultado aqui descrito é o primeiro a descrever essa região como área de descontinuidade filogeográfica para passeriformes da mata Atlântica. Contudo, para refutarmos ou aceitarmos essa hipótese dos rios, bem como entender qual a influência deles na distribuição das linhagens de *D. squamata*, é preciso que seja feito um delineamento experimental mais específico com amostras coletadas em ambas as margens dos rios ao longo de seu curso da cabeceira a foz, o que não foi realizado nesse estudo.

De qualquer modo, outros processos podem ter contribuído para a estruturação observada em *D. squamata*. De acordo com os tempos de divergência que estimamos, os eventos que separaram os grupos teriam ocorrido durante o Pleistoceno (<1,6 Ma, Figura 7, Tabela 4), período no qual ocorreram algumas atividades tectônicas e oscilações climáticas, dentre as quais iremos explorar a seguir aquelas que parecem mais relevantes ao presente trabalho.

Saadi *et al.* (2002) mapearam as falhas geológicas do Brasil que ocorreram no Quaternário, dentre as quais, para o presente estudo destacam-se a falha do rio Araçuaí, a falha da Caratinga e a zona de falhas de Além Paraíba. Essas falhas são consideradas ativas uma vez que ocorreram deslocamentos entre os dois blocos localizados de um lado e de outro da falha nos últimos milhares de anos e nas três falhas essa movimentação ocorreu na mesma direção da falha, porém com sentido

lateral desconhecido, ou seja, não se sabe se os blocos se deslocaram para a direita ou esquerda (SAADI *et al.*, 2002). A falha do rio Araçuaí (Figura 2) tem 639 km de extensão e em sua porção norte controla a confluência dos rios Araçuaí e Jequitinhonha, nessa área de confluência a falha deformou o cascalho fluvial dos terraços mais baixos do rio Araçuaí durante o Pleistoceno tardio a médio (SAADI *et al.*, 2002). A falha da Caratinga (Figura 2) possui 311 km de extensão e podemos verificar sua expressão geomorfológica pelo relevo de escarpas e cristas ao longo da Serra da Mantiqueira e pelo seu controle nos vales fluviais daquela região (SAADI *et al.*, 2002). A zona de falhas de Além Paraíba (Figura 2) possui aproximadamente 404 km de extensão, fica próxima a fronteira dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, estando a noroeste a Serra da Mantiqueira e a sudeste a Serra do Mar (SAADI *et al.*, 2002).

As falhas do rio Araçuaí e da Caratinga se localizam próximas a algumas localidades aqui amostradas (Igrapiúna-BA, Camacan-BA, Salto da Divisa-MG, Santa Maria do Salto-MG e Caratinga-MG) e poderiam ter influenciado a distribuição das linhagens que ocorrem nesses locais, dado que algumas movimentações ocorreram no Pleistoceno. A zona de falhas de Além Paraíba, assim como foi descrito acima para o rio Paraíba do Sul, poderia ter tido uma influência histórica na diversificação do clado Sul em relação aos demais, uma vez que sua localização coincide com a separação das linhagens genéticas. Porém, não temos informações suficientes sobre como essas barreiras neotectônicas poderiam ter atuado na estruturação geográfica da espécie.

Outra interpretação desses padrões filogeográficos encontrados é sob a ótica das oscilações climáticas que ocorreram no Quaternário em resposta a mudanças cíclicas do eixo da Terra, também conhecidas como ciclos de Milankovitch (BERGER, 2012). Esses ciclos orbitais alteram a intensidade dos efeitos da insolação de acordo com a latitude, causando os períodos glaciais e interglaciais. A precessão, causada pelos efeitos gravitacionais do Sol e da Lua que mudam a direção do eixo de rotação da Terra, ocorre em média a cada 22 mil anos (variando entre 14 a 28 mil anos) e seu efeito é maior em baixas latitudes. Durante períodos extremos, o Equador recebe mais calor solar enquanto em direção aos pólos ocorre diminuição das temperaturas (RODRIGUES DA SILVA, 2007; BERGER, 2012).

Também ocorre o ciclo da obliquidade, que é a oscilação do eixo da terra, em média a cada 41 mil anos e que altera principalmente a sazonalidade em latitudes maiores (RODRIGUES DA SILVA, 2007; BERGER, 2012). E finalmente, o ciclo da excentricidade, que se refere às alterações no formato elíptico da órbita da Terra ao redor do Sol, ocorre aproximadamente a cada 100 mil anos (variando entre 94 e 122 mil anos) e, assim como a obliquidade, causa grandes mudanças na temperatura e precipitação em maiores latitudes e também modula o efeito climático da precessão (RODRIGUES DA SILVA, 2007; BERGER, 2012). Assim, estima-se que os períodos de climas glaciais nos trópicos as temperaturas sejam 5 °C menores do que a atual, enquanto em latitudes maiores as temperaturas foram até 30 °C mais baixas, e que isso teria alterado a distribuição geográfica das espécies (DYNESIUS & JANSSON, 2000; BENNET *et al.*, 2012).

A discussão de como e se essas oscilações climáticas influenciaram a distribuição das espécies neotropicais tem sido bastante recorrente na literatura de estudos filogeográficos na América do Sul. Carnaval e Moritz (2008) propuseram um modelo para a distribuição da mata Atlântica durante o Quaternário que indicou que algumas regiões de floresta úmida teriam se mantido estáveis, mesmo durante o último máximo glacial, principalmente na parte norte da distribuição. Os dados encontrados no presente estudo são parcialmente congruentes com a hipótese de Carnaval e Moritz (2008) que propõe dois principais refúgios: a) um no centro da mata Atlântica, chamado de refúgio Bahia e que corresponde à região de ocorrência dos clados Centro e Norte, e b) um ao norte, o refúgio Pernambuco, que corresponde à área de ocorrência do clado Nordeste. Mas essa hipótese de Carnaval e Moritz (2008) não explica a ocorrência do grupo Sul.

Os tempos de divergência das linhagens aqui descritas (Figura 7) foram mais antigos do que o último máximo glacial (UMG), período glacial para o qual esses refúgios foram modelados na hipótese Carnaval e Moritz (2008), indicando que o processo de diversificação já teria ocorrido antes do isolamento nessas áreas estáveis. Embora a princípio isso pareça excluir essa hipótese como possível explicação, é preciso considerar que esse processo de contração e expansão de florestas foi cíclico durante todo o Quaternário, e que possivelmente essas áreas também eram estáveis nos ciclos glaciais anteriores em maior ou menor extensão.

Com relação ao grupo Sul, a divergência desse clado em relação ao clado Norte também foi datada para antes do UMG (Figura 7), sugerindo diversificação anterior a esse evento. A região sul da mata Atlântica parece ter sido mais afetada do que o norte durante as oscilações climáticas do Quaternário, de acordo com análises de pólen, o sul e sudeste do Brasil era predominantemente coberto por gramíneas no Pleistoceno tardio, com temperaturas de 5-7°C menores e clima mais seco nesse período, estima-se ainda que a extensão dessas áreas não florestadas tenha se estendido por cerca de 750 km entre as latitudes que incluem todo o clado Sul identificado no presente trabalho (CABANNE *et al.*, 2012; CARNAVAL *et al.*, 2009; BEHLING, 2002; BEHLING *et al.*, 2002). No entanto, existem hipóteses de que regiões de florestas teriam permanecido no sudeste durante o Quaternário agindo como refúgios nessa área, bem como hipóteses de que durante o UMG toda a região neotropical tenha se mantido florestada (THOMÉ *et al.*, 2010; BENNET *et al.*, 2012; PORTO *et al.*, 2013). Nossos dados suportam essa hipótese de regiões estáveis no sul da mata Atlântica terem resistido durante as oscilações climáticas, uma vez que a diversificação do grupo Sul parece ter ocorrido antes do UMG.

Ainda que as divergências aqui obtidas (Figura 7) sejam mais antigas que o UMG, houve alguma sobreposição do intervalo do UMG com mudanças demográficas de *D. squamata*. As expansões dos grupos Norte e Sul foram datadas para próximo ao UMG. No Norte a expansão demográfica se inicia dentro do período proposto para o UMG (Figura 6A) e no Sul após o UMG (Figura 6C). De acordo com o modelo proposto por Carnaval e Moritz (2008) as localidades amostradas no Norte encontram-se dentro do refúgio Bahia no UMG, período no qual diversificação em relação ao Centro já teria ocorrido (Figura 7). Considerando as informações de que as oscilações climáticas foram mais intensas no sul do que no norte da mata Atlântica, podemos supor que o período para recuperação de áreas florestadas no sul tenha sido mais longo. Isso seria congruente com a expansão datada para o Sul ser depois daquela para o Norte, bem como o Norte tendo iniciado sua expansão no meio para o final do UMG.

Considerando o exposto é possível que diversos fatores tenham atuado conjuntamente no processo de estruturação genética de *D. squamata*. Rull (2011) propõe que diversos fatores ambientais (tectonismo, oscilações climáticas, entre

outros) bem como processos ecológicos (específicos a grupos ou espécies) atuaram em conjunto resultando em uma complexa história evolutiva da biodiversidade neotropical. No presente trabalho, nós não pudemos rejeitar que os rios tenham contribuído na diversificação ou manutenção dos clados Norte e Centro, embora, claramente, não sejam uma barreira primária para a espécie em geral, com linhagens genéticas idênticas em lados opostos de rios Doce e Jequitinhonha. Também não pudemos rejeitar se houve influência das falhas neotectônicas na distribuição geográfica das linhagens, uma vez que a zona de falhas de Além Paraíba coincide com a separação do clado Sul, e outras falhas ativas se localizam muito próximas a distribuição da espécie. Finalmente, a estrutura genética foi concordante com refúgios propostos para os períodos glaciais do Quaternário, com um clado restrito ao refúgio Pernambuco, clados restritos ao refúgio Bahia e ainda restritos a um possível refúgio ao sul. Aparentemente não houve um único processo determinante da distribuição geográfica das linhagens, mas, possivelmente, uma atuação conjunta de diferentes eventos associados a características biológicas inerentes a *D. squamata*.

#### *Implicações taxonômicas*

Duas subespécies são descritas para *D. squamata* com base em diferenças em caracteres morfológicos. *D. s. squamata* é descrita como a subespécie que ocorre em Alagoas e Bahia e *D. s. stictocorypha* tem ocorrência descrita para o sudeste do Brasil, de Minas Gerais até o nordeste de Santa Catarina (ZIMMER & ISLER, 2003a). A diferença entre elas é que *D. s. stictocorypha* possui manchas brancas (ou mais claras no caso das fêmeas) na cabeça, enquanto *D. s. squamata* não possui máculas (PINTO, 1978; ZIMMER & ISLER, 2003a). Embora essa seja a diagnose das subespécies, Goerck (1999) observou formas polimórficas dentro da mesma localidade.

A estruturação genética encontrada aqui com quatro linhagens mitocondriais não corresponde às duas subespécies descritas morfológicamente. Na família Thamnophilidae a vocalização é considerada como importante mecanismo de isolamento (ISLER *et al.*, 1998; 2005) e assim, poderia haver concordância de diferentes vocalizações com a estrutura genética. No entanto, espécies irmãs do

gênero de *Thamnophilidae Myrmeciza* apresentam vocalizações muito similares com profunda divergência genética (Amaral *et al.*, 2013). Infelizmente as vocalizações de *D. squamata* são pouco estudadas, porém há diferenças regionais nos chamados (ZIMMER & ISLER, 2003a).

Assim, nossos resultados sugerem que seja necessário realizar estudos taxonômicos mais detalhados em *D. squamata* para identificar se há congruência de caracteres de voz e de plumagem com a estrutura genética. Em especial, verificar se indivíduos do clado Nordeste, que se divergiram dos demais no Pleistoceno inferior (há mais de 1 Ma), possuem diferenças morfológicas ou vocais diagnosticáveis em relação aos demais grupos da espécie.

#### *Implicações para conservação*

*D. squamata* é classificada pela *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) como tendo status de conservação “pouco preocupante” (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012). Essa classificação se baseia na grande área de ocorrência da espécie como um todo e aparente estabilidade no tamanho populacional, tendo sido categorizada como “comum” por Stotz *et al.* (1996). Essa classificação parece adequada para a espécie na maior parte de sua distribuição. No entanto, verificamos que, as amostras de indivíduos de Alagoas são diferenciadas das amostras obtidas no restante da distribuição.

Além disso, durante uma expedição de campo de 10 dias em novembro de 2012 em Alagoas, *D. squamata* foi encontrada apenas em Murici, onde foram obtidas as duas amostras utilizadas no presente trabalho. Na Usina Serra Grande, que abriga a Mata Coimbra, maior remanescente florestal (3.500 ha) ao norte do Rio São Francisco (PÔRTO *et al.*, 2005), apesar de haver registro da espécie (RODA, 2003), ela não foi encontrada nessa expedição. Além disso, em Jaqueira-PE, outra área onde também já foi registrada, a espécie tem sido descrita como cada vez mais rara (ALBANO, comunicação pessoal).

A área de distribuição dessa população disjunta e geneticamente bastante diferenciada de *D. squamata* é coincidente com o centro de endemismo Pernambuco, que abriga dois terços de todas as espécies e subespécies de aves que ocorrem no bioma (RODA, 2003). Infelizmente também é a região mais

degradada da mata Atlântica, restando menos de 6% de sua cobertura original, e o remanescente de floresta é representado por arquipélagos de pequenos fragmentos (PÔRTO *et al.*, 2005).

Considerando a atual degradação da mata Atlântica do norte do rio São Francisco e seu isolamento geográfico do restante do bioma, somados aos resultados que obtivemos de grande diferenciação genética dos indivíduos de Alagoas em relação aos demais amostrados, seria importante reavaliar o status de conservação da espécie para a região.

## 2.6 Referências bibliográficas

AMARAL FR, ALBERS PK, EDWARDS SV, MIYAKI CY (2013) Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic forest antbirds (*Myrmeciza*). *Molecular Ecology* 22: 3996-4013.

BANDELT HJ, FORSTER P, RÖHL A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

BEAUMONT, MA (2008) Joint determination of topology, divergence time, and immigration in population trees. In: Matsumura S, Forster P, Renfrew C (eds.) *Simulation, Genetics, and Human Prehistory*. McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge, pp. 135-154.

BEHLING H, ARZ HW, PATZOLD J, WEFER G (2002) Late Quaternary vegetational and climate dynamics in southeastern Brazil, inferences from marine cores GeoB 3229–2 and GeoB 3202–1. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 179: 227–243.

BEHLING H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 177: 19-27.

BENNETT KD, BHAGWAT SA, WILLIS KJ (2012) Neotropical refugia. *The Holocene* 22: 1207-1214.

BERGER WH (2012) Milankovitch theory – hits and misses. *Scripps Institution of Oceanography Technical report* 1–36.

BRUEN TC, PHILIPPE H, BRYANT D (2006) A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172: 2665–2681.

BRUFORD MW, HANOTTE O, BROOKFIELD JF, BURKE T (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprint. In: Hoebel AR (ed). *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 225-269.

BRUMFIELD RT, TELLO JG, CHEVIRON ZA, CARLING MD, CROCHET N, ROSENBERG KV (2007) Phylogenetic conservatism and antiquity of a tropical

specialization: army-ant-following in the typical antbirds (Thamnophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 1-13.

CABANNE GS, D'HORTA FM, SARI EHR, SANTOS FR, MIYAKI CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760–773.

CABANNE GS, SANTOS FR, MIYAKI CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 73-84.

CABANNE GS, SARI HER, MEYER D, SANTOS FR, MIYAKI CY (2012) Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic greenish schiffornis *Schiffornis virescens*. *Journal of Ornithology* 154: 371-384.

CARNAVAL AC, HICKERSON MJ, HADDAD CFB, RODRIGUES MT, MORITZ C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785-789.

CARNAVAL AC, MORITZ C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187–1201.

CHESSER RT (2004) Molecular systematics of New World suboscine birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 11-24.

CORNUET JM, RAVIGNÉ V, ESTOUP A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1. 0). *BMC Bioinformatics* 11: 401-412.

CORNUET JM, PUDLO P, VEYSSIER J, DEHNE-GARCIA A, GAUTIER M, LEBLOIS R, ESTOUP A (2014) DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *BMC Bioinformatics* 30: 1187-1189.

D'HORTA FM, CABANNE GS, MEYER D, MIYAKI CY (2011) The genetic effects of late quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1923-1935.

DARRIBA D, TABOADA GL, DOALLO R, POSADA D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772-772.

DRUMMOND AJ, SUCHARD MA, XIE D, RAMBAUT A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973

DYNESIUS M, JANSSON R (2000) Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 9115-9120.

EDGAR RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.

EGYDIO-SILVA M, KARMANN I, TROMPETTE R (2011) Análise estrutural do Grupo Rio Pardo: sudeste do Estado da Bahia. *Geologia USP Série Científica* 11: 23-41.

ELLEGREN H (2007) Molecular evolutionary genomics of birds. *Cytogenetic Genome Resources* 117: 120–130.

EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

FRIESEN VL, CONGDON BC, WALSH HE, BIRT TP (1997) Intron variation in marbled murrelets detected using analyses of single-stranded conformational polymorphisms. *Molecular Ecology* 11: 1047-1058.

FU YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

GOERCK JM (1999) Ecology, evolution, and biogeography of Drymophila antbirds (Thamnophilidae, Aves) in the neotropics. Tese de doutorado, University of Missouri, St. Louis, USA.

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

HACKETT SJ (1996) Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular phylogenetics and Evolution* 5: 368-382.

HELED J, DRUMMOND AJ (2008) Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology* 8: 289.

HELED J, DRUMMOND AJ (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* 27: 570-580.

HUSON DH, BRYANT D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254–267.

INFONATURA: Birds, mammals, and amphibians of Latin America [web application] (2007) Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Disponível em: <http://infonatura.natureserve.org>. Acessado em: abril de 2012.

IRESTED M, FJELDSÅ J, NYLANDER JA, ERICSON PG (2004) Phylogenetic relationships of typical antbirds (Thamnophilidae) and test of incongruence based on Bayes factors. *BMC Evolutionary Biology* 4: 23-39.

ISLER ML, ISLER PR, BRUMFIELD RT (2005) Clinal variation in vocalizations of an antbird (Thamnophilidae) and implications for defining species limits. *The Auk* 122: 433-444.

ISLER ML, ISLER PR, WHITNEY BM (1998) Use of vocalizations to establish species limits in antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae). *The Auk* 115: 577–590.

LIBRADO P, ROZAS J (2009) DnaSP v5: 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.

NAKA LN, BECHTOLDT CL, HENRIQUES LM, BRUMFIELD RT (2012) The role of physical barriers in the location of avian suture zones in the Guiana shield, northern Amazonia. *American Naturalist* 179: 115-132.

PEDREIRA AJ (1999) Evolução sedimentar e tectônica da Bacia Metassedimentar do Rio Pardo: uma síntese. *Brazilian Journal of Geology* 29: 339-344.

PELLEGRINO KCM, RODRIGUES MT, WAITE AN, MORANDO M, YASSUDA YY, SITES JR JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 13-26.

PINTO OMO (1978) *Novo Catálogo das Aves do Brasil: Primeira Parte*. Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais, São Paulo.

PÔRTO KC, ALMEIDA-CORTEZ JSD, TABARELLI M (2005) *Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco*. Ministério do Meio Ambiente – MMA, Brasília.

PORTO TJ, CARNAVAL AC, DA ROCHA PLB (2013) Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. *Diversity and Distributions* 19: 330–340.

PRYCHITKO TM, MOORE WS (1997) The utility of DNA sequences of an intron from the  $\beta$ -fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 193-204.

RAJÃO H, CERQUEIRA R (2006) Distribuição altitudinal e simpatria das aves do gênero *Drymophila* Swainson 1824 (Passeriformes: Thamnophilidae) na Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Zoologia* 23: 597-607.

RAMBAUT A, SUCHARD MA, XIE D, DRUMMOND AJ (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.

RIDGELY RS, TUDOR G (1994) The birds of South America. Volume II. The suboscine passerines. University of Texas Press, Austin, USA.

RODA SA (2003) Aves do Centro de Endemismo Pernambuco: composição, biogeografia e conservação. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Pará, Belém.

RODRIGUES DA SILVA JGR (2007) Ciclos orbitais ou ciclos de Milankovitch. Textos de Glossário Geológico Ilustrado. Disponível em: <http://www.unb.br/ig/glossario/>.

ROGERS AR, HARPENDING H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.

RULL V (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 508-513.

SAADI A, MACHETTE MN, HALLER KM, DART RL, BRADLEY L, SOUZA AMPD (2003) Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil. US Geological Survey. Disponível em: [pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230](http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230).

SICK H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

SORENSEN MD, AST JC, DIMCHEFF DE, YURI T, MINDELL DP (1999) Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 105–114.

STEPHENS M, DONNELLY P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics* 73: 1162-1169.

STEPHENS M, SMITH N, DONNELLY P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal Human Genetics* 68: 978–989.

STOTZ DF, FITZPATRICK JW, PARKER III TA, MOSKOVITS DK (1996) *Neotropical Birds: Ecology and Conservation*. University of Chicago Press, Chicago, USA.

TAJIMA F (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597–601.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

THOMÉ MTC, ZAMUDIO KR, GIOVANELLI JGR, HADDAD CFB, BALDISSERA JR. FA, ALEXANDRINO J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018-1031.

WEIR JT, SCHLUTER D (2007) The latitudinal gradient in recent speciation and extinction rates of birds and mammals. *Science* 315: 1574-1576.

ZIMMER K, ISLER ML (2003a) Family Thamnophilidae (typical antbirds). In: del Hoyo J, Elliott A, Christie D (eds). Handbook of the Birds of the World, volume 8, Broadbills to Tapaculos. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 448-681.

ZIMMER K, ISLER ML (2003b) Scaled Antbird (*Drymophila squamata*). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E (eds.) (2014) *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Disponível em <http://www.hbw.com/node/56777>. Acessado em março de 2015.



## DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Foram analisadas as histórias filogeográficas de dois passeriformes com distribuição sobreposta ao longo de suas ocorrências na mata Atlântica (Figura 1). Ambos são endêmicos do bioma e, interessante, apresentam padrões de estrutura genética discordantes, como pudemos verificar no presente trabalho. *Dendrocincla turdina* não apresentou grupos geneticamente diferenciados com distribuição geográfica congruente, tendo sido considerada aqui como uma espécie sem estruturação genética (Capítulo 1). Enquanto *Drymophila squamata* apresentou-se subdivida em quatro clados bem suportados pelas análises com DNA mitocondrial (Capítulo 2).

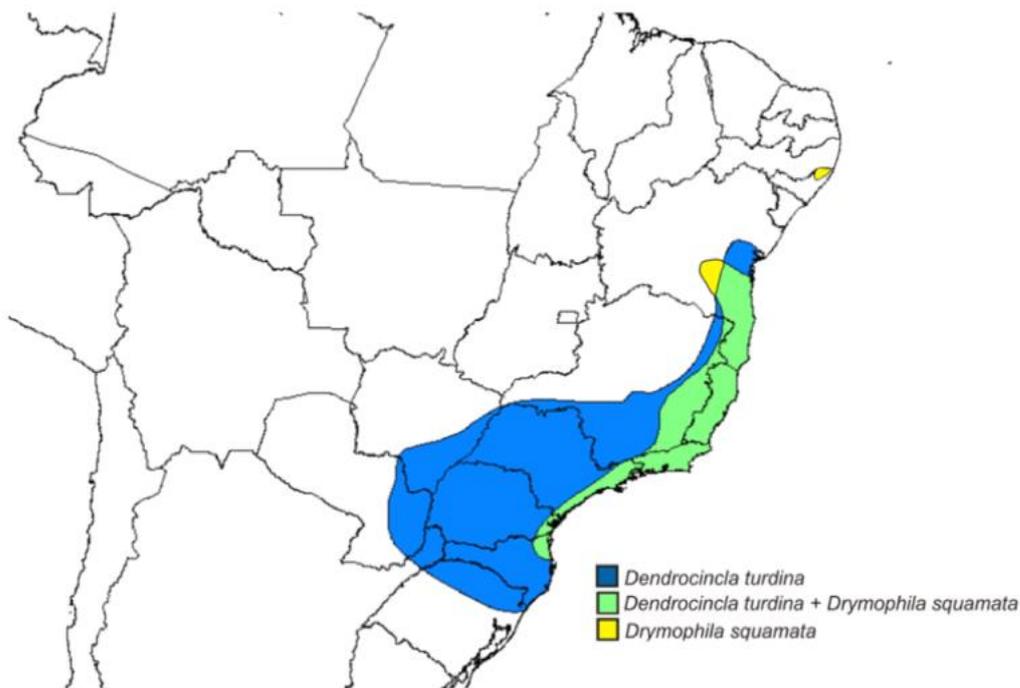


Figura 1. Mapa com as distribuições de *Dendrocincla turdina* (azul) e *Drymophila squamata* (amarelo). A área verde corresponde à região onde a distribuição das duas espécies se sobrepõe (modificado de InfoNatura, 2007).

Esses dois padrões contrastantes tem sido reportados em outros estudos publicados com passeriformes da mata Atlântica. As espécies que também não apresentaram diferenciação genética ao longo da sua distribuição, como *Dendrocincla turdina*, foram *Basileuterus leucoblepharus* (BATALHA FILHO *et al.*, 2012), *Schiffornis virescens* (CABANNE *et al.*, 2012) e *Myrmeciza squamosa*

(AMARAL *et al.*, 2013). Enquanto espécies de passeriformes com publicações que apresentam diferenciação genética como *Drymophila squamata*, foram *Xiphorhynchus fuscus* (CABANNE *et al.*, 2008), *Sclerurus scansor* (D'HORTA *et al.*, 2011), *Dendrocolaptes platyrostris* (CABANNE *et al.*, 2011), *Pyriglena leucoptera* (MALDONADO-COELHO, 2012) e *Synallaxis ruficapilla* (BATALHA FILHO *et al.*, 2013).

Assim como *Dendrocincla turdina*, as outras espécies sem estruturação também apresentaram sinais de expansão demográfica durante o Pleistoceno (BATALHA FILHO *et al.*, 2012; CABANNE *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*, 2013). E as populações localizadas ao sul da mata Atlântica das espécies com estrutura genética também têm evidências de expansão, embora não existam datações do evento demográfico para todos esses outros grupos (Capítulo 2 do presente estudo; CABANNE *et al.*, 2008; D'HORTA *et al.*, 2011; CABANNE *et al.*, 2011; MALDONADO-COELHO, 2012; BATALHA FILHO, 2012). Isso poderia indicar uma colonização do norte para o sul após o último máximo glacial (UMG), o que poderia ter como resultado o padrão de expansão dessas populações. Porém, para as espécies analisadas na presente Tese aparentemente esse não é o caso, uma vez que a divergência do clado Sul de *D. squamata* dos clados Norte e Sul foi antes do UMG e a expansão de *D. turdina* se iniciou dentro do UMG. Assim, esses resultados sugerem que essas populações já estavam em áreas ao sul da mata Atlântica nesse período.

Para essas duas espécies as oscilações climáticas Pleistocênicas não puderam ser descartadas como tendo contribuído para as histórias demográficas observadas. Os dados apresentados reforçam a proposição de Porto *et al.* (2013) sobre a permanência de um grande refúgio no sudeste do Brasil durante o Quaternário. E também seria congruente como a sugestão de Thomé *et al.* (2010) da existência de áreas florestadas na porção sul do bioma onde algumas linhagens possivelmente persistiram no mesmo período.

Outro ponto em comum entre os dois táxons é que aparentemente o vale do rio Doce não representa uma barreira geográfica, uma vez que *D. turdina* ocorre em ambas as margens do rio e o grupo Centro de *D. squamata* também apresentou linhagens mitocondriais compartilhadas ao norte e ao sul do vale. No entanto, para

*D. turdina* nenhum rio parece ser uma barreira atual ou passada dada a ausência de estrutura, enquanto para *D. squamata* parece que ao menos o rio Pardo tenha alguma influência na distribuição genética atual dada sua concordância geográfica com as linhagens Centro e Norte.

Interessantemente, a área de ocorrência da população disjunta de *D. squamata* é sobreposta à distribuição do táxon irmão de *D. turdina*, *D. fuliginosa taunayi*, e a divergência do clado Nordeste com os demais de *D. squamata* tem concordância temporal com a divergência de *D. turdina* e *D. f. taunayi*. A divergência em *D. squamata* foi datada há 1,1 Ma enquanto entre essas espécies irmãs de *Dendrocicla* foi datada há 1,3 Ma, ambos foram datados usando marcadores mitocondriais e nucleares com uma abordagem bayesiana (WEIR & PRICE, 2011). Outros grupos de aves também apresentaram tempos de divergência similares entre clados nessa mesma região do rio São Francisco, como os filogrupos de *Xiphorhynchus fuscus* e as espécies irmãs *Tangara seledon* e *T. fastidiosa*, que tiveram divergência estimada entre 1,2-1,5Ma calculado por Weir e Price (2011).

Weir e Price (2011) discutem que possivelmente um evento biogeográfico comum teria afetado simultaneamente diversos grupos de aves, o que foi corroboramos pelos dados de *D. squamata*. Dentre alguns eventos biogeográficos possíveis, os autores destacam que poderia tanto ser a formação do curso do rio São Francisco (que teria fragmentado um grupo ancestral) ou a dispersão através dessa barreira poderia ter sido possibilitada por alguma alteração climática, ou ainda, a separação poderia ter ocorrido durante os períodos glaciais do Pleistoceno que separaram os refúgios Pernambuco e Bahia (CARNAVAL & MORITZ, 2008), podendo levar a divergência entre os grupos (WEIR & PRICE, 2011).

Dessa forma, nós verificamos que as duas espécies abordadas nessa Tese possuem tanto pontos concordantes quanto discordantes em relação a sua história filogeográfica, que vão além de sua biologia, integrando também fatores abióticos. Isso ressalta a necessidade de mais estudos serem realizados para podermos ter uma ideia melhor sobre como as diferentes espécies responderam e estão respondendo a diferentes eventos históricos geológicos e climáticos.

## Conclusões

A cada novo estudo filogeográfico relacionado à mata Atlântica fica mais evidente a complexidade da história evolutiva desse bioma. Na presente tese, analisando dois passeriformes co-distribuídos, foram identificados dois padrões filogeográficos bastante diferentes em relação à distribuição das linhagens genéticas e alguma similaridade de respostas aos eventos do Quaternário com alteração demográfica.

Aqui foi identificado que tanto oscilações climáticas quanto eventos geológicos podem ter moldado a diversificação em *Drymophila squamata*, e que os rios também podem ter contribuído como barreiras secundárias mantendo os padrões observados. Para *Dendrocincla turdina* temos evidências para as alterações demográficas tendo sido influenciadas pelos ciclos glaciais do Quaternário, o que não exclui que eventos geológicos que não são de nosso conhecimento possam ter influenciado a sua distribuição.

Assim, diversos processos evolutivos possivelmente atuaram em conjunto moldando a diversidade que observamos na mata Atlântica. Quanto mais estudos com organismos com diferenças em ecologia e capacidade de dispersão, melhor será a compreensão de como diversos processos geotectônicos, de formação de vales e rios, de expansões e contrações de florestas por alterações climáticas, alteraram e contribuíram para os padrões de distribuição observados nas espécies.

O presente estudo contribuiu com a compreensão da história evolutiva da mata Atlântica e instiga que outros sejam realizados. Muitas questões ainda estão em aberto. Como, por exemplo, se há diferença na filogeografia e demografia de organismos com biologias diferentes (subbosque x copa, dispersão das fêmeas x machos, dispersão x sedentarismo, territórios de grande extensão x pequena, sensibilidade à fragmentação x resistência, etc.) ou com distribuições diferentes (sul x norte, montanhas x baixada).

A filogeografia é uma área relativamente recente e seu desenvolvimento nos últimos anos parece bastante promissor. Foram desenvolvidos novos métodos de análise, como testes baseados em modelos mais complexos, geração de sequências em grande escala e métodos computacionais mais avançados. Esses

avanços devem possibilitar que estudos cada vez mais elaborados e com respostas mais precisas sejam feitos com sucesso contribuindo com o entendimento da diversificação neotropical.

## Referências bibliográficas

AMARAL FR, ALBERS PK, EDWARDS SV, MIYAKI CY (2013) Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic forest antbirds (*Myrmeciza*). *Molecular Ecology* 22: 3996-4013.

BATALHA FILHO H, CABANNE GS, MIYAKI CY (2012) Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 892-902.

BATALHA FILHO H, Irestedt M, Fjeldså J, Ericson PGP, Silveira LF, Miyaki CM (2013) Molecular systematics and evolution of the *Synallaxis ruficapilla* complex (Aves: Furnariidae) in the Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 86-94.

CABANNE GS, D'HORTA FM, SARI EHR, SANTOS FR, MIYAKI CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760-773.

CABANNE GS, D'HORTA FM, MEYER D, SILVA J, MIYAKI CY (2011) Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 801-820.

CABANNE GS, SARI HER, MEYER D, SANTOS FR, MIYAKI CY (2012) Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic greenish schiffornis *Schiffornis virescens*. *Journal of Ornithology* 154: 371-384.

CARNAVAL AC, MORITZ C (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35: 1187-1201.

D'HORTA FM, CABANNE GS, MEYER D, MIYAKI CY (2011) The genetic effects of late quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic forest passerine. *Molecular Ecology* 20: 1923-1935.

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.

PORTO TJ, CARNAVAL AC, DA ROCHA PLB (2013) Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. *Diversity and Distributions* 19: 330–340.

THOMÉ MTC, ZAMUDIO KR, GIOVANELLI JGR, HADDAD CFB, BALDISSERA JR. FA, ALEXANDRINO J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-pliocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1018-1031.

WEIR JT, PRICE M (2011) Andean uplift promotes lowland speciation through vicariance and dispersal in *Dendrocincla* woodcreepers. *Molecular Ecology* 20: 4550-4563.

## APÊNDICE 1 – Cenários evolutivos testados por ABC

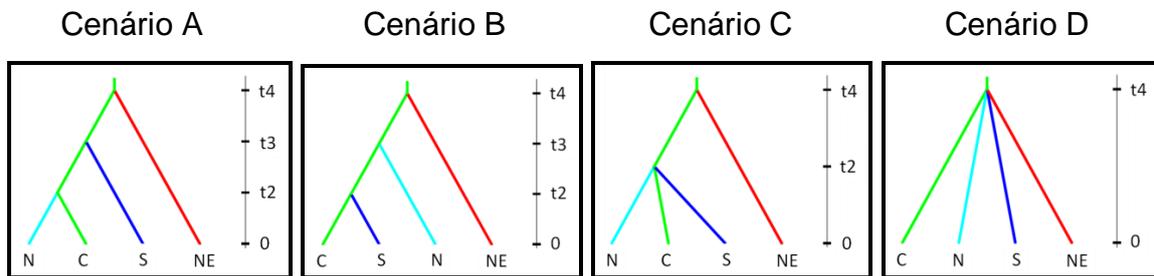


Figura 1. Cenários evolutivos testados por ABC para *D. squamata*. N corresponde às amostras do clado Norte, C às do clado Centro, S às amostras do clado Sul e NE às do clado Nordeste. À esquerda de cada cenário estão indicados os tempos de diversificação sem escala (t2, t3 e t4). No cenário A, foi considerado que a primeira divergência ocorreu entre o Nordeste e os demais clados, a segunda divergência ocorreu entre o clado Sul e os clados Norte e Centro, e a terceira separou os clados Norte e Centro. No cenário B, a primeira divergência teria ocorrido entre o Nordeste e os demais clados, a segunda divergência, teria separado o clado Norte dos clados Centro e Sul, e a terceira, os clados Centro e Sul. No cenário C, a primeira divergência separou o clado Nordeste dos demais clados e a segunda divergência, os clados Norte, Centro e Sul ao mesmo tempo. No cenário D, os quatro filogrupos teriam divergido entre si ao mesmo tempo.

## APÊNDICE 2 – Árvores bayesianas com base nos dados de DNA mitocondrial

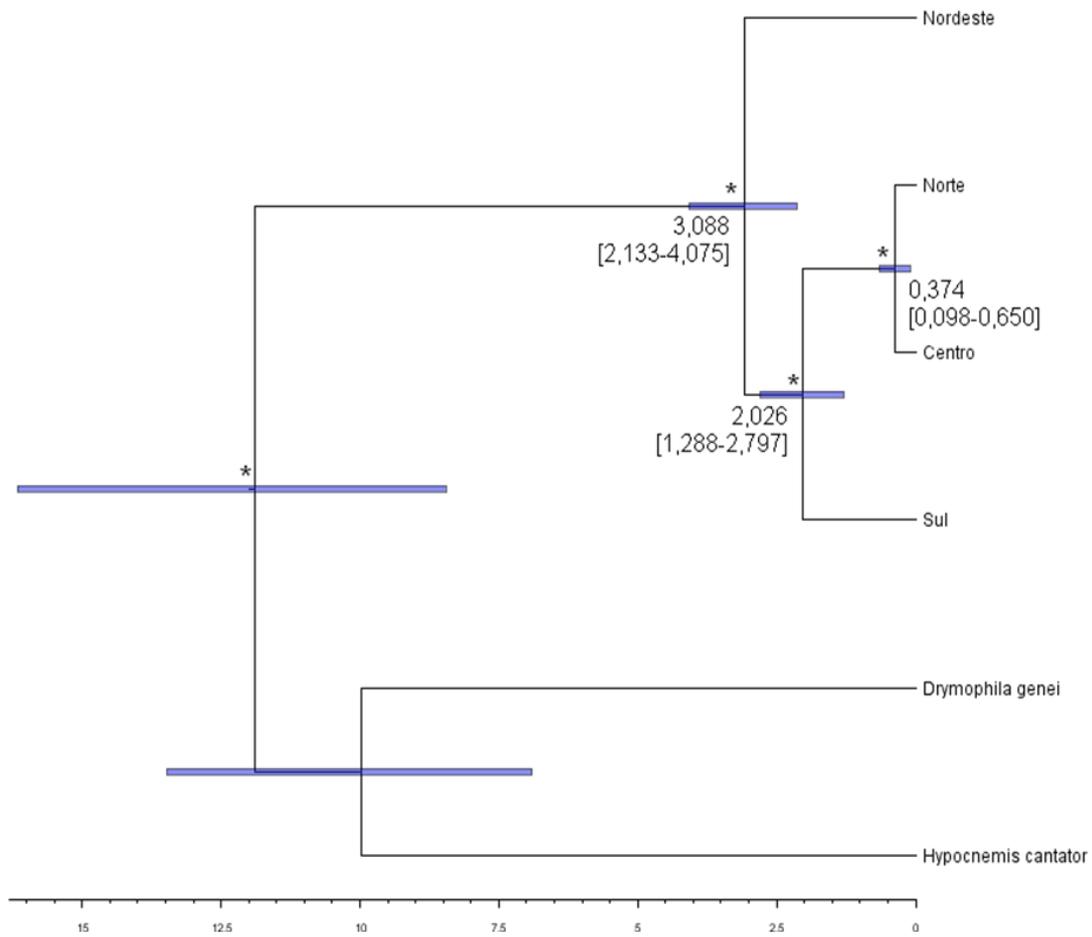


Figura 1. Árvore obtida por inferência bayesiana com base em 1032 pb do ND2 de *Drymophila squamata* utilizando relógio estrito com taxa de mutação de 2,1%. Abaixo dos nós estão os valores médios das datas de divergência estimadas (em milhões de anos) e entre colchetes, os valores de 95% HPD (também representados pelas barras azuis). Os asteriscos indicam probabilidade posterior do nó maior que 0,98. A escala em baixo está em milhões de anos.

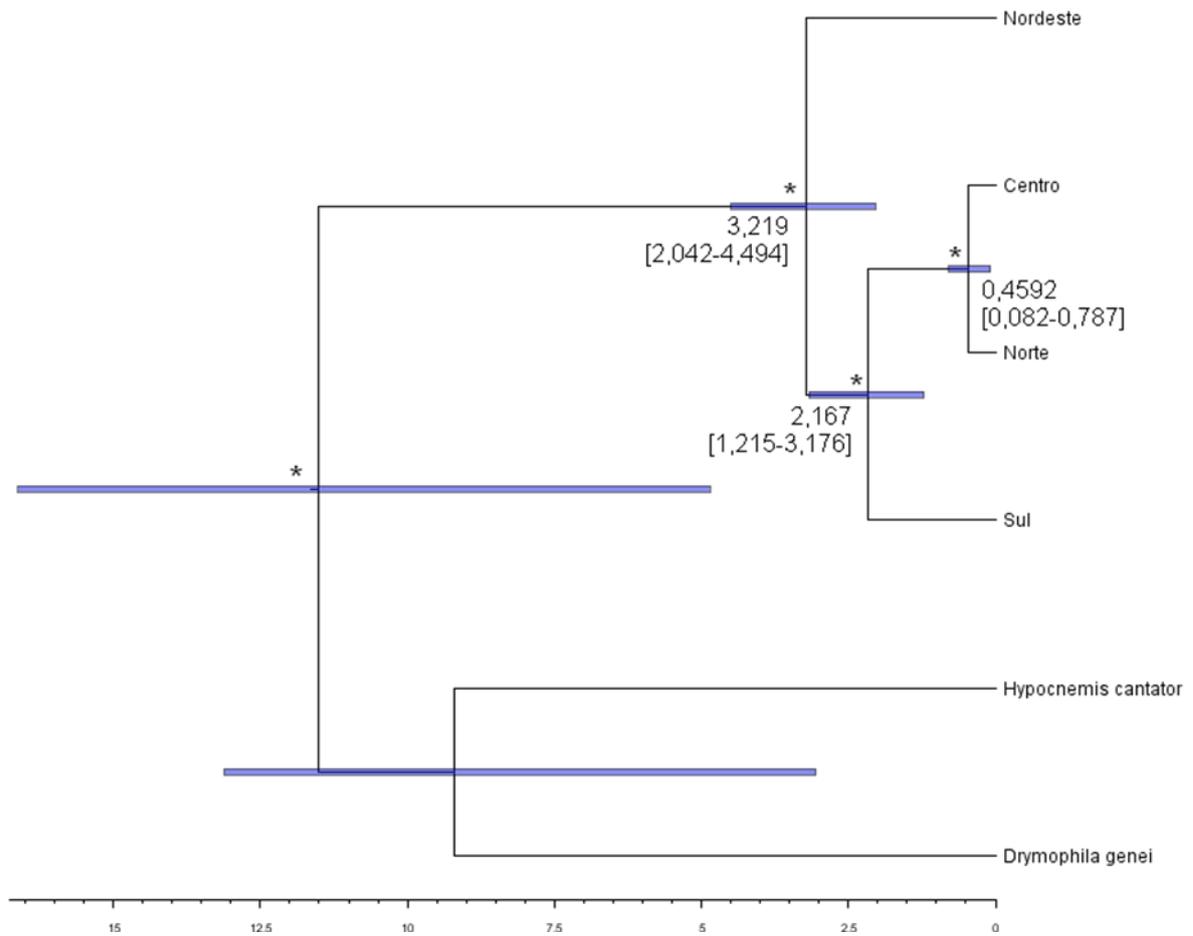


Figura 2. Árvore obtida por inferência bayesiana com base em 1032 pb do ND2 de *Drymophila squamata* utilizando relógio molecular relaxado com taxa de mutação de 2,1%. Abaixo dos nós estão os valores médios das datas de divergência estimadas (em milhões de anos) e entre colchetes, os valores de 95% HPD (também representados pelas barras azuis). Os asteriscos indicam probabilidade posterior do nó maior que 0,99. A escala em baixo está em milhões de anos.

### APÊNDICE 3 – Árvores de máxima verossimilhança com base nos íntrons

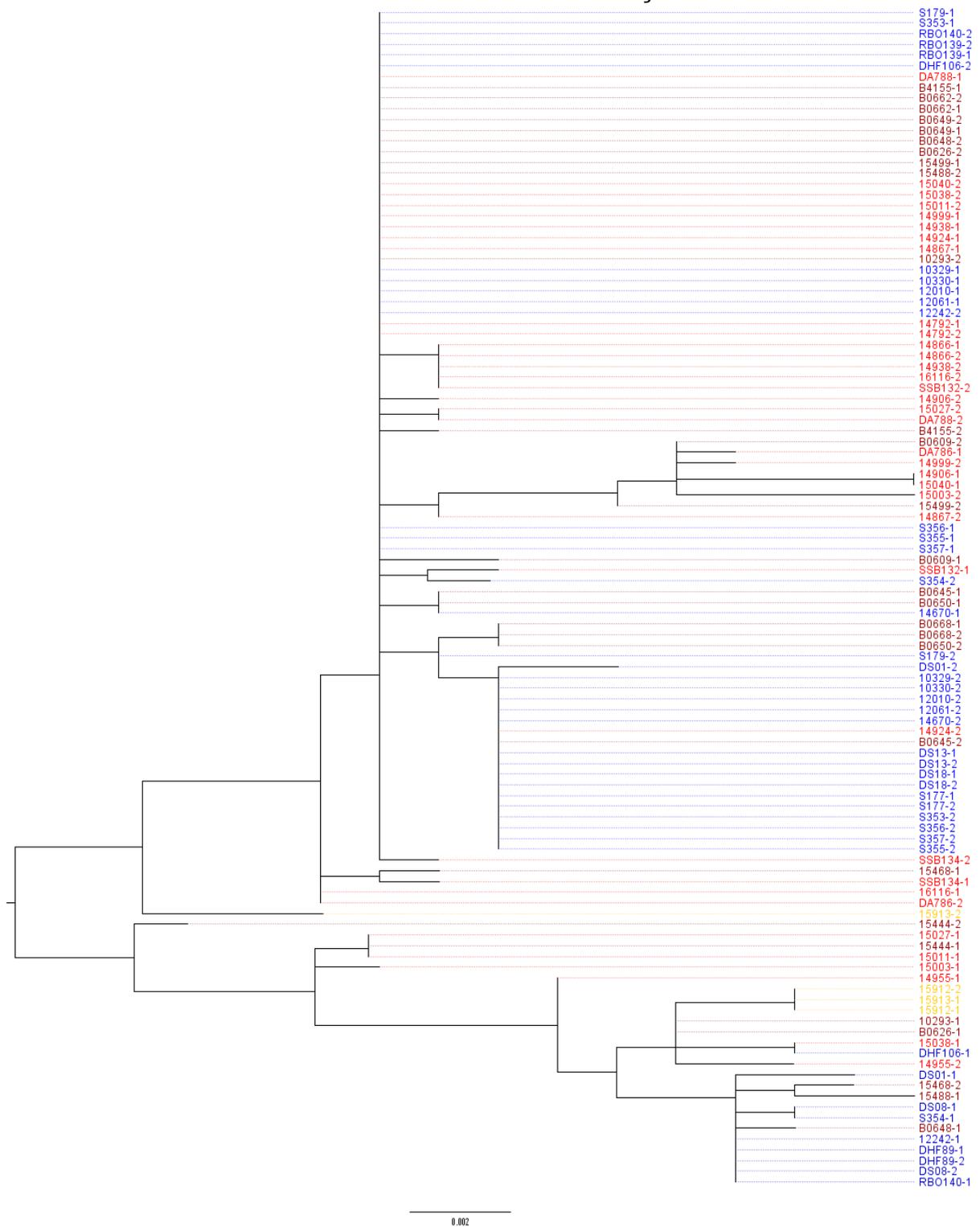


Figura 1. Árvore de máxima verossimilhança baseada em 849 pb do FIB7 de *Drymophila squamata*. As cores correspondem aos grupos de localidades da Figura 2: Nordeste – amarelo, Norte – vermelho, Centro – vinho e Sul – azul.

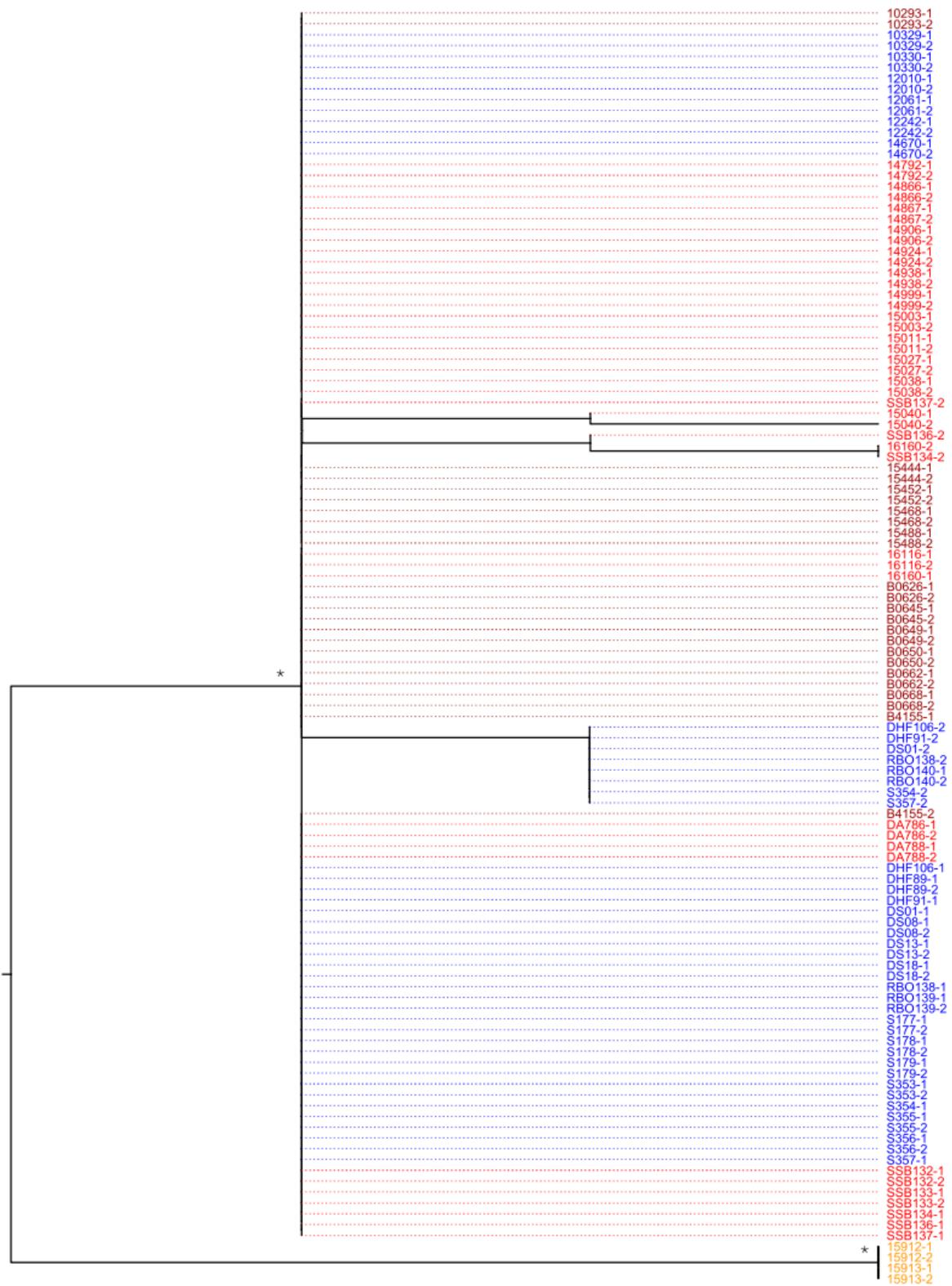
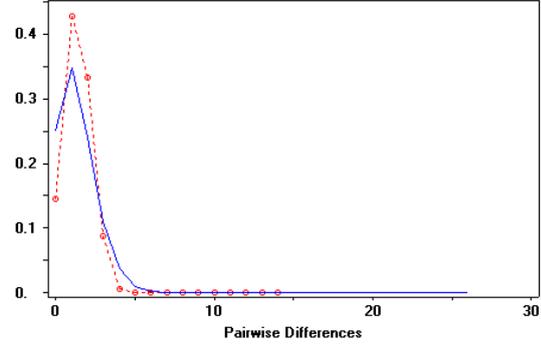
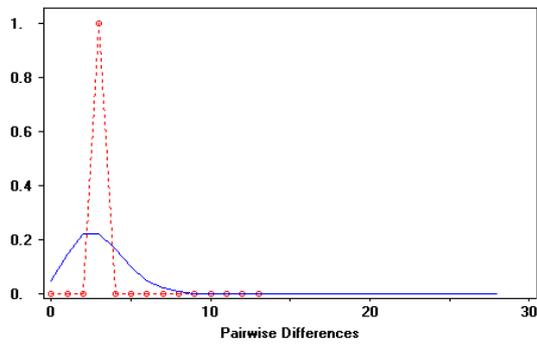


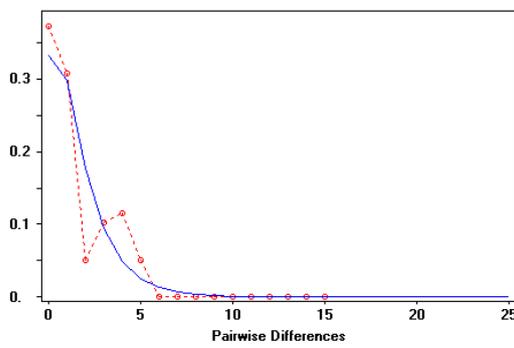
Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança baseada em 416 pb do G3PDH de *Drymophila squamata*. Nós com *bootstrap* acima de 99 estão indicados com asterisco. As cores correspondem aos grupos de localidades da Figura 2: Nordeste – amarelo, Norte – vermelho, Centro – vinho e Sul – azul.

## APÊNDICE 4 – Gráficos das análises de *mismatch distribution*

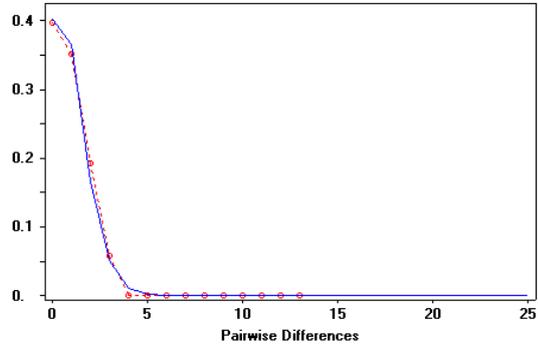
### A) ND2



### Nordeste



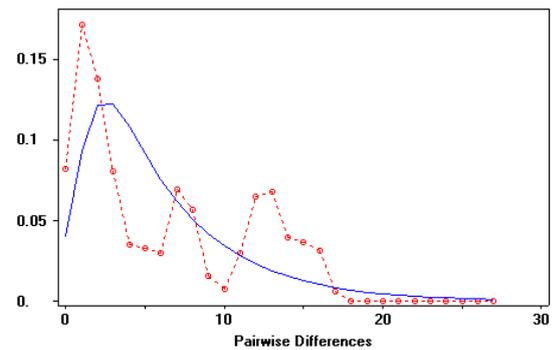
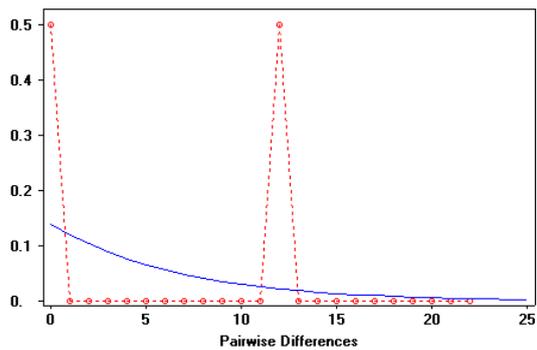
### Norte



### Centro

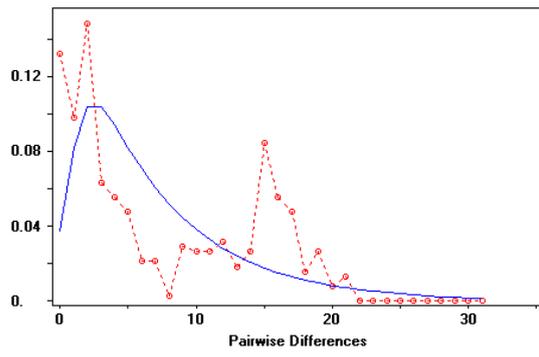
### Sul

### B) FIB7

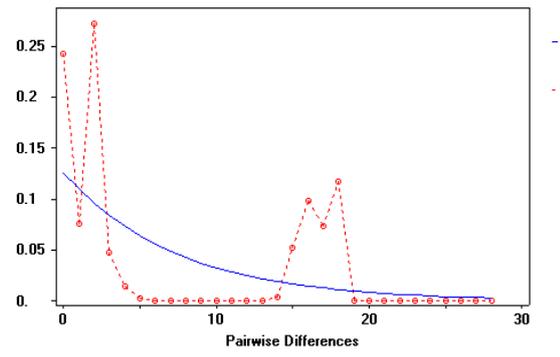


### Nordeste

### Norte

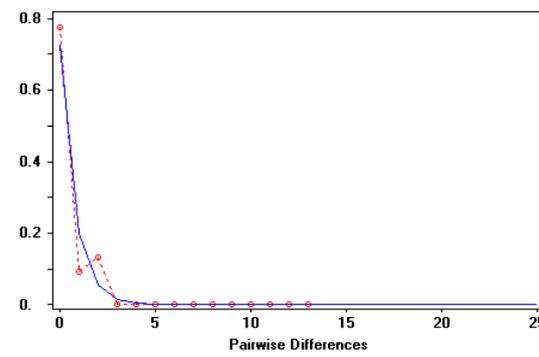


Centro

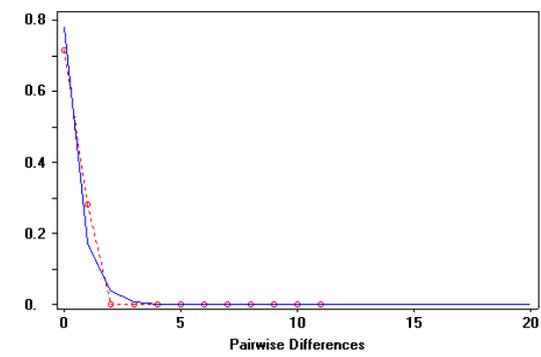


Sul

C) G3PDH



Norte



Sul

Figura 1. Resultados dos testes de *mismatch distribution* de *Drymophila squamata*. Gráficos obtidos assumindo o modelo esperado de crescimento-declínio populacional. A) 1.032 pb do ND2. B) 849 pb do FIB7. C) 426 pb do G3PDH. Linhas em azul mostram o valor esperado e linhas pontilhadas em vermelho, os valores observados. Abaixo de cada gráfico está indicada a linhagem genética.