

Ana Beatriz da Silva Bueno

Análise genômica de híbridos e não híbridos de Olhos-de-fogo (gênero *Pyriglena*, Aves: *Thamnophilidae*) da Floresta Atlântica

Genomic analysis of hybrids and non-hybrids of Fire-eyes (genus *Pyriglena*, Birds: *Thamnophilidae*) from the Atlantic Forest

**São Paulo
2017**

1. Introdução

1.1 Dinâmica de Espécies e Zonas de Hibridação

Espécies são uma das unidades fundamentais da biologia, com sua importância comparada a genes, células e organismos, sendo utilizada em diversas áreas, de anatomia a comportamento, desenvolvimento, ecologia, genética, biologia molecular, paleontologia, fisiologia e sistemática (de Queiroz, 2005; Mayr, 1982).

Sua importância na biologia está intimamente ligada à sua importância na sistemática, que é responsável pela estrutura taxonômica usada em todos os ramos da biologia (de Queiroz, 2005). Sendo que por mais de 250 anos a sistemática tem sido fortemente influenciada pela hierarquia familiar das categorias taxonômicas originadas pelos trabalhos de Linnaeus publicados em 1753 e 1758, nos quais trata espécies como a menor e mais fundamental categoria taxonômica. O papel central da sistemática também é reforçado pela relação que une sistemática com biologia evolutiva (de Queiroz, 2005), como nos trabalhos: *On the Origin of Species* (Darwin, 1859), *Genetics and the Origin of Species* (Dobzhansky, 1937), *Evolution, the Modern Synthesis* (Huxley, 1942) e *The Evolutionary Synthesis: Perspectives on the Unification of Biology* (Mayr, 1980).

Dentre esses trabalhos, pode-se destacar o livro de Mayr (1980) que levantou muita discussão sobre o conceito de espécie com a proposta de que “espécies são grupos de populações naturais que cruzam entre si, que são reprodutivamente isolados de tais outros grupos” (Mayr, 1980). Este conceito ficou conhecido como conceito biológico de espécie.

Apesar de o conceito de Mayr ter sido amplamente aceito, esta definição recebeu críticas e posteriores conceitos alternativos foram criados até que por volta da década de 90, Mayden (1997) identificou 24 conceitos de espécies, como o biológico, o fenético, o evolutivo, o ecológico e o filogenético (três versões). A diferença entre esses conceitos reside em diferentes propriedades biológicas consideradas por cada uma. Assim, por exemplo, o conceito biológico de espécies enfatiza a propriedade de isolamento reprodutivo (Dobzhansky, 1970; Mayr, 1942). O conceito ecológico enfatiza a ocupação de um nicho distinto ou zona adaptativa (Andersson, 1990; Van Valen, 1976). Uma das versões do conceito filogenético enfatiza a diagnose (Cracraft, 1983; Nixon, 1990) e outro, a monofilia (Donoghue, 1985; Rosen, 1979).

A essa diversidade advém dos diferentes interesses de cada subgrupo de biólogos: aqueles que estudam sistemática tendem a enfatizar a diagnose e monofilia, enquanto ecólogos tendem a enfatizar a diferença de nicho, paleontólogos enfatizam as diferenças

morfológicas, geneticistas as diferenças nos genes e os que estudam zona de hibridação tendem a enfatizar as barreiras reprodutivas (de Queiroz, 2005).

Entender a dinâmica das espécies e como delimitá-las tem intrigado evolucionistas e sistematas há muito tempo e muitos conceitos foram criados (de Queiroz, 1998; Harrison, 1998; Mayden, 1997; Stamos, 2003) pois casos que envolvem hibridação (cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes com geração de descendentes), introgressão (fluxo de genes entre espécies que envolve hibridação e retrocruzamento) e retenção de polimorfismo ancestral com separação incompleta entre linhagens (Anderson, 1949; Anderson & Hubricht, 1938; Harrison, 1990; Harrison, 1993) desafiam a maioria dos conceitos de espécies.

Por ser um processo evolutivo que pode resultar em novidades genéticas mais rápido do que por meio de mutações (Anderson & Hubricht, 1938; Martinsen, 2001), a hibridação tem sido o foco de muitos estudos evolutivos. Por exemplo, discussão sobre as bases ecológicas e genéticas da hibridação (Anderson, 1949), os processos micro e macroevolutivos envolvidos na hibridação natural (Arnold, 1992), contribuição da hibridação na origem de plantas (Rieseberg & Carney, 1998) e a invasão do genoma animal por meio de introgressão com consequentes mudanças no padrão de especiação dos mesmos (Dowling, 1997; Jiggins, 2008; Mallet, 2005; Schwenk *et al.*, 2008).

Espera-se que um conjunto de híbridos deve conter maior variedade de alelos do que cada parental isoladamente, portanto alelos seletivamente neutros nos parentais que estejam em nova combinação nos híbridos, poderiam sofrer pressão seletiva. Com isso, uma variante genética adaptativa importante poderia resultar em alterações no híbrido (Choler *et al.*, 2004; Castric *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2006).

Os resultados evolutivos da hibridação podem ser dos mais variados tipos: inclui a manutenção ou aumento da diversidade resultando em zonas de hibridação estáveis; a aquisição de nova variedade alélica pode acarretar na origem ou transferência de adaptações, tendo efeito positivo no resgate de populações pequenas puras; o reforço do isolamento reprodutivo e a formação de novas linhagens híbridas (Abbott, 1992; Abbott *et al.*, 2013; Anderson, 1949; Arnold, 1996; Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Frankham, 2015; Mallet, 2007; Stebins, 1959). A hibridação também pode resultar em especiação se o híbrido se tornar ecológica e/ou espacialmente muito divergente dos parentais (Abbott *et al.*, 2010; Gross & Rieseberg, 2005).

No entanto, a hibridação pode reduzir a diversidade, pois a quebra das barreiras reprodutivas e a mescla de populações anteriormente distintas pode acarretar na extinção de uma das populações ou espécies envolvidas na hibridação (Allendorf *et al.*, 2001; Buerkle *et*

al., 2003; Ellstrand, 1992; Levin *et al.*, 1996; Rieseberg *et al.*, 1989; Rhymer & Simberloff 1996; Vuillaume *et al.*, 2015).

Em geral, a extinção resultante de hibridação pode ocorrer via dois processos:

(1) se o *fitness* do híbrido for menor do que o *fitness* dos parentais e a hibridação for muito frequente, uma ou ambas as linhagens parentais podem declinar em termos demográficos resultando na sua extinção. Esse processo é conhecido como submersão demográfica (*demographic swamping*; Ellstrand *et al.*, 1999; Ellstrand & Elam, 1993; Levin *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2001);

(2) se a depressão por exocruzamento for menos severa e a taxa de crescimento populacional dos híbridos superar a taxa de crescimento das populações parentais, uma (ou ambas) linhagem(ns) parental(is) pode(m) ser substituída(s) por híbridos. Esse processo é a submersão genética (*genetic swamping*; Heusmann, 1974; Johnsgard, 1961; Rhymer & Simberloff, 1996; Todesco *et al.*, 2016).

A extinção relacionada à hibridação pode ser importante em conservação caso uma das espécies parentais seja ameaçada de extinção. Assim, entender as consequências da hibridação é um pontos chave para a proteção e conservação dessa espécie.

Diversos métodos são utilizados para detectar hibridação, incluindo exames morfológicos, citológicos, químicos e marcadores moleculares (Riseberg & Ellstrand, 1993). Sendo que o aumento de estudos com marcadores moleculares ocorre devido a possibilidade de analisar de diversas formas a teoria evolutiva com abordagens estatísticas robustas (Rieseberg *et al.*, 2000). Análises genômicas comparativas de híbridos e seus parentais podem permitir a identificação de genes que possivelmente contribuem no isolamento reprodutivo e da frequência que ocorre hibridação/introgressão entre as espécies envolvidas e podem auxiliar a caracterizar o padrão de seleção dos alelos (Arnold, 1992; Buerkle, 2007; Barton & Gale, 1993; Barton & Hewitt, 1985; Twyford & Ennos, 2012). Para realizar esse tipo de análises, o método de Sanger de sequenciamento de DNA (Sanger & Coulson, 1975; Sanger *et al.*, 1977) foi utilizado por mais de duas décadas para obter genomas completos de numerosas espécies. No entanto, novas tecnologias de sequenciamento foram desenvolvidas produzindo muito mais leituras, com custo mais baixo e menos trabalho laboratorial. Esse Sequenciamento de Nova Geração (do inglês, *Next Generation Sequencing* – NGS) tem sido bastante utilizado em estudos genômicos que abordam hibridação e introgressão (Margullies *et al.*, 2005; McCormack, 2012; Metzker, 2010; Schendure *et al.*, 2005; Twyford & Ennos, 2011).

A crescente acessibilidade às tecnologias de NGS e o desenvolvimento simultâneo de

ferramentas bioinformáticas inovadoras para analisar grandes conjuntos de dados tornaram essa metodologia uma ferramenta amplamente difundida em pesquisas biológicas (Kumar & Kocour, 2017), o que pode ser evidenciado por um grande número de publicações científicas usando tal metodologia.

1.2. Mata Atlântica e o Gênero *Pyriglena*

A região neotropical é conhecida por sua heterogeneidade de condições ambientais e grande diversidade de fitofisionomias (Oliveira-Filho & Fontes, 2000) que vão desde florestas úmidas a desertos, sendo que destas, as florestas tropicais são reconhecidas como detentoras de boa parte da biodiversidade (Price *et al.*, 2008). Entre as florestas tropicais, a Mata Atlântica se destaca por ser considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano e por ser uma das 25 áreas mundialmente mais importantes (*hotspots*) de biodiversidade, abrigando por volta de 1 a 8% de toda a biodiversidade do planeta (Silva & Casteleti, 2003), com mais de 8.000 espécies endêmicas (Tabarelli *et al.*, 2005), sendo essa diversidade composta por mais de 207 aves endêmicas (Brooks *et al.*, 1999).

No passado, a Mata Atlântica era constituída de mais de 1,5 milhões de km² distribuídos desde o nordeste do Brasil até o sul do país, também chegando ao leste do Paraguai e nordeste da Argentina (Câmara, 2003). Deste total, 92% se encontram em território brasileiro (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2001; Galindo-Leal & Câmara, 2003). Atualmente é considerada como um dos biomas mais degradados (Myers *et al.*, 2000) pois restam cerca de 11,4% a 16% dessa floresta (Ribeiro *et al.*, 2009). Tornam-se urgentes ações e estudos que documentem a biota da Mata Atlântica, pois além da perda de território, nela também se encontram a maioria das espécies oficialmente ameaçadas de extinção no Brasil (Tabarelli *et al.*, 2003).

Dentre as aves em perigo de extinção que habitam a Mata Atlântica, está *Pyriglena atra* (IUCN, 2012), popularmente conhecida como papa-taoca-da-Bahia, da ordem Passeriformes. O gênero *Pyriglena* (Cabanis 1847) é considerado monofilético baseado em dados filogenéticos, morfológicos e comportamentais (Isler *et al.*, 2013). Comparado às demais espécies da sua família *Thamnophilidae*, o gênero *Pyriglena* divergiu relativamente recentemente do seu grupo irmão (Isler *et al.*, 2013). Habitam florestas de terra firme e florestas em geral na região neotropical (Ridgely & Tudor, 1994; Willis & Oniki, 1982; Zimmer & Isler, 2003). Todos os indivíduos do gênero parecem evitar o sub-bosque aberto da floresta madura e preferir emaranhados densos nas falhas de luz (especialmente em torno de cachoeiras), perto da borda da floresta e em área de crescimento secundário. Eles forrageiam

principalmente em poleiros quase horizontais 0-3m acima do solo, mas às vezes ascendem a 10m em vinhas ou outra vegetação espessa (Isler & Maldonado-Coelho, 2017). Os indivíduos do gênero *Pyriglena* seguem formigas durante sua alimentação, mas não dependem delas, pois capturam presas longe de formigas (Willis, 1981), especialmente em áreas com baixa densidade de formigas-correição (Zimmer & Isler, 2003). Eles são, portanto, considerados seguidores regulares mais do que seguidores obrigatórios de correição de formigas (Brumfield *et al.*, 2007).

Considerado endêmico da América do Sul, o gênero é atualmente reconhecido como composto de três espécies (Remsen *et al.*, 2016): *Pyriglena leuconota* (Spix 1824), *Pyriglena leucoptera* (Vieillot 1818) e *Pyriglena atra* (Swainson 1825). Os machos dessas três espécies apresentam plumagem preta e as fêmeas, marrom. Machos de *P. atra* possuem uma mancha branca interescapular com franjas em sua parte inferior. Já os machos de *P. leucoptera* possuem manchas brancas lineares e paralelas nas asas enquanto que em *P. leuconota* tanto os machos quanto as fêmeas possuem uma mancha branca interescapular (Zimmer & Isler, 2003; Figura 1).

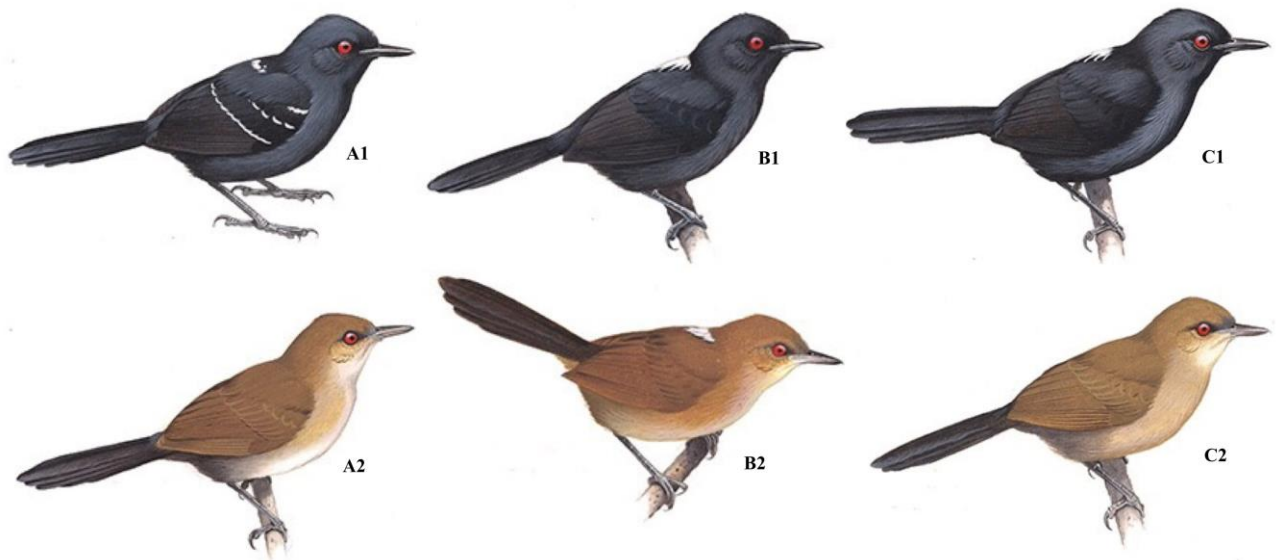


Figura 1 - *Pyriglena leucoptera* macho (A1), *Pyriglena leucoptera* fêmea (A2), *Pyriglena leuconota* macho (B1), *Pyriglena leuconota* fêmea (B2), *Pyriglena atra* macho (C1) e *Pyriglena atra* fêmea (C2). Prancha de Eduardo Brettas (2009).

P. atra e *P. leucoptera* são endêmicas da Mata Atlântica. *P. atra* ocorre em uma pequena região entre os estados brasileiros de Sergipe e Bahia. *P. leucoptera* distribui-se

desde o norte da Bahia e vai se estendendo em direção ao Rio Grande do Sul, chegando no Paraguai e Argentina. *P. leuconota* distribui-se principalmente na Amazônia, possuindo, também, indivíduos na Mata Atlântica localizados entre os estados brasileiros de Pernambuco e Alagoas (Zimmer & Isler, 2003; Figura 2).

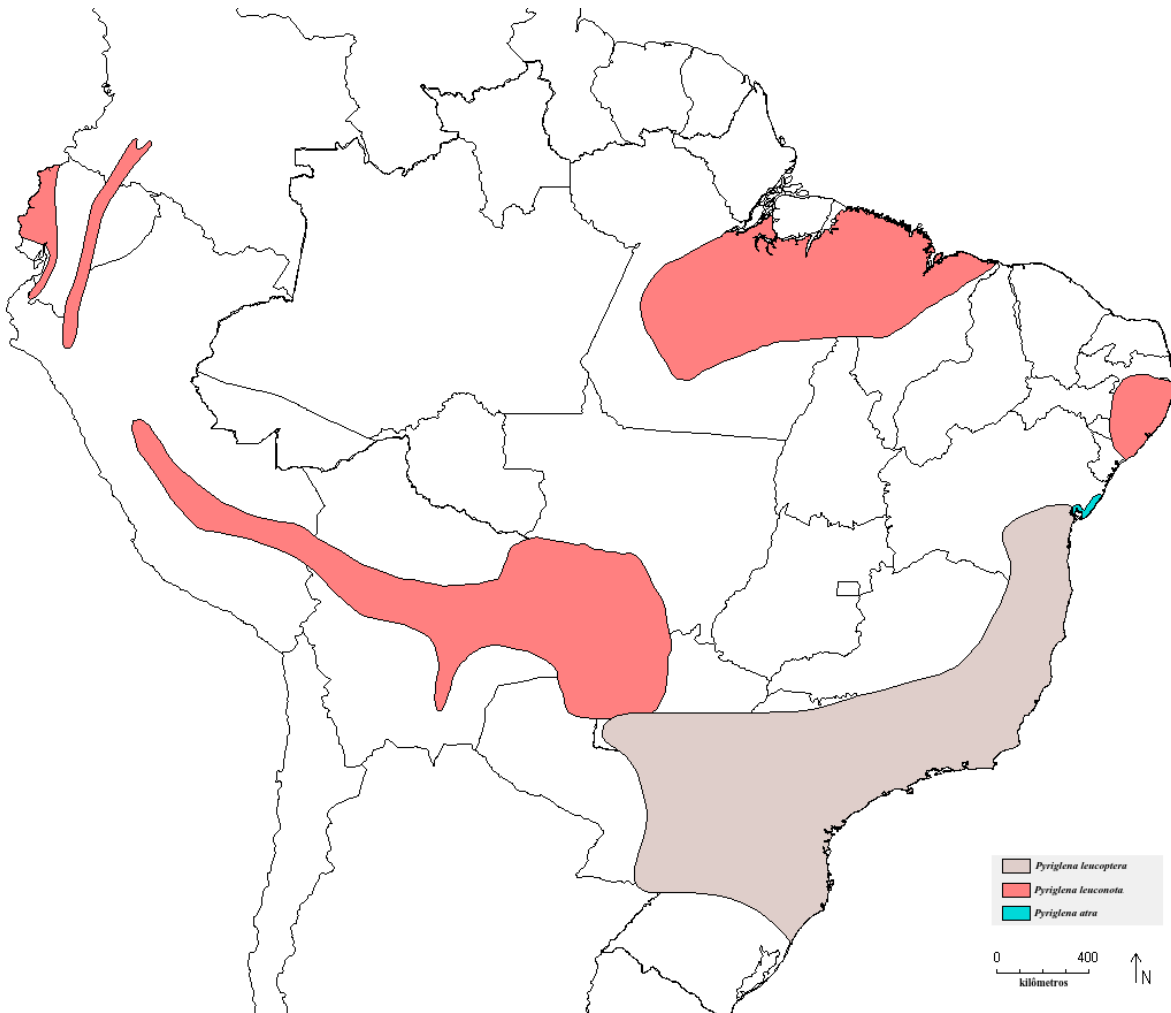


Figura 2 – Distribuição de espécies do gênero *Pyriglena* na América do Sul (BirdLife International, 2014 (<http://www.birdlife.org>) plotados em um único mapa no DIVA-GIS (Hijmans *et al.*, 2001). Salmão: *P. leuconota*; cinza: *P. leucoptera*; azul turquesa: *P. atra*.

Em uma análise filogenética baseada em dados mitocondriais *P. leuconota* foi distribuída em dois clados, um com indivíduos da Mata Atlântica e outro com indivíduos amazônicos; já *P. atra* e *P. leucoptera* foram recuperadas em um único clado, mas não aparecem como reciprocamente monofiléticas (Maldonado-Coelho, 2010; Figura 3). Esse resultado foi corroborado na rede de haplótipos (Figura 4) onde há compartilhamento de um haplótipo de alta frequência entre *P. atra* e a linhagem mais ao norte de *P. leucoptera*.

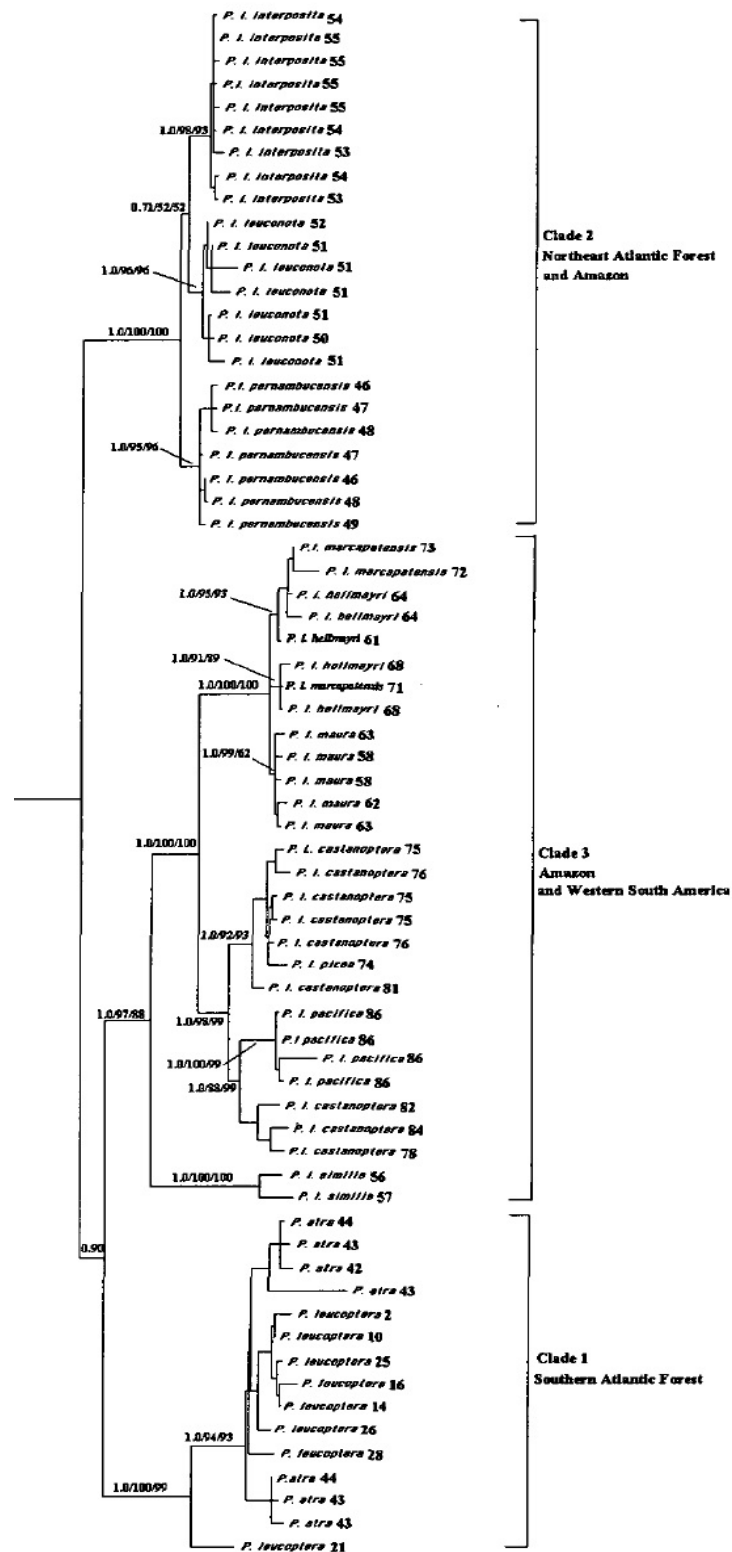


Figura 3 – Árvore de máxima verossimilhança das espécies do gênero *Pyriglena* baseada em 3213pb de quatro genes mitocondriais (modificado de Maldonado-Coelho, 2010). Clado 1: *P. atra* e *P. leucoptera*; clados 2 e 3: *P. leuconota*. Grupos externos retirados dessa imagem.

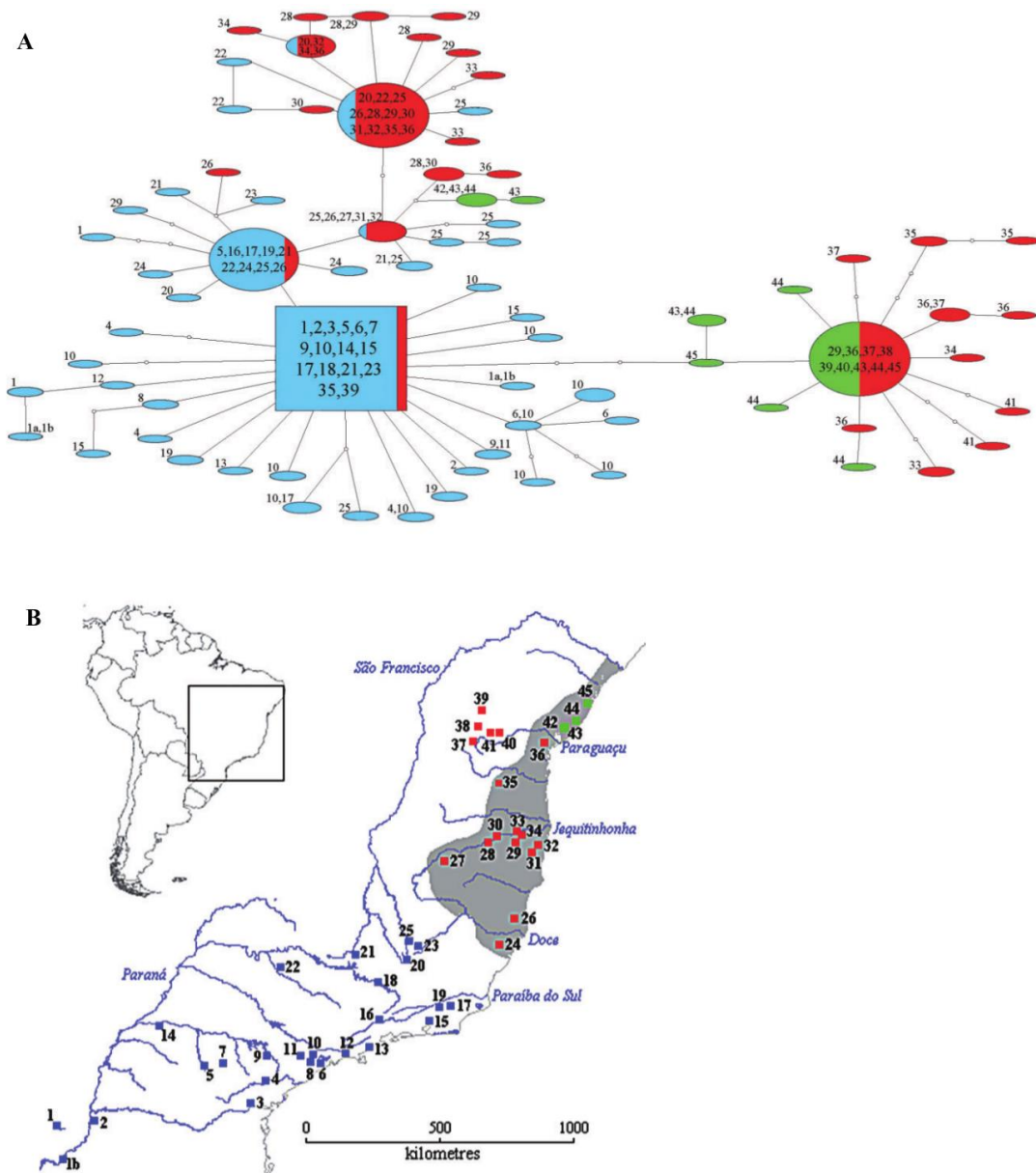


Figura 4 – (A) Rede de haplótipos de *Pyriglena leucoptera* e *P. atra* baseada em 1041pb da subunidade II de NADH desidrogenase 2. Cada círculo representa um haplótipo diferente com tamanho proporcional à sua frequência. Em azul estão representadas sequências de indivíduos de *P. leucoptera* do sul da Mata Atlântica, em vermelho, as de indivíduos de *P. leucoptera* da região central da Mata Atlântica e em verde, as de indivíduos de *P. atra*. Os números correspondem às localidades de amostragem identificados no mapa (B). Fonte: Maldonado-Coelho (2012).

Outra característica muito interessante desse grupo de aves é que há intermediários morfológicos entre *P. atra* e *P. leucoptera* (Willis & Oniki 1982; Figura 5) na região do vale do Rio Paraguaçu, próximo a Salvador/BA, mais precisamente nos arredores da cidade de Ipirá/BA (Maldonado-Coelho 2012 ; Willis & Oniki, 1982). A presença de intermediários morfológicos indica a existência de hibridação e ainda, possível introgressão.

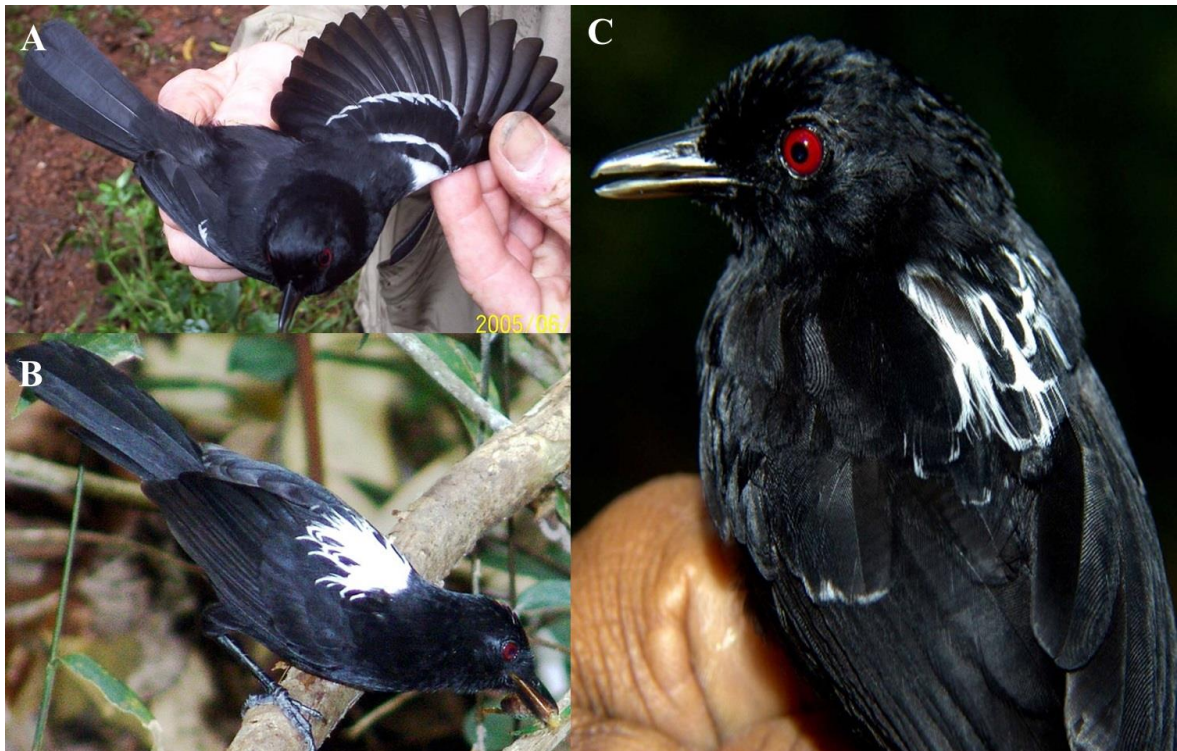


Figura 5 – (A) Detalhe das barras brancas na asa de um macho de *P. leucoptera*. (B) *P. atra* com a mancha interescapular branca típica. (C) Indivíduo intermediário morfológico com barras brancas na asa e mancha interescapular branca. Fotos: Marcos Maldonado-Coelho.

As consequências dessa hibridação são especialmente importantes no caso de *P. atra* que ocorre em uma área restrita e bastante fragmentada nos estados de Sergipe e Bahia (Figura 2) e é considerada ameaçada de extinção (IUCN, 2016). Enquanto *P. leucoptera* é mais abundante. No caso de *P. atra*, devido ao pequeno tamanho populacional, alelos bem adaptados poderiam ser substituídos mesmo com baixas taxas de hibridação. Com isso, pode haver redução do *fitness* devido à depressão por endogamia (Edmands, 2007; Templeton, 1986) e devido à deriva genética (Shrader-Frechette & McCoy, 1993). Portanto, caracterizar se há introgressão em direção à *P. atra* é especialmente importante para planejar ações para sua conservação. Como o estudo da dinâmica dessa região de contato e das forças evolutivas envolvidas ainda foi pouco explorada, o presente estudo pretende compreender o processo de hibridação nessa região baseado em marcadores em escala sub-genômica.

6. Conclusões

1) As sequências obtidas utilizando a metodologia de *Genotyping by Sequencing* não continham dados de DNA mitocondrial e de cromossomos sexuais. Esses marcadores estão sendo analisados em um outro estudo do laboratório e a futura comparação dos resultados deverá permitir realizar uma análise mais abrangente.

2) A falta de sinal claro sobre o número de populações e sua estrutura baseado na análise de mais de 20 mil SNPs pode ser reflexo tanto de isolamento por distância, quanto da hibridação e introgressão detectadas, ou inclusive a combinação de ambos. Como a genômica de organismos não modelo é relativamente recente, esperamos que novas ferramentas de análise estejam disponíveis em um futuro próximo, permitindo testar nossos dados quanto ao isolamento por distância. Além disso, seria importante descrever melhor a história demográfica desses organismos.

3) A existência de um genoma montado e anotado de uma das espécies (*Pyrglena leucoptera* ou *P. atra*) ou de uma espécie próxima seria útil na montagem e comparação das *reads* e permitindo obter dados mais detalhados sobre os SNPs *outliers* (com sinal de estar sob seleção).

4) *P. leucoptera* e *P. atra* apresentam pouco compartilhamento de SNPs, inclusive os intermediários morfológicos não apresentaram mistura. É possível que isso seja reflexo de isolamento por distância. Como a área ao redor da zona de hibridação está muito degradada, é possível que parte da história desses táxons tenha sido perdida. No entanto, é possível que a adição de mais localidades amostradas possa ajudar a reconstruir essa história.

5) O baixo número de SNPs potencialmente com sinal de estarem sob seleção, pode ser resultado de termos analisado apenas dados nucleares autossômicos, possivelmente marcadores neutros. Assim, seria bastante importante ampliar o estudo com a adição de dados mitocondriais e de cromossomos sexuais que podem ser mais adequados para detectar sinal de seleção.

Resumo

A hibridação pode ter várias consequências, incluindo a manutenção ou aumento da diversidade resultando em zonas de hibridação estáveis; a introdução de nova variedade alélica que pode acarretar na origem ou transferência de adaptações, que pode ter efeito positivo no resgate de populações pequenas puras; o reforço do isolamento reprodutivo e a formação de novas linhagens híbridas. Além disso, a hibridação pode reduzir a diversidade, pois a quebra das barreiras reprodutivas e a mescla de populações anteriormente distintas podem acarretar na extinção de uma das populações ou espécies envolvidas na hibridação. Nesse cenário, nosso estudo teve como objetivo estudar uma zona de hibridação no estado da Bahia entre duas espécies de aves, *Pyriglena atra* (Swaison 1825) e *P. leucoptera* (Vieillot 1818). Foram analisados mais de 20.000 SNPs de 20 indivíduos de *P. leucoptera*, 22 de *P. atra* e seis indivíduos intermediários morfológicos. Encontramos pouca a nenhuma mistura genética nos intermediários morfológicos, o que indica um descompasso entre genótipo e fenótipo, o que poderia estar associado ao fato de os marcadores genéticos analisados terem se mostrado neutros, enquanto a morfologia externa pode estar sob pressão de seleção sexual. Foi detectado que as localidades adjacentes à zona de hibridação apresentaram mistura genética na maioria dos indivíduos, um indicativo de que além de hibridação, esteja ocorrendo introgressão entre as espécies, sendo maior em *P. leucoptera*, o que pode ser consequência de “genetic surfing”.

Abstract

Hybridization can have many consequences, including maintenance or increase of diversity resulting in stable hybridization zones; introduction of a new allelic variety that can lead to the origin or transfer of adaptations, that may result on a positive effect on the rescue of small pure populations; enhancement of reproductive isolation and the origin of new species. In addition, hybridization may reduce diversity, as the break of reproductive barriers and the mixture of previously distinct populations may lead to the extinction of one of the populations or species. In this scenario, our study aimed to study a hybridization zone in the state of Bahia between two bird species, *Pyriglena atra* (Swainson 1825) and *P. leucoptera* (Vieillot 1818). We analyzed more than 20,000 SNPs from 20 individuals of *P. leucoptera*, 22 *P. atra* and six morphological intermediate individuals. We found little or no genetic mixture in the morphological intermediates, which indicates a mismatch between genotype and phenotype, possibly because these molecular markers were tested as neutral and these morphological characters could be under sexual selection. The majority of the individuals from localities adjacent to the hybrid zone have mixed ancestry, an indication that, besides hybridization, introgression among the species is occurring but higher into *P. leucoptera* as a possible consequence of genetic surfing.

Referências

- Abbott, R. J. (1992) Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. **Trends in Ecology and Evolution** **7**: 401–405.
- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R. K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczewski, T., Mallet, J., Martinez-Rodriguez, P., Möst, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A. W., Parisod, C., Pfennig, K., Rice, A. M., Ritchie, M. G., Seifert, B., Smadja, C. M., Stelkens, R., Szymura, J. M., Väinölä, R., Wolf, J. B. W., Zinner, D. (2013) Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology** **26**: 229–246.
- Abbott, R.J.; Hegarty, M.J.; Hiscock, S.J.; Brennan, A.C. (2010) Homoploid hybrid speciation in action. **Taxon** **59**: 1375–1386.
- Allendorf, F. W.; Leary, R.F.; Spruell, P.; Wenburg, J. K. (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution** **16**: 613–622.
- Alexander, D.H.; Novembre, J.; Lange, K. (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research** **19**:1655–1664.
- Anderson, E. (1949) **Introgressive Hybridization**. New York: Wiley.
- Anderson, E.; Hubricht, L. (1938) Hybridization in *Tradescantia*. III The evidence for introgressive hybridization. **American Journal of Botany** **25**: 396–402.
- Andersson, L. (1990) The driving force: Species concepts and ecology. **Taxon** **3**: 375-382.
- Andrews, S. (2012) FastQC A quality control tool for high throughput sequence data. [<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>].
- Arnold, M.L. (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** **23**: 237–261.
- Arnold, M. L. (1996) **Natural Hybridization and Evolution**. New York: Oxford University Press.
- Baack, E. J.; Rieseberg, L. H. (2007) A genomic view of introgression and hybrid speciation. **Current Opinion in Genetics and Development** **17**: 513-518.
- Barton, N. H.; Hewitt, G. M. (1985) Analysis of hybrid zones. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** **16**: 113-148.
- Barton, N. H.; Hewitt, G. M. (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. **Nature** **341**: 497-503.
- Barton, N. H.; Gale, K. S. (1993). Genetic analysis of hybrid zones. *In*: R.G. Harrison (ed.). **Hybrid zones and the evolutionary process**. New York: Oxford University Press. Pp.: 13-45.
- Bellott, D. W.; Skaletsky, H.; Cho, T. J.; Brown, L.; Locke, D.; Chen, N.; Galkina, S.; Pyntikova, T.; Koutseva, N.; Graves, T.; Kremitzki, C.; Warren, W.C.; Clark, A.G.; Gaginskaya, E.; Wilson.

R.K.; Page, D.C. (2017). Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. **Nature Genetics** **49.3**: 387-394.

BirdLife International (2014) Ficha de informações sobre espécies: *Pyriglena atra*, *Pyriglena leucoptera*, *Pyriglena leuconota*. Baixado de <http://www.birdlife.org> em 16/11/2014.

Brooks, T.; Tobias, J.; Balford, A. (1999) Deforestation and bird extinction in the Atlantic Forest. **Animal Conservation** **2**: 211-222

Buerkle, C.A.; Wolf, D.E.; Rieseberg, L.H. (2003) The origin and extinction of species through hybridization. *In*: Brigham, C. A., Schwartz, M. W. (eds.) **Population Viability in Plants: Conservation, Management, and Modelling of Rare Plants**. Heidelberg: Springer Verlag. Pp. 117–141.

Buggs, R.J.A. (2007). Empirical study of hybrid zone movement. **Heredity** **99**: 301–312.

Brumfield, R. T.; Tello, J. G.; Cheviron, Z. A.; Carling, M. D.; Crochet, N.; Rosenberg, K. V. (2007) Phylogenetic conservatism and antiquity of a tropical specialization: army-ant-following in the typical antbirds (Thamnophilidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **45**: 1-13.

Cadena, C. D.; Lopez-Lanus, B.; Bates, J. M.; Krabbe, N. ; Rice, N. H.; Stiles, F. G.; Palacio, J. D.; Salaman, P. (2007) A rare case of interspecific hybridization in the tracheophone suboscines: Chestnut-naped Antpitta *Grallaria nuchalis* X Chestnut-crowned Antpitta *G. ruficapilla* in a fragmented landscape. **Ibis** **149**: 814-825.

Câmara, I.G. (2003) Brief history of conservation in the Atlantic forest. *In*: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington D.C.: Center for Applied Biodiversity Science & Island Press. Pp.: 31-42.

Castric, V.; Bechsgaard, J.; Schierup, M.H.; Vekemans, X. (2008) Repeated adaptive introgression at a gene under multiallelic balancing selection. **PLoS Genet** **4**: e1000168.

Chiba, S. (2005) Appearance of morphological novelty in a hybrid zone between two species of land snail. **Evolution** **59**: 1712-1720.

Choler, P.; Erschbamer, B.; Tribsch, A.; Gielly, L.; Taberlet, P. (2004) Genetic introgression as a potential to widen a species' niche: insights from alpine *Carex curvula*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **101**: 171–176.

Cracraft, J. (1983) Species concepts and speciation analysis. *In*: R.F. Johnston (ed.). **Current Ornithology**. New York: Plenum Press. Pp: 159-187.

Currat, M.; Excoffier, L. (2004). Modern humans did not admix with Neanderthals during their range expansion into Europe. **PLoS Biology** **2.12**: e421.

Darwin, C. (1859) **On the Origin of Species by Natural Selection**. London: Murray.

De Queiroz, K. (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. *In*: Howard, D. J.; Berlocher, S. H. (eds.) **Endless forms: Species and Speciation**. New York: Oxford University Press. Pp: 57–75.

- De Queiroz, K. (2005) Ernst Mayr and the modern concept of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **102**: 6600-6607.
- Dobzhansky, T. (1970) **Genetics of the Evolutionary Process** (Vol. 139). New York: Columbia University Press.
- Dobzhansky, T.; Dobzhansky, T. G. (1937) **Genetics and the Origin of Species** (No. 11). New York: Columbia University Press.
- Donoghue, M. J. (1985) A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. **Bryologist** **3**: 172-181.
- Dowling, T. E.; Secor, C. L. (1997) The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** **28**: 593-619.
- Eaton, D. A. (2014) PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. **Bioinformatics** **btu121**.
- Edmands, S. (2007) Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. **Molecular Ecology** **16**: 463-475.
- Edmonds, C. A.; Lillie, A. S.; Cavalli-Sforza, L. L. (2004) Mutations arising in the wave front of an expanding population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **101**: 975-979.
- Ellstrand, N. C. (1992) Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. **Oikos** **63**: 77-86.
- Ellstrand, N. C.; Elam, D. R. (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics** **24**: 217-242.
- Ellstrand, N. C.; Prentice, H. C.; Hancock, J. F. (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. **Annual Review of Ecology and Systematics** **30**: 539-563.
- Ellstrand, N. C.; Schierenbeck, K. A. (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **97**: 7043-7050.
- Elshire, R. J.; Glaubitz, J. C.; Sun, Q.; Poland, J. A.; Kawamoto, K.; Buckler, E. S.; Mitchell, S. E. (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS One** **6**: e19379.
- Frankham, R. (2015) Genetic rescue of small inbred populations: meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow. **Molecular Ecology** **24**: 2610-2618.
- Foll, M.; Gaggiotti, O. E. (2008) A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. **Genetics** **180**: 977-993
- Foll, M.; Fischer, M. C.; Heckel, G.; Excoffier, L. (2010) Estimating population structure from AFLP amplification intensity. **Molecular Ecology** **19**: 4638-4647
- Fischer, M. C.; Foll, M.; Excoffier, L.; Heckel, G. (2011) Enhanced AFLP genome scans detect local adaptation in high-altitude populations of a small rodent (*Microtus arvalis*).

Molecular Ecology **20**: 1450-1462.

Frichot, E.; Mathieu, F.; Trouillon, T.; Bouchard, G.; François, O. (2014) Fast and efficient estimation of individual ancestry coefficients. **Genetics** **196**: 973-983.

Fundação SOS Mata Atlântica & INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). 2001. **Atlas dos Remanescentes Forestais da Mata Atlântica e Ecossistemas Associados no Período de 1995–2000**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica e INPE.

Galindo-Leal, C.; Câmara, I.G. (2003) Atlantic forest hotspots status: an overview. *In*: Galindo-Leal, C.; Câmara, I.G. (eds.). **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. Washington, D.C.: Center for Applied Biodiversity Science & Island Press. Pp.: 3-11.

Grant, P. R.; Grant, B. R. (1992) Hybridization of bird species. **Science** **256**: 193-197.

Grant, P. R.; Grant, B. R. (1994) Phenotypic and genetic effects of hybridization in Darwin's finches. **Evolution** **48**: 297-316.

Graves, G. R. (1992) Diagnosis of a hybrid antbird (*Phlegopsis nigromaculata* X *Phlegopsis erythroptera*) and the rarity of hybridization among suboscines. **Proceedings of the Biological Society of Washington** **105**: 834-840.

Gross, B.L.; Rieseberg, L.H. (2005) The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. **Journal of Heredity** **96**: 241–252.

Levin, D. A.; Francisco-Ortega, J.; Jansen, R. K. (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species. **Conservation Biology** **10**: 10–16.

Harrison, R. G. (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *In*: Futuyma, D., Antonovics, J. (eds.) **Oxford Surveys in Evolutionary Biology**. New York: Oxford University Press. Pp.: 69–128.

Harrison, R. G. (Ed.) (1993) **Hybrid Zones and the Evolutionary Process**. New York: Oxford University Press.

Harrison, R. G. (1998) Linking evolutionary pattern and process. *In*: Howard, D. J. and Berlocher, S. H. (eds.) **Endless Forms: Species and Speciation**. New York: Oxford University Press. Pp: 19-31.

Heusmann, H. W. (1974) Mallard-black duck relationships in the northeast. **Wildlife Society Bulletin** **2**: 171-177.

Huxley, J. (1942) **Evolution. The Modern Synthesis**. London: George Alien & Unwin Ltd.

Isler, M. L.; Bravo, G. A.; Brumfield, R. T. (2013) Taxonomic revision of *Myrmeciza* (Aves: Passeriformes: Thamnophilidae) into 12 genera based on phylogenetic, morphological, behavioral, and ecological data. **Zootaxa** **3717**: 469–497.

Isler, M. L.; Maldonado-Coelho, M. (2017) Calls distinguish species of Antbirds (Aves: Passeriformes: Thamnophilidae) in the genus *Pyriglena*. **Zootaxa**: No prelo.

IUCN (2016) **Red List of Threatened Species**. Versão 2015.4. Disponível em <<http://iucnredlist.org>>. Acesso em [01.2016].

- Jiggins, C.D.; Salazar, C.; Linares, M.; Mavarez, J. (2008) Hybrid trait speciation and *Heliconius* butterflies. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B** **363**: 3047–3054.
- Johnsgard, P. A. (1961) Evolutionary relationships among the North American mallards. **The Auk** **78**: 3-43.
- Kim, M.; Cui, M.-L.; Cubas, P.; Gillies, A.; Lee, K.; Chapman, M.A; Abbott, R.J.; Coen, E. (2008) Regulatory genes control a key morphological and ecological trait transferred between species. **Science** **322**: 1116–1119.
- Klopfstein, S.; Currat, M.; Excoffier, L. (2005). The fate of mutations surfing on the wave of a range expansion. **Molecular biology and evolution** **23.3**: 482-490.
- Kumar, G., & Kocour, M. (2017). Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. **Fisheries Research** **186**: 11-22.
- Langmead, B.; Salzberg, S. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods** **9**: 357-359.
- Lischer, H. E. L.; Excoffier, L. (2012) PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics** **28**: 298-299.
- Maldonado-Coelho, M. (2010) **Evolution and Biogeography of South American Fire-Eyes (Genus *Pyriglena*): Insights from Molecules and Songs**. PhD Dissertation. St Louis, University of Missouri.
- 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.
- Mallet, J. (2005) Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in Ecology and Evolution** **20**: 229–237.
- Mallet, J. (2007) Hybrid speciation. **Nature** **446**: 279–283.
- Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W. E.; Attiya, S.; Bader, J. S.; Bemben, L. A.; Volkmer, G. A. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature** **437**: 376-380.
- Martin, N.H.; Bouck, A.C.; Arnold, M.L. (2006) Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. **Genetics** **172**: 2481–2489.
- Martinsen, G.D.; Whitham, T.G.; Turek, R.J.; Keim, P. (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. **Evolution** **55**: 1325–1335.
- Mayden, R. L. (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. *In*: M. F. Claridge, H. A. Dawah, M. R. Wilson (eds.) **Species: The units of diversity**. London: Chapman and Hall. Pp: 381–423.
- Mayr, E. (1942) **Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist**. Cambridge: Harvard University Press.
- Mayr, E.; Provine, W. B., (eds). (1980) **The Evolutionary Synthesis: Perspectives on the Unification of Biology**. Cambridge: Harvard University Press.

- Mayr, E. (1982) **The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press.
- McCormack, J. E.; Maley, J. M.; Hird, S. M.; Derryberry, E. P.; Graves, G. R.; Brumfield, R. T. (2012) Next-generation sequencing reveals phylogeographic structure and a species tree for recent bird divergences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **62**: 397-406.
- Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics** **11**: 31–46.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** **403**: 853-845.
- Nixon, K. C.; Wheeler, Q. D. (1990) An amplification of the phylogenetic species concept. **Cladistics** **6**: 211-223.
- Oliveira-Filho, A.T.; Fontes, M.A.L. (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica** **32**: 793-810.
- Parsons, T. J.; Olson, S. L.; Braun, M. J. (1993) Unidirectional spread of secondary sexual plumage traits across an avian hybrid zone. **Science** **11**: 1643-1646.
- Pickrell, J. K.; Pritchard, J. K. (2012) Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data. **PLoS Genet** **8**: e1002967.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** **155**: 945–959.
- Price, T. (2008) **Speciation in Birds**. Greenwood Village: Roberts and Co..
- Raj, A.; Stephens, M.; Pritchard, J. K. (2014) fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. **Genetics** **197**: 573-589.
- Reich, D.; Thangaraj, K.; Patterson, N.; Price, A.L.; Singh L. (2009) Reconstructing Indian population history. **Nature** **461**: 489–494.
- Remsen Jr, J. V.; Cadena, C. D.; Jaramillo, A., Nores, M., Pacheco, J. F., Pérez-Emán, J.; Robbins, M.B.; Stiles, F.G.; Stotz, D.F.; Zimmer, K. J. (2016). A Classification of the Bird Species of South America. Version 20 September 2016. **American Ornithologists' Union**. Available from: <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>.
- Rhymer, J. M.; Simberloff, D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics** **27**: 83–109.
- Ribeiro, M. C.; Metzger, J. P.; Martensen, A. C.; Ponzoni, F. J.; Hirota, M. M. (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** **142**: 1141-1153.
- Ridgely, R. S.; Tudor, G. (1984) **The Birds of South America. The Suboscine Passerines. Volume II**. Austin: University of Texas.
- Rieseberg, L. H.; Archer, M. A.; Wayne, R. K. (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. **Heredity** **83**: 363-372.

Rieseberg, L.H.; Baird, S.J.E.; Gardner, K.A. (2000). Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Biology* **42**: 205–224.

Rieseberg, L.H.; Carney, S.E. (1998) Tansley review no. 102 Plant hybridization. *New Phytologist* **140**: 599–624.

Rieseberg, L.H.; Ellstrand, N.C. (1993). What can molecular and morphological markers tell us about Plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**: 213–241.

Rieseberg, L.H.; Zona, S.; Abernomb, L.; Martin, T.D. (1989) Hybridization in the island endemic, Catalina mahogany. *Conservation Biology* **3**: 52-58.

Rosen, D. E. (1979) Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of the British Museum of Natural History* **162**: 267-376.

Sanger, F.; Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **94**: 441IN19447-446IN20448.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.

Schwenk, K.; Brede, N.; Streit, B. (2008) Introduction. Extent processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* **363**: 2805–2811.

Seddon, N.; Tobias, J. A. (2007) Song divergence at the edge of Amazonia: an empirical test of the peripatric speciation model. *Biological Journal of the Linnean Society* **90**: 173-188.

Seehausen, O. (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 198-207.

Shendure, J.; Porreca, G. J.; Reppas, N. B.; Lin, X.; McCutcheon, J. P.; Rosenbaum, A. M.; Church, G. M. (2005) Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* **309**: 1728-1732.

Shrader-Frechette, K. S.; McCoy, E. D. (1993) **Methods in Ecology: Strategies for Conservation**. Cambridge: Cambridge University Press.

Silva, J.M.C; Casteleti, C.H.M. (2003) Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Trends, and Outlook**. Washington, D.C.: Center for Applied Biodiversity Science & Island Press. Pp.: 43-59.

Stamos, D.N. (2003) **The Species Problem: Biological Species, Ontology, and the Metaphysics of Biology**. Lanham: Lexington Books.

Stebbins, G. L. (1959) The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* **103**: 231–251.

Tabarelli, M.; Pinto, L.P.; Silva, J.M.C.; Costa, C.M.R. (2003) The Atlantic Forest of Brazil: endangered species and conservation planning. In: C. Galindo-Leal & I.G. Câmara (eds.). **The**

Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Trends, and Outlook. Washington, D.C.: Center for Applied Biodiversity Science & Island Press. Pp.: 86-94.

Tabarelli, M.; Pinto, L.P.; Silva, J.M.C.; Hirota, M.M.; Bedê, L.C. (2005) Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade 1**: 132-138.

Templeton, A. R. (1986) Coadaptation and outbreeding depression. *In*: Soulé, N. (ed.) **Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland: Sinauer Associates. Pp.: 105–116.

Todesco, M.; Pascual, M. A.; Owens, G. L.; Ostevik, K. L.; Moyers, B. T.; Hübner, S.; Heredia, S. M.; Hajn, M. A.; Caseys, C.; Bock, D. G.; Rieseberg, L. H. (2016) Hybridization and extinction. **Evolutionary Applications 9**: 892-908.

Twyford, A. D.; Ennos, R. A. (2012) Next-generation hybridization and introgression. **Heredity 108**: 179-189.

Van Valen, L. (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. **Taxon 25**: 233-239.

Vuillaume, B.; Valette, V.; Lepais, O.; Grandjean, F.; Breuil, M (2015) Genetic evidence of hybridization between the endangered native species *Iguana delicatissima* and the invasive *Iguana iguana* (Reptilia, Iguanidae) in the Lesser Antilles: management implications. **PLoS ONE 10**: e0127575.

Walsh, J.; Lovette, I. J.; Winder, V.; Elphick, C. S.; Olsen, B. J.; Shriver, G.; Kovach, A. I. (2017). Subspecies delineation amid phenotypic, geographic and genetic discordance in a songbird. **Molecular Ecology 26**: 1242-1255.

Weir, J. T.; Faccio, M. S.; Pulido-Santacruz, P.; Barrera-Guzmán, A. O.; Aleixo, A. (2015) Hybridization in headwater regions, and the role of rivers as drivers of speciation in Amazonian birds. **Evolution 69**: 1823-1834.

Willis, E. O. (1981) Diversity in adversity: the behaviors of two subordinate antbirds. **Arquivos de Zoologia 30**: 159-234.

Willis, E. O.; Oniki, Y. (1982) Behavior of Fringe-backed Fire-eyes (*Pyriglena atra*, Formicariidae): a test case for taxonomy versus conservation. **Revista Brasileira de Biologia 42**: 213-223.

Wolf, D. E.; Takebayashi, N.; Rieseberg, L. H. (2001) Predicting the risk of extinction through hybridization. **Conservation Biology 15**: 1039–1053.

Zhang, J.; Kobert, K.; Flouri, T.; Stamatakis, A. (2014) PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics 30**: 614-620.

Zimmer, K. J.; Isler, M. L. (2003) Family Thamnophilidae (typical antbirds). *In*: del Hoyo, J.; Elliott, A.; Christie, D.A. (eds.) **Handbook of Birds of the World**. Barcelona: Lynx Edicions. Pp.: 448-592.

Zhou, H.; Alexander, D. H.; Lange, K. (2011) A quasi-Newton method for accelerating the convergence of iterative optimization algorithms. **Statistics and Computing 21.2**: 261-273.