

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

**Análise da variação fenotípica e genotípica do complexo *Brotogeris sanctithomae* (Aves:
Psittaciformes)**

Roberta de Castro Canton

Manaus, Amazonas

Junho, 2014

Roberta de Castro Canton

Análise da variação fenotípica e genotípica do complexo *Brotogeris sanctithomae* (Aves: Psittaciformes)

Orientadora: Dra Camila Cherem Ribas

Co-orientadores: Dr Tomas Hrbek; Dr Mario Cohn-Haft

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Junho, 2014

Banca Examinadora do trabalho:**Nome (Instituição)**

Dr. Fabio Raposo do Amaral (UNIFESP)

Dra. Waleska Gravena (UFAM)

Dr. Jansen Zuanon (INPA)

Parecer

Aprovado com Distinção e Louvor

Aprovado com Distinção e Louvor

Aprovado com Distinção e Louvor

C232 Canton, Roberta de Castro
 Análise da variação fenotípica e genotípica do complexo
 Brotogeris sanctithomae (Aves: Psittaciformes) / Roberta de Castro
 Canton. --- Manaus: [s.n.], 2015.
 xii, 41 f. : il.

 Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.
 Orientador : Camila Ribas.
 Coorientador : Tomas Hrbek, Mario Cohn-Haft.
 Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia
 Evolutiva.

 1. Avifauna de várzea. 2. Complexo *Brotogeris Sanctithomae*.
 3. Psittaciformes. I. Título.

CDD 598.71

Sinopse:

São investigados os limites das distribuições das duas subespécies de *Brotogeris sanctithomae*. Realizada uma análise morfológica dos indivíduos e desenvolvidos marcadores SNPs a partir de *ddRAD tags*, para detectar locos diferenciando as duas subespécies. Detectam-se os grupos biológicos existentes na espécie, seus fenótipos e a ocorrência de hibridização. Por fim, são inferidos os processos biogeográficos históricos que possam ter causado a divergência dentro da espécie e barreiras atuais que as mantêm.

Palavras-chave: Seleção Sexual, Avifauna de várzea, Psitacídeos, Hibridização, Divergência genômica heterogênea.

À minha avó, Eline.

Agradecimentos

Agradeço meus pais, por sempre estimularem meus sonhos. Pelo amor, carinho e confiança. Por todos os esforços dedicados à criação dos filhos e pelo investimento na minha educação. Por se realizarem através das realizações dos filhos. Meus irmãos e minha avó, pelo amor e carinho de todos os dias.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, pela infraestrutura e apoio oferecidos e, acima de tudo, por terem significado um sonho.

Aos meus orientadores, sempre tão atarefados, mas que conseguiam se reunir para conversar sobre os *Brotogeris* e formaram um time em minha orientação.

Tomas por me permitir trabalhar com aves em seu laboratório, por ter confiado no projeto e em minha capacidade, mesmo quando eu mesma não confiava. Por não ter me deixado desistir e trocar de projeto.

Camila, por compartilhar as preocupações, e mesmo com as obrigações da maternidade não ter faltado com orientação com mais uma da prole. Por ter sido firme, mas sempre com palavras de carinho.

Mario, pela sugestão do projeto. Pelo entusiasmo, por não me deixar desistir nem me abater nas maiores dificuldades. Pela dedicação em todas as etapas do projeto, até nas mais moleculóides. Por ter me feito rir, por ter me escutado chorar. Pela amizade.

José Gregório, meu orientador informal. Pelas vezes que dedicou seu tempo para esclarecer dúvidas, acompanhar protocolo, sugerir, corrigir, alertar! Ou simplesmente ouvir e me ajudar a compreender todos os “trâmites” desta jornada.

Izeni, porque desde sempre compartilha das alegrias e sucessos em toda a minha caminhada.

Aos docentes do PPG. Passaram pela minha formação de mestrado e deixaram não só ensinamentos teóricos, mas serviram de exemplo de dedicação e profissionalismo. Eliana Feldberg, Gislene Zilse, Claudia Gross, Carlos Schneider. Charles Clement por ter confiado em minha competência e investido na minha participação no curso de análises genéticas GUYAMAZ.

Aos amigos feitos nesta jornada. Maysa, Renan e Ramão pela convivência constante, por juntos termos construído algo que nos orgulha tanto. Aline, Ana Paula e Renan Coser, por compartilharem os desesperos de disciplinas e de laboratórios. Lincoln, Sandra, Thalita e Laís, pelos momentos mais divertidos.

Aos amigos de LEGAL. Porque nós sabemos como são com nossos projetos, quase sempre tão difíceis, às vezes mirabolantes. Mas no final nos fazem ter muito orgulho do grupo de pesquisa em que estamos e da nossa capacidade de lidar com dados e análises tão difíceis e com prazos tão apertados. Sandra, Pedro Senna, Elciomar, Vinicius, Emanuell, Zamora, Pri, Juh, Joice, Gabi, Ana Paula das Preguiças, Deyla, Valéria. Waleska e Mario Nunes.

Aos amigos de UFAM, sempre presente. Dudu, Leo, Sergio, Rod. Juh, Thay, Lore, Monique.

Às melhores amigas que eu poderia pedir. Desde sempre e para sempre. Aline, Dedê, Flora, Jana, Lari, Manu e Tami.

Aos meus brotinhos, por terem me dado resultados sensacionais e me inspirarem tanto.

"Deus ao mar o perigo e o abismo deu,

Mas nele é que espelhou o céu."

Fernando Pessoa

Resumo

Brotogeris sanctithomae é um psitacídeo da várzea amazônica, conhecido na região como "periquito-estrela", devido à testa amarela contrastando com o resto da plumagem verde. Suas duas subespécies se diferenciam por uma mancha amarela na região pós-ocular, presente em *B. s. takatsukasae*, que ocorre na região leste da várzea amazônica, e ausente em *B. s. sanctithomae*, da porção oeste. As duas subespécies se encontram próxima a Manaus, embora seus limites geográficos não estejam claros na literatura. Apesar das diferenças fenotípicas e distribuições distintas, uma recente análise filogenética do gênero *Brotogeris* não encontrou covariação molecular (ND2, citocromo b e íntron 7 do gene beta-fibrinogênio) que distinga os dois táxons. Realizamos este estudo para entender os processos evolutivos relacionados ao padrão de diferenciação de plumagem entre as duas subespécies, bem como caracterizar a distribuição geográfica das variações fenotípicas e genotípicas. Para tanto, realizamos coletas na região ao longo do trecho de várzea onde as duas subespécies se substituem (entre Manacapuru e Parintins, Amazonas). Realizamos também uma análise morfológica desses indivíduos e de espécimes de coleções ornitológicas e desenvolvemos marcadores SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único) a partir de *ddRAD tags* (DNA associado aos sítios de restrição duas vezes digerido). Foram encontrados dois grupos genéticos, correspondentes aos grupos fenotípicos (subespécies). As duas subespécies compartilham a maior parte do genoma, divergindo-se em apenas alguns poucos locos. Estes locos divergentes apresentaram associação mais forte à cor de íris do que à mancha pós-ocular. Esta característica possivelmente mantém a diferenciação entre as duas subespécies através de seleção sexual, em que os indivíduos morfológicamente distintos tendem a não se reconhecer como parceiros. Ocorre hibridização em uma região restrita, no contato das distribuições dos fenótipos puros. Reconhecimento de híbridos numa região estreita sem barreiras geográficas evidentes, em vez de variação fenotípica e genotípica gradativa ao longa da distribuição toda, sugere contato secundário entre populações previamente diferenciadas em alopatria.

Palavras-chave: Várzea amazônica, SNPs, *ddRAD tags*, hibridização, especiação recente, Divergência genômica heterogênea.

*Abstract***Analysis of the Phenotypic and Genotypic Variation in the *Brotogeris sanctithomae* complex (Avian: Psittaciformes)**

Brotogeris sanctithomae is a parakeet of the Amazonian floodplain forests, recognized by its yellow forehead contrasting with its otherwise all-green plumage. Its two subspecies are distinguished by a yellow mark in the post-ocular region present in *B. s. takatsukasae*, of eastern Amazonia, and absent in *B. s. sanctithomae*, from the western portion. The two meet somewhere near Manaus, although their geographical limits are not clear in the literature. Despite the phenotypic differences and distinct distributions, a recent phylogenetic analysis of *Brotogeris* did not find molecular covariance (ND2, cytochrome b intron 7 of beta-fibrinogen gene) that distinguishes the two taxa. We set out to understand the evolutionary processes related to the pattern of plumage differentiation between the two subspecies, and to determine the geographic distribution of phenotypic and genotypic variation. We sampled throughout the stretch of floodplains where the two subspecies replace one another (between Manacapuru and Parintins, Amazonas). We conducted a morphological analysis of these individuals and specimens in ornithological collections and developed SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers from *ddRAD tags* (double digested Restriction-site Associated DNA). Two genetic groups were found, corresponding with the phenotypic groups (subspecies). The two subspecies share most of the genome, diverging only in a few loci. These divergent loci were more strongly associated with iris color than presence/absence of the post-ocular mark. This character may maintain differentiation between the two subspecies via sexual selection, whereby morphologically distinct individuals tend not to pair. Hybridization occurs in a restricted region between the distributions of the pure phenotypes. Recognition of hybrids in a narrow region without geographic barriers, rather than gradual phenotypic and genotypic variation on a long cline, suggests secondary contact between populations previously differentiated in allopatry.

Keywords: Amazonian floodplain, SNP, *ddRAD tags*, hybridization, Heterogeneous Genomic Divergence.

SÚMARIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 5 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 5 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 5 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 6 |
| 3.1 Delineamento amostral..... | 6 |
| 3.2 Obtenção de <i>ddRAD tags</i> | 7 |
| 3.3 Obtenção de SNPs..... | 11 |
| 3.4 Análises..... | 13 |
| 4. RESULTADOS..... | 15 |
| 4.1. Variação Fenotípica..... | 15 |
| 4.1.1. Distribuição geográfica da variação fenotípica..... | 15 |
| 4.1.2. Associação de fenótipo a sexo e idade..... | 18 |
| 4.2. Variação Genética..... | 18 |
| 4.2.1. Associação de locos ao fenótipo..... | 19 |
| 4.2.2. Análises de estrutura populacional..... | 22 |
| 4.2.3. Distância genética..... | 26 |
| 4.2.4. Variação entre e dentro das populações..... | 28 |
| 4.2.5. Locus sob seleção divergente..... | 28 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 30 |
| 5.1. Seleção de locos para análises genéticas..... | 30 |
| 5.2. Variação no genoma de <i>Brotogeris sanctithomae</i> | 31 |
| 5.3. Separação entre Leste e Oeste da Amazônia e contato secundário..... | 31 |
| 5.4. Refutando a hipótese de seleção natural divergente | 32 |
| 5.5. Seleção sexual e Hibridização | 33 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 36 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 38 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Locus que apresentaram significância maior que 0,001 para o índice de diferenciação F_{ST} de Wright. As comparações foram realizadas entre os agrupamentos *a priori* de cor de íris, mancha e ambas as características fenotípicas, incluindo todos os caracteres amostrados. 21
- Tabela 2: Locus que apresentaram significância maior que 0,001 no teste exato de Fisher de diferenciação. As comparações foram realizadas entre os agrupamentos *a priori* de cor de íris, mancha e ambas as características fenotípicas, incluindo todos os caracteres amostrados. 21
- Tabela 3: Valores de distância genética das comparações par a par entre os grupos de populações de *B. sanctithomae* com padrão de mancha pós-ocular diferente. 26
- Tabela 4: Valores de distância genética das comparações par a par entre os grupos de populações de *B. sanctithomae* com cores de íris diferentes. 27
- Tabela 5: Valores de distância genética das comparações par a par entre os grupos de populações com combinações fenotípicas diferentes. 27
- Tabela 6: Valores de distância genética das comparações par a par entre as populações de *B. sanctithomae* de localidades diferentes. Entre parênteses está a distância geográfica entre essas populações, em quilômetros. 28
- Tabela 7: Coeficiente de variação fenotípica das comparações par a par entre as populações a partir dos agrupamentos *a priori* de cor de íris, padrão de mancha e ambas as características fenotípicas, incluindo todos os caracteres amostrados. 28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fenótipo típico de cada subespécie: (1^a) *B. s. sanctithoame* sem mancha pós-ocular, presente na Amazônia Ocidental; (1B) *B. s. takatsukasae* com mancha pós-ocular presente, da Amazônia Oriental. Fotos de Anselmo d’Affonseca. 3
- Figura 2: Pontos de coletas e números de amostras (entre parênteses) dentro da distribuição da *B. sanctithoae* (área sombreada) segundo a IUCN. Δ Representa as localidades onde foram realizadas coleta para este estudo; 1: Manacapuru (21); 2: Manaus (6); 3: Novo Remanso (10); 4: Itacoatiara (20); 5: Uruará (4); 6: Parintins (10). \blacktriangle Localidades das amostras de empréstimo: 1: Rio Juruá (2), no Acre; 2: Rio Iaco (1), no Acre; 3: Coari (2), no Amazonas; 4: Ilha do Marajó (2), no Pará. 7
- Figura 3: O DNA é fragmentado pelas enzimas de restrição *SdaI* e *Csp6* e os adaptadores P1 e A são ligados aos fragmentos. Nos adaptadores, está em destaque a sequência do sítio de reconhecimento das enzimas (vermelho) e as sequências dos sítios de anelamento para o *primer* da PCR (amarelo). O adaptador A também contém a sequência *barcode* (laranja) e o adaptador P1 o sítio de anelamento para o *primer* do sequenciamento (azul). 8
- Figura 4: Os três tipos de fragmentos obtidos depois da ligação dos adaptadores. (A) Os fragmentos com o adaptador A nas duas extremidades não serão amplificados devido a ausência de sítio de anelamento para os *primers* nas extremidades 5’. (B) Os fragmentos com adaptador P1 nas duas extremidades serão raros. (C) Serão amplificados com maior frequência os fragmentos que possuem os dois tipos de adaptadores (4C). 9
- Figura 5: Visualização em gel de agarose do produto de PCR das digestões, onde é possível notar a presença de uma banda mais forte um pouco abaixo de 500pb. 10
- Figura 6: Variações fenotípicas encontradas em padrão de mancha pós-ocular (primeira linha), variando desde sem mancha (esquerda) e manchas pequenas até mancha amarela grande (direita). E em cor de íris (segunda linha), variando de branco amarelado (esquerda) e tons de bege e cinza até marrom (direita). 15
- Figura 7: Combinações fenotípicas amostradas e localidades em que foram encontradas. Os desenhos ilustram as duas características fenotípicas. A mancha pós-ocular ausente é mostrada, através do desenho verde atrás do olho, como no fenótipo 1. A variação intermediária da mancha aparece nos fenótipos 2, 3 e 5, como uma pequena mancha amarela no meio da faixa verde. Já a mancha presente é ilustrada como uma faixa completamente amarela, como nos fenótipos 4 e 6. A íris clara, presente nos fenótipos 1 e 2, aparece pintada de ‘branco-amarelado’. A íris intermediária é ilustrada em cinza, nos fenótipos 3 e 4. E a íris marrom é apresentada nos fenótipos 5 e 6. Os três desenhos da última linha mostram as combinações fenotípicas que foram amostradas apenas uma vez ou nenhuma. Ao lado direito de cada desenho estão as localidades em que aquela combinação fenotípica foi amostrada, com número de indivíduos entre parênteses. Esses esquemas serão utilizados em todo o trabalho para ilustrar as combinações fenotípicas amostradas. 16
- Figura 8: Combinações fenotípicas amostradas e localidades em que foram encontradas. 17
- Figura 9: Distribuição de frequências das médias dos valores de F_{ST} por loco, na comparação de populações com padrões de mancha diferentes. No eixo X estão os valores de F_{ST} e no eixo Y o número de locos. 19
- Figura 10: Distribuição de frequências das médias dos valores de F_{ST} por loco, na comparação de populações com cores de íris diferentes. No eixo X estão os valores de F_{ST} e no eixo Y o número de locos. 20

Figura 11: Distribuição de frequências das médias dos valores de F_{ST} por loco, na comparação de populações com diferentes combinações das duas características. No eixo X estão os valores de F_{ST} e no eixo Y o número de locos.

20

Figura 12: Gráfico de probabilidades posteriores de número de grupos biológicos dentre as amostras de *Brotogeris sanctithomae*. As barras verticais representam o desvio padrão com base em 10 réplicas. Ilustração gerada no programa Harvester.

22

Figura 13: Distribuição dos indivíduos de *B. sanctithomae* segundo as características fenotípicas, a partir de agrupamentos *a priori* de fenótipo. (A) para as duas características juntas, (B) para padrão de mancha e (C) para cor de íris e (13) para os dois fenótipos com $k=3$.

24

Figura 14: Distribuição dos indivíduos em função dos agrupamentos *a priori* de localidade. (A) para localidade em que foram coletadas ao longo da várzea e (B) para margem dos rios Solimões/Amazonas.

25

Figura 15: Distribuição geográfica dos fenótipos puros de cada característica e dos grupos biológicos. Na primeira linha, a cor verde corresponde à distribuição da mancha ausente, e a cor amarela da mancha presente. Na segunda linha estão as informações dos fenótipos de íris: branco-amarelado para a distribuição da íris clara, e marrom para íris marrom. Na terceira linha, a cor vermelha se refere à distribuição do grupo genético de *B. s. sanctithomae* e o azul para o *B. s. takatsukasae*. Em cinza estão as frequências das variações intermediárias de íris e de mancha, e de genótipos híbridos, para cada localidade. Os fenótipos típicos se limitaram entre as localidades vizinhas Novo Remanso e Itacoatiara. Indivíduos com genoma “puro” das duas subespécies ocorreram em Novo Remanso. Enquanto que a variação intermediária de mancha foi amostrada em todas as localidades, a variação intermediária de íris e os indivíduos misturados geneticamente foram amostrados apenas nas localidades próximas da substituição das subespécies.

26

Figura 16: Valores de F_{ST} por loco, realizado no software Bayescan. Um loco (68) apresenta fator de Bayes maior que 1.0 (forte evidência de seleção).

29

1. INTRODUÇÃO

Especiação em aves amazônicas tem sido frequentemente associada a eventos alopátricos, e a manutenção de endemismos à presença de barreiras geográficas ou ecológicas. Desde as observações dos primeiros naturalistas que chegaram à região até os inventários de fauna mais modernos, é possível constatar que as regiões de terra delimitadas pelos grandes rios amazônicos apresentam diversidade de espécies relativamente uniforme, e que diferentes morfotipos aparentados estão presentes nas margens opostas desses rios (Wallace, 1852). Filogenias moleculares recentes demonstraram que populações de interflúvios diferentes apresentam fluxo gênico reduzido ou inexistente, corroborando a atuação dos rios como barreiras isolando populações de organismos terrestres (Capparella, 1987; Hackett, 1993; Ribas *et al.*, 2012).

No entanto, a maior parte desses trabalhos se concentrou na avifauna de terra firme, até então mais explorada e inventariada que a fauna das florestas alagadas e outros ambientes menos comuns. A continuidade linear da várzea cria conectividade entre todas as populações de espécies que habitam esse ambiente, inclusive de margens opostas dos rios (Cohn-Haft *et al.*, 2007). Esta conectividade se deve à ausência de interrupção ou substituição de paisagem, ou presença de quaisquer barreiras físicas que impeçam a dispersão. A sazonalidade das cheias e secas, e a dinâmica de erosão e deposição nas planícies aluviais também exigem que seus habitantes sejam bons dispersores, para colonizar locais adequados (Cohn-Haft *et al.*, 2007). Ainda, a presença de ilhas no meio dos rios torna mais fácil a passagem de uma margem a outra. As diferenças entre as paisagens da terra firme das de várzea, além de diferenças na fauna característica de cada ambiente, tornam improvável um padrão de endemismo por interflúvio em espécies de floresta alagada. Os poucos estudos filogeográficos realizados com aves de várzea não detectaram estrutura genética entre populações distantes e evidenciaram a esperada ausência de diferenciação entre margens opostas dos rios (Aleixo *et al.*, 2006, Cadena *et al.*, 2011).

Por outro lado, em um dos poucos estudos que buscou caracterizar as distribuições geográficas e avaliar possíveis padrões de endemismo da avifauna da várzea, Cohn-Haft *et al.* (2007) demonstraram que apesar do ambiente ser atualmente contínuo, existe endemismo em subregiões da várzea, sendo o padrão mais comum a ocorrência de táxons restritos à Amazônia Ocidental ou Oriental. Para algumas aves, uma espécie encontrada por toda (ou quase toda) porção oeste da região é subitamente substituída na porção leste por outra subespécie ou espécie congênere. Embora os limites exatos das distribuições tenham variado

entre casos específicos, a região de várzea nas proximidades de Manaus é mencionada como local de substituição para a maioria desses táxons, ainda que não existam hoje barreiras geográficas ou fatores ecológicos aparentes que limitem as distribuições desses organismos. Por outro lado, de acordo com as reconstruções paleoambientais propostas para a Amazônia (Hoorn *et al.*, 2010; Latrubesse *et al.*, 2010, Nogueira *et al.*, 2014), durante uma parte de sua história recente a bacia foi dividida em duas, com um ambiente lacustre predominando no oeste e um ambiente fluvial no leste. O limite hipotético entre essas duas regiões coincide com a divisão entre as principais bacias sedimentares da Amazônia (Solimões e Amazonas), que é marcado pelo arco de Purus, cerca de 300 km a oeste de Manaus. Apesar da existência da documentação desses padrões de substituição de táxons de várzea nessa região, nenhum estudo detalhado foi realizado para investigar precisamente os limites dessas distribuições.

Um exemplo de espécie que apresenta esse padrão de substituição de táxons ao longo da várzea é *Brotogeris sanctithomae* (Psittaciformes: Psittacidae), cuja subespécie *B. s. sanctithomae* ocorre exclusivamente na porção oeste da Amazônia e *B. s. takatsukasae* apenas no leste. Segundo a descrição de *B. s. takatsukasae*, sua diagnose consiste em uma mancha amarela presente na região pós-ocular, que está ausente na subespécie nominal (Figura 1). Apesar de já terem sido descritos como alopátricos, os dois morfotipos já foram avistados e fotografados juntos algumas vezes, próximo à região de provável contato das distribuições, mas não ficou clara a extensão geográfica desta sobreposição.

Apesar dessas diferenças fenotípicas e de suas distribuições supostamente alopátricas ou parapátricas, uma análise filogenética do gênero *Brotogeris* não encontrou monofilia recíproca entre os dois táxons (Ribas *et al.*, 2009). A ausência de covariação genética distinguindo táxons irmãos é geralmente explicada por tempo insuficiente para fixar diferenças neutras ou fluxo gênico atual entre as linhagens. Ou ainda, devido a uma taxonomia imperfeita, em que se reconhece como táxons diferentes indivíduos de uma mesma unidade evolutiva (Funk & Omland 2003).

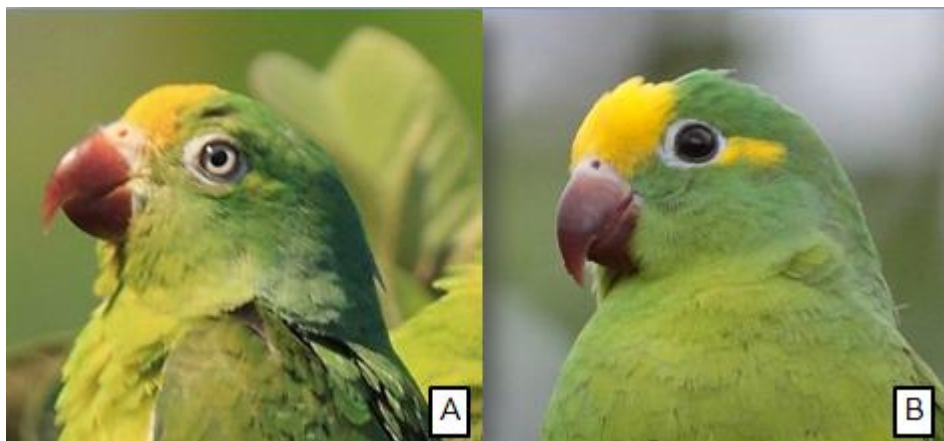


Figura 1: Fenótipo típico de cada subespécie: (1^A) *B. s. sanctithoame* sem mancha pós-ocular, presente na Amazônia Ocidental; (1^B) *B. s. takatsukasae* com mancha pós-ocular presente, da Amazônia Oriental. Fotos de Anselmo d’Affonseca.

Estudar a diversidade genética de populações que estão passando por processo de especiação ou divergência populacional pode ser particularmente difícil (McCormack *et al.*, 2012). Existe bastante controvérsia se especiação é adaptativa ou um epifenômeno da divergência (Coyne e Orr, 2004). Quando a especiação é adaptativa, a divergência genética durante a especiação envolve poucas regiões genômicas (Nosil *et al.*, 2007) e nas regiões sob seleção a divergência procede em velocidade acelerada em comparação com regiões seletivamente neutras (Wu, 2001). Assim, quando a especiação é adaptativa, as regiões genômicas sob seleção, ou fisicamente ligadas a elas, sofrem diferenciação genética antes de regiões neutras (Via, 2001; Wu, 2001; Vines *et al.*, 2003; Gavrillets & Vose 2005, Nosil *et al.*, 2009). Locus sob seleção divergente (i. e. seleção atuando de forma diferente entre as populações) e locus que causam isolamento reprodutivo se comportam de forma similar, sofrendo menos introgressão e apresentando estrutura mais forte (Nosil *et al.*, 2009). Locus que não sofrem seleção podem permanecer homogêneos, tanto por fluxo gênico quanto por retenção de polimorfismo ancestral e tempo insuficiente para acumulação de diferenças neutras (Via & West, 2008; Nosil *et al.*, 2009). Esse padrão, onde os níveis de diferenciação são variáveis, é chamado de “divergência genômica heterogênea” (Nosil *et al.*, 2009) e quando ele ocorre, apenas uma ampla amostragem do genoma consegue detectar sinais de divergência.

Com os avanços nos métodos de Sequenciamento de Nova Geração, tornou-se acessível a obtenção de grandes quantidades de sequências. Associando esses métodos ao uso de enzimas de restrição é possível a obtenção em larga escala de sequências curtas de fragmentos de DNA adjacentes aos sítios reconhecidos por estas enzimas (Baird *et al.*, 2008), numa metodologia que ficou conhecida como sequenciamento de DNA associado aos sítios de restrição (*RAD tags*). As *RAD tags* funcionam como uma representação reduzida do

genoma (Miller *et al.*, 2007), e tem sido amplamente utilizadas para a descoberta e genotipagem de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, na sigla em inglês).

Até recentemente, as técnicas de obtenção de *RAD tags* descritas não permitiam fracionar a quantidade do genoma a ser sequenciado. A dificuldade para tanto se dava em conseguir selecionar fragmentos gerados a partir das diferentes amostras pudessem ser comparados entre si (i. e. regiões homólogas). Na impossibilidade de selecionar a amostragem almejada do genoma, era necessário limitar o sequenciamento a poucos indivíduos. A técnica *ddRAD tags* (Peterson *et al.*, 2012) é especialmente interessante porque permite que a quantidade de genoma a ser sequenciada seja fracionada, através da seleção por tamanho dos fragmentos digeridos. Isso se deve à introdução de uma segunda enzima de restrição para fragmentar o genoma. Assim, quando o produto dessa dupla digestão é submetido à eletroforese, é possível selecionar uma faixa de tamanho ideal para o sequenciamento, que contém a quantidade de fragmentos desejada e com homologia entre eles. Com isso *ddRAD tags* tornou-se uma técnica adequada para estudos populacionais em que são necessários muitos indivíduos para amostrar variação intraespecífica e ainda gerar uma quantidade de locos suficientes para as análises de processos neutros e sob seleção (Peterson *et al.*, 2012).

Este estudo foi conduzido a fim de entender os processos evolutivos relacionados ao padrão de diferenciação de plumagem entre as duas subespécies de *B. sanctithomae*, através de uma amostragem extensiva na região ao longo da qual as duas se substituem e da utilização de marcadores SNPs a partir de *ddRAD tags*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Entender os processos evolutivos relacionados ao padrão de diferenciação de plumagem entre as duas subespécies de *B. sanctithomae*

2.2 Objetivos Específicos

- ▶ Caracterizar a distribuição geográfica da variação fenotípica e genotípica da espécie e determinar quantas linhagens estão presentes na área de estudo.
- ▶ Detectar regiões no genoma que diferem entre as duas subespécies e que podem estar associadas aos fenótipos detectados.
- ▶ Verificar a ocorrência de hibridização entre as subespécies e, em caso positivo, determinar sua extensão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento amostral

Foram realizadas coletas em seis localidades em um trecho da várzea com 500km de extensão ao longo dos rios Solimões e Amazonas no estado do Amazonas, desde Manacapuru, no rio Solimões, até Parintins, no rio Amazonas, totalizando 71 amostras coletadas. Aqui, chamaremos de “região de substituição” toda esta região que foi amostrada intensivamente (Figura 2). Durante as coletas, cada exemplar coletado foi georreferenciado com GPS, fotografado, e as cores de suas partes nuas (íris, tarso e bico) anotadas imediatamente. Os exemplares foram congelados e levados para a Coleção de Aves do INPA para taxidermia completa e tombamento. Para análise fenotípica, além das amostras obtidas nas coletas, também foram observados todos os espécimes de *Brotogeris sanctithomae* depositados previamente nas coleções ornitológicas do INPA (cinco) e do Museu Paraense Emílio Goeldi (29). Esses indivíduos também foram fotografados e as informações de cor de íris e localidade de coleta foram anotadas a partir de dados presentes na etiqueta.

Para as análises genéticas, obtivemos também nove amostras de tecido cedidas por coleções ornitológicas: INPA (quatro) e Museu Paraense Emílio Goeldi, (cinco), totalizando 80 amostras. Dessas nove amostras emprestadas, duas foram coletadas dentro da mesma região amostrada neste estudo(Manaus) e outras sete eram provenientes de regiões distantes do contato das duas subespécies: no rio Juruá (duas) e no rio Acre (uma), ambas no estado do Acre, extremo oeste da Amazônia brasileira, a 1958 e 1620 km de Manacapuru, respectivamente; em Coari (duas) no estado do Amazonas, a 338 km oeste da nossa região de coleta; e da Ilha do Marajó (duas), na foz do rio Amazonas, 928 km a leste de Parintins.

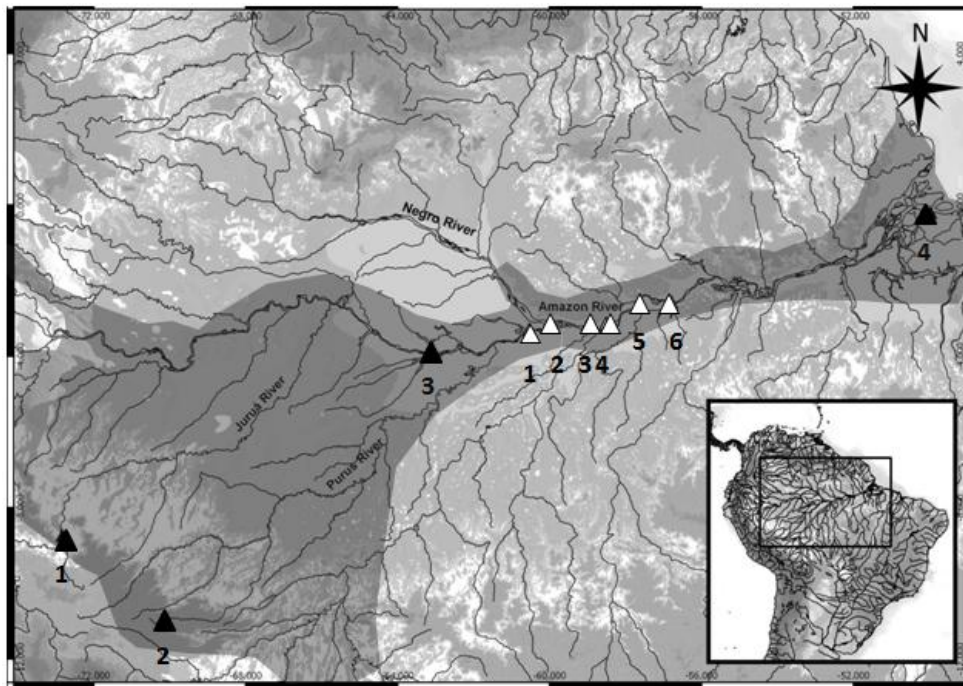


Figura 2: Pontos de coletas e números de amostras (entre parênteses) dentro da distribuição da *B. sanctithomae* (área sombreada) segundo a IUCN. Δ Representa as localidades onde foram realizadas coleta para este estudo; 1: Manacapuru (21); 2: Manaus (6); 3: Novo Remanso (10); 4: Itacoatiara (20); 5: Urucará (4); 6: Parintins (10). \blacktriangle Localidades das amostras de empréstimo: 1: Rio Juruá (2), no Acre; 2: Rio Iaco (1), no Acre; 3: Coari (2), no Amazonas; 4: Ilha do Marajó (2), no Pará.

Por restrições metodológicas, em função da capacidade do equipamento para uma corrida e visando alcançar uma maior cobertura do genoma e maior número de locos, foram selecionados 60 indivíduos para o sequenciamento. A seleção das amostras visou contemplar todos os fenótipos encontrados. Para alcançar melhor resolução estatística nas comparações entre populações geográficas, foram excluídas aquelas populações com menores números de indivíduos (Manaus, seis, e Urucará, quatro). No entanto, foram mantidas sete amostras provenientes de localidades distantes do provável contato entre os dois táxons, que configuram, hipoteticamente, genótipos sem mistura.

3.2. Obtenção de *ddRAD tags*

O DNA foi extraído utilizando o protocolo Fenol-Clorofórmio, e diluído a concentração de 200ng. Para verificar a concentração de DNA das amostras foi utilizado o equipamento NanoDrop 2000 *Spectrophotometer* da Thermo Scientific. As *ddRAD tags* foram geradas seguindo o protocolo de Peterson *et al.* (2012), que utiliza duas enzimas de restrição para fragmentar o genoma. As enzimas utilizadas na digestão do genoma foram a *SdaI* e a *Csp6I* da Fermentas (Thermo Scientific), cujos sítios de cortes possuem oito e quatro pares de bases, respectivamente.

Os adaptadores P1 e A foram ligados às extremidades dos fragmentos de DNA (Figura 3) utilizando a enzima T4 DNA ligase da Fermentas (Thermo Scientific), e cinco unidades de

ATP da Fermentas (Thermo Scientific) foram adicionadas para cada reação. Cada adaptador possui sítios de anelamento de *primers* para amplificação, e o adaptador A possui uma sequência de dez pares de bases chamada de *barcode*, associado a cada indivíduo, que foi utilizada para identificar a procedência de cada fragmento sequenciado. Assim, para cada indivíduo foi atribuído um adaptador A diferente, em que as sequências *barcode* se diferenciavam das demais em pelo menos dois pares de bases.

O adaptador A tem formato “Y”, em que uma das fitas possui o sítio de anelamento para o *primer* da PCR na extremidade 5', mas a extremidade 3' possui uma sequência nucleotídica diferente e que não complementa a primeira fita – por isso o formato Y (Figura 3). Este adaptador tem este formato para impedir a amplificação de fragmentos em que ele está presente nas duas extremidades.

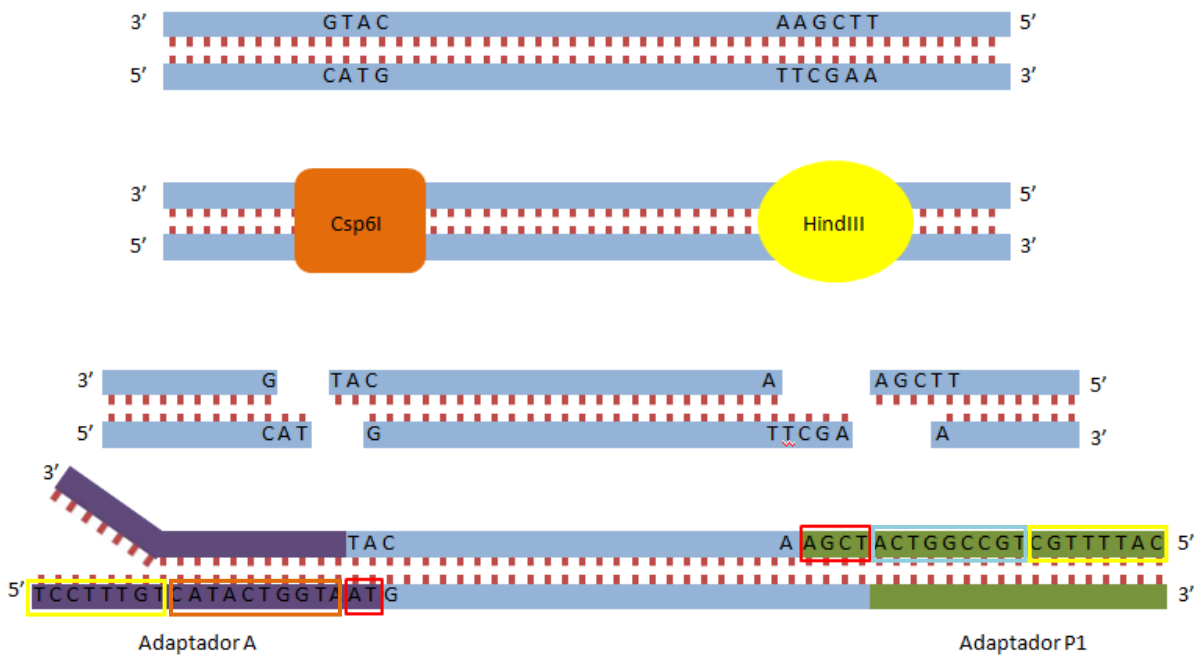


Figura 3: O DNA é fragmentado pelas enzimas de restrição *SdaI* e *Csp6I* e os adaptadores P1 e A são ligados aos fragmentos. Nos adaptadores, está em destaque a sequência do sítio de reconhecimento das enzimas (vermelho) e as sequências dos sítios de anelamento para o *primer* da PCR (amarelo). O adaptador A também contém a sequência *barcode* (laranja) e o adaptador P1 o sítio de anelamento para o *primer* do sequenciamento (azul).

Como a DNA Polimerase sintetiza uma nova fita complementar a partir da extremidade 3' da fita líder e a extremidade 3' do adaptador A não possui sítio de anelamento para o *primer*, aqueles fragmentos que possuem adaptador A nas duas extremidades não serão amplificados na PCR. Devido a esse formato do adaptador A, somente os fragmentos que possuem o adaptador P1 em pelo menos uma das extremidades serão amplificados. Já os fragmentos que possuem um adaptador P1 em uma extremidade e um adaptador A na outra, durante o primeiro ciclo da PCR somente serão amplificados a partir do sítio de anelamento

do adaptador P1 até a extremidade 5' do adaptador A. Os fragmentos gerados nesses ciclos possuem sítio de anelamento para PCR nas duas extremidades, portanto, estes fragmentos serão amplificados normalmente nos ciclos posteriores. Como o adaptador P1 se liga às extremidades de corte da enzima menos frequente (*SdaI*), fragmentos com este adaptador em ambas as extremidades serão extremamente raros e potencialmente muito mais longos que a nossa faixa de tamanho de interesse para o sequenciamento. Os fragmentos amplificados na PCR serão em grande maioria aqueles que possuem um adaptador de cada tipo em cada extremidade (Figura 4).

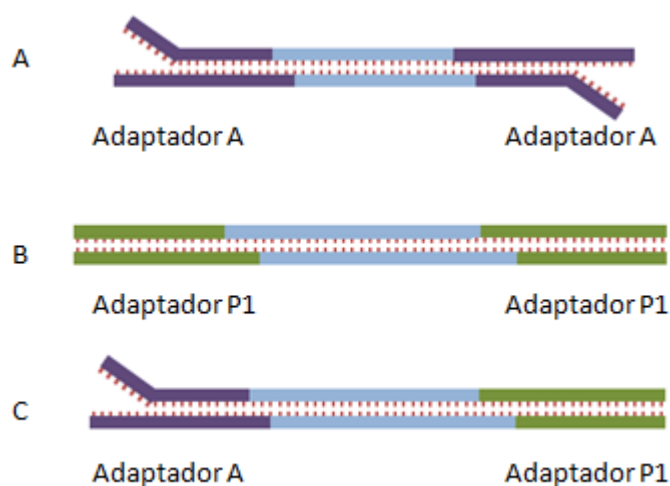


Figura 4: Os três tipos de fragmentos obtidos depois da ligação dos adaptadores. (A) Os fragmentos com o adaptador A nas duas extremidades não serão amplificados devido a ausência de sítio de anelamento para os *primers* nas extremidades 5'. (B) Os fragmentos com adaptador P1 nas duas extremidades serão raros. (C) Serão amplificados com maior frequência os fragmentos que possuem os dois tipos de adaptadores (4C).

Como o produto da digestão tem uma concentração muito baixa para ser visualizada em transiluminador UV, cada reação de digestão foi amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a verificação de uma correta digestão e presença de adaptadores ligados. O produto da PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose e visualizado em transiluminador UV. Uma vez que a reação de digestão tenha funcionado para todas as amostras, foi feito um *pool* de digestões, reunindo 10 μ L de cada produto de digestão por indivíduo, que foi submetido à purificação com kit Qiagen para eliminar quaisquer resíduos, proteínas e cofatores não incorporados das reações. As amostras purificadas foram diluídas para um volume final de 50 μ L.

Através da PCR de verificação, foi observada a presença de uma banda muito mais forte que a digestão (Figura 5). Presumimos que esta banda seria resultado da presença dos sítios de reconhecimento das enzimas no DNA mitocondrial, muito mais frequentes na extração de DNA genômico que o DNA nuclear e que teria gerado mais fragmentos na

amplificação.

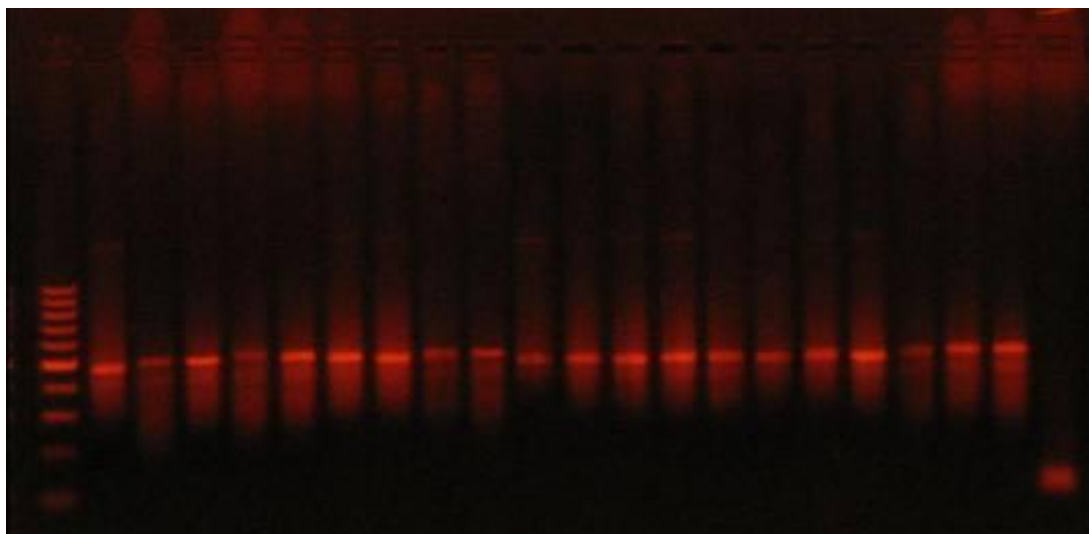


Figura 5: Visualização em gel de agarose do produto de PCR das digestões, onde é possível notar a presença de uma banda mais forte um pouco abaixo de 500pb.

Para selecionar os fragmentos a serem submetidos ao sequenciamento, o produto de digestão purificado foi submetido a uma corrida eletroforética no gel de agarose E-Gel® SizeSelect™, 2% da Invitrogen™ (Life Technologies). Foram selecionados para o sequenciamento os fragmentos na faixa entre 300 e 400 pares de base. Esta faixa de interesse levou em consideração o tamanho de sequencia que o sequenciador é capaz de gerar e, também, visou excluir fragmentos da banda de DNA mitocondrial. O produto de digestão selecionado foi amplificado via PCR utilizando como enzima de síntese a DNA Polimerase KlenTaq, que possui atividade corretiva no sentido 3' para 5', aumentando a fidelidade dos fragmentos amplificados.

Em uma PCR de muitos ciclos, fragmentos de DNA que são amplificados desde o primeiro ciclo de síntese podem ter, ao final da reação, maior número de cópias que aqueles que começaram a ser amplificados apenas nos ciclos posteriores. Para minimizar o desvio padrão entre fragmentos representativos de cada indivíduo, foram realizadas quatro réplicas da PCR, onde foram submetidos a apenas 16 ciclos de síntese de DNA. Após a reação, os conteúdos dos quatro tubos foram transferidos para um único tubo, quantificados no fluorômetro Qubit® 2.0 da Invitrogen, e diluído até a concentração indicada pelo fabricante para o sequenciamento. Prosseguimos para as etapas do sequenciamento, no sequenciador Ion Personal Genome Machine® (PGM™), da Life technologies™, seguindo as instruções do fabricante.

3.3. Obtenção de SNPs

Uma vez sequenciados os fragmentos e utilizando o plugin FastqCreator do software Torrent Suite™, foram removidas as sequências nucleotídicas do adaptador P1 de cada leitura. Do adaptador A, apenas o barcode contendo 10 pares de bases foi mantido junto à sequência nucleotídica do fragmento.

As leituras e os *scores* de qualidade de sequenciamento foram transferidos para um arquivo em formato FastaQ para serem analisadas no *pipeline* Stacks (Catchen *et al.*, 2011). Este *pipeline* é escrito em linguagem de programação C++, possui uma interface implementada em PHP que interage com um banco de dados criado no MySQL, onde os dados são depositados. Os componentes de Stacks utilizados nas análises deste trabalho foram *Process_radtags*; *Ustacks*; *Cstacks*; *Stacks* e o *Population*.

O primeiro componente foi utilizado para verificar a qualidade das leituras e se os *barcodes* estavam intactos nas leituras “cruas”. As leituras menores que 250pb, com *barcode* não identificado (com erro de sequenciamento em alguma das bases) e com *score* de qualidade abaixo de 90% de confiança (utilizando o Phred Score de 10 – ver Ewing and Green 1998) foram descartadas.

Como *Stacks* exige que as leituras tenham o mesmo comprimento para que sejam processadas pelo *pipeline*, todas as leituras foram cortadas em 250pb contados a partir do sítio de restrição da enzima *Csp6I* e o restante foi descartado.

A procedência de cada leitura foi identificada através da sequência *barcode* e estas foram separadas em arquivos individuais, para então as sequências dos *barcodes* serem retiradas da leitura.

Os arquivos individuais gerados pelo *Process_radtags* foram inseridos no *Ustacks*, um componente do *pipeline* que alinha as leituras sem precisar de um genoma de referência, e identifica os polimorfismos. Neste componente, as leituras idênticas foram agrupadas em *stacks* (pilhas, em tradução livre). As leituras dentro de um *stack* são chamadas de primárias, e as leituras que não possuíram identidade perfeita com outras são chamadas de secundárias. Para um *stack* ser formado, foi exigida uma cobertura mínima (número mínimo de leituras) de quatro vezes. O *pipeline* calculou a cobertura média dos *stacks* e excluiu aqueles que possuía cobertura maior que duas vezes o desvio padrão, por se tratarem potencialmente de alelos provenientes de elementos repetitivos (i. e. alelos de locos diferentes agrupados em um único loco) (Catchen *et al.*, 2011).

Para um organismo diplóide, a expectativa para um loco homozigoto é que este

contenha apenas um alelo e um loco heterozigoto contenha dois alelos (Catchen *et al.*, 2013). Para *stacks* diferentes serem associados a um mesmo loco, foi permitida uma distância máxima de quatro pares de bases e foi exigido que cada loco possuísse no máximo dois *stacks*. Para resolver episódios de elementos repetitivos (em que alelos de diferentes locos são associados a um único loco) ou de *stacks* formados a partir de leituras com erros de sequenciamento, este *pipeline* possui um algoritmo heurístico que é ativado quando mais de dois *stacks* são associados a um mesmo loco. Este algoritmo é baseado em árvores de expansão mínima em que cada vértice se refere a um *stack* e as arestas que conectam os vértices recebem um peso de acordo com a distância nucleotídica entre os *stacks*. A hipótese que melhor explica quais *stacks* pertencem a um mesmo loco é a que associa alelos com menor distância genética e separa os mais distantes (ver material suplementar em Catchen *et al.*, 2013). Os locos para os quais o algoritmo não conseguiu resolver os “alelos verdadeiros” foram excluídos das demais análises.

Para identificar se as diferenças encontradas entre dois *stacks* configuram um SNP verdadeiro ou apenas um erro de sequenciamento, o *pipeline* utiliza um modelo estatístico de máxima probabilidade, que estima a probabilidade de erro de sequenciamento \mathcal{E} em cada posição nucleotídica e calcula a probabilidade de polimorfismo em cada posição para cada genótipo possível (homozigoto para o nucleotídeo mais frequente e heterozigoto para os dois nucleotídeos mais frequentes). As duas hipóteses são testadas utilizando um teste de Qui-quadrado ($p < 0.05$) e com grau de liberdade igual a 1 (Hohenlohe 2010). No caso de a probabilidade de erro \mathcal{E} ter excedido os limites mínimos (0%) e máximo (1%), a informação da qualidade do sequenciamento naquela posição nucleotídica é utilizada para validar ou não o polimorfismo.

Depois de determinados todos os genótipos de cada indivíduo, o componente *Cstacks* cria um catálogo de locos para cada indivíduo, com uma sequência consenso para cada loco. Através dessa sequência consenso o componente *Sstacks* cruza os catálogos individuais e gera um único catálogo, de todos os locos de todos os indivíduos. Este catálogo, depositado em um banco de dados do MySQL, pode ser acessado em uma interface gráfica, na qual as informações de genótipos, cobertura dos alelos, sequência consenso e compartilhamentos entre indivíduos podem ser verificadas a partir de cada loco ou de cada indivíduo, em uma matriz bidimensional.

Através do componente *Population*, os genótipos dos locos presentes em no mínimo 50% dos indivíduos foram extraídos do catálogo e transferidos para um arquivo de texto, em formato Genepop, para execução das análises seguintes. Para evitar a presença de alelos raros,

foram excluídos deste arquivo os locos cuja frequência de um dos alelos era menor que 5%.

3.4. Análises

Foi criado um banco de dados dos 60 indivíduos submetidos ao sequenciamento, com as características fenotípicas observadas durante a análise dos espécimes (padrão de mancha pós-ocular e cor de íris - mais detalhes em Resultados). As amostras foram divididas em grupos fenotípicos de interesse. Além do padrão da mancha pós-ocular (três variações) e cor da íris (três), os indivíduos também foram agrupados de acordo com a combinação de ambas as duas características fenotípicas (seis). Além dos grupos fenotípicos, as amostras também foram agrupadas pelas localidades onde foram coletadas (sete) ou margens opostas do sistema fluvial Solimões/Amazonas (duas). Essas atribuições foram utilizadas para mapear os indivíduos em populações *a priori*, para as análises a seguir.

Utilizando cada um dos agrupamentos fenotípicos (mancha, íris e os dois combinados) foi calculada a diferenciação genética por loco via F_{ST} de Wright, e a associação entre fenótipo e genótipo via teste exato de Fisher. Locos com valores de média de F_{ST} com a probabilidade menores ou iguais a 0,001, assim como associações com probabilidade menor ou igual a 0,001 foram considerados significativamente diferentes. Essas análises foram implementadas através da linguagem estatística R, utilizando os pacotes padrão e específicos de Adegenet, Ade4 e Pegas. Como utilizamos SNPs obtidos a partir da utilização de enzimas de restrição, cuja distribuição dos sítios de reconhecimento é aleatória no genoma, nós não conhecemos a função e a localização dos locos amostrados no genoma. É provável que os SNPs que apresentam diferenciação significativa não estejam presentes nos genes que causam a diferenciação, mas configurem regiões fisicamente ligadas ou em desequilíbrio de ligação com estas (Stinchcombe & Hoekstra, 2007).

Para identificar agrupamentos biológicos dentro da espécie estudada, foi utilizado o *software* STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), que emprega as frequências alélicas dos locos para identificar estrutura genética entre grupos de indivíduos que caracterizam uma população. Foram conduzidas 10 réplicas assumindo número de populações (K) igual a um, para verificar a existência de uma única população panmítica para os locos analisados. Foram conduzidas análises assumindo $K=2$ e $K=3$ com 10 réplicas cada. A probabilidade posterior de cada K foi utilizada para verificar qual a hipótese que melhor explicaria o número de agrupamentos biológicos identificados. Uma vez identificado o melhor K , foi testada qual a distribuição dos indivíduos explicaria mais adequadamente a estrutura genética observada: fenotípica ou geográfica.

Foram realizadas análises de distância genética par a par entre populações. Para essas análises, os indivíduos foram primeiramente divididos em populações de acordo com seus fenótipos, e depois separados de acordo com as localidades de coleta, para verificar qual das duas hipóteses explicaria as distâncias genéticas. Para as comparações de distância genética entre as localidades, foram excluídas as localidades de fora da região de coleta (Acre, Coari e Ilha do Marajó), por estarem muito distantes geograficamente e apresentarem baixo número amostral. Foi realizado teste de Mantel para verificar se existe correlação entre a distância genética e a distância geográfica. O coeficiente de variação genética foi medido dentro e entre populações fenotípicas diferentes, e foi utilizado para entender a quantidade de variação que é compartilhada entre as populações. Essas análises também foram implementadas através da linguagem estatística R, utilizando os pacotes padrão e específicos de Ade4, ADEGENET e Pegas.

Uma vez identificados os grupos biológicos no STRUCTURE, os indivíduos geneticamente puros (com uma probabilidade maior que 90% de que seu genoma pertença a um único agrupamento biológico) e com fenótipos típicos de cada uma das subespécies foram submetidos a uma análise no *software* Bayescan (Foll e Gaggiotti *et al.*, 2008). Este *software* calcula o valor de F_{ST} de cada loco e, a partir das diferenças nas frequências alélicas entre as populações, realiza uma análise bayesiana para identificar aqueles locos potencialmente sob seleção.

4. RESULTADOS

4.1. Variação Fenotípica

Analisando o fenótipo de espécimes depositados nas coleções ornitológicas do INPA (76, sendo 71 coletados neste trabalho) e do MPEG (29), foram encontrados indivíduos dentro da distribuição de *B. s. sanctithomae* com manchas pós-oculares pequenas e assimétricas, tipicamente em apenas um lado da cabeça (Figura 6). A mancha pós-ocular foi chamada de “ausente” quando o indivíduo não apresentava nenhuma pena amarela na região pós-ocular, em nenhum dos lados da face. O caráter “presente” foi atribuído para aqueles indivíduos que possuíam a mancha presente em ambos os lados da face, em formato simétrico e evidente. Os indivíduos que apresentaram qualquer desvio do fenótipo considerado “puro” das duas subespécies, como mancha pós-ocular de tamanho inferior ao observado em outros indivíduos, presente em apenas um lado da face ou formato irregular ou assimétrico, foram classificados como “intermediário”.

Além da do padrão de mancha, notamos que existe uma variação na cor da íris que apresenta congruência com a distribuição geográfica das duas subespécies: branco-amarelada para *B. s. sanctithomae* e marrom para *B. s. takatsukasae* (Figura 6). No entanto, assim como para a mancha pós-ocular, foram encontradas variações do esperado fenótipo “puro” de cada táxon para a cor de íris também. Indivíduos que apresentaram íris em tons acinzentados ou numa tonalidade entre o bege e o marrom-acinzentado foram chamados de “intermediários”. Aqui, por convenção, chamaremos a íris branco-amarelada do *B. s. sanctithomae* simplesmente de “clara”.

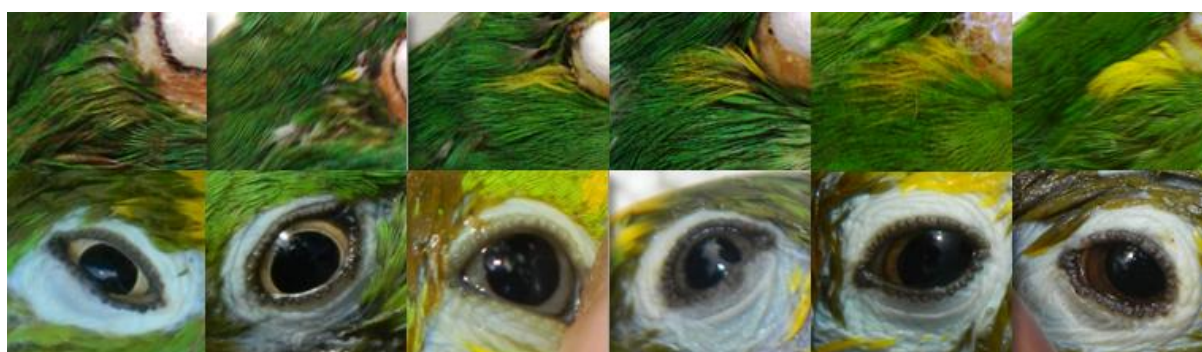


Figura 6: Variações fenotípicas encontradas em padrão de mancha pós-ocular (primeira linha), variando desde sem mancha (esquerda) e manchas pequenas até mancha amarela grande (direita). E em cor de íris (segunda linha), variando de branco amarelado (esquerda) e tons de bege e cinza até marrom (direita).

4.1.1. Distribuição geográfica da variação fenotípica

Dos 71 espécimes amostrados dentro da região de coleta, foram observados 23 indivíduos com o fenótipo típico da subespécie *B. s. sanctithomae* (mancha pós-ocular

ausente e íris clara) e 12 com o de *B. s. takatsukasae* (mancha pós-ocular presente e íris marrom). Os 36 demais espécimes coletados possuíam estados intermediários para os dois caracteres ou uma combinação de estados intermediários para um caracter e puro para outro. Foram encontradas sete das nove combinações possíveis de estados de caracteres (Figura 7). As duas combinações não amostradas foram as que envolvem uma combinação de um estado puro de cada táxon: íris clara com mancha presente e íris marrom com mancha ausente. Apenas um indivíduo apresentou a combinação de íris intermediária com mancha ausente. Todas as demais combinações foram observadas em pelo menos seis espécimes.

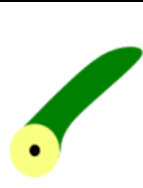

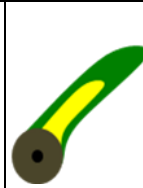

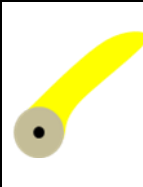
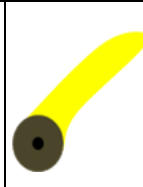


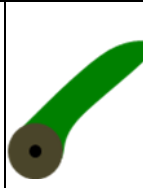
| | | | | | | | | |
|------------|---|--|------------|---|--|------------|---|---|
| Fenótipo 1 |  | Manacapuru (16); Manaus (4); Novo Remanso (4); Acre (3); Coari (1). Total: 28. | Fenótipo 3 |  | Novo Remanso (5); Itacoatiara (9); Urucará (1); Total: 15. | Fenótipo 5 |  | Itacoatiara (3); Urucará (1); Parintins (2). Total: 6. |
| Fenótipo 2 |  | Manacapuru (5); Manaus (2); Novo Remanso (1); Coari (1). Total 12. | Fenótipo 4 |  | Itacoatiara (6). Total: 6. | Fenótipo 6 |  | Itacoatiara (2); Urucará (2); Parintins (8); Ilha do Marajó (2). Total: 12. |
| |  | Manacapuru (1). | |  | Nunca encontrado | |  | Nunca encontrado |

Figura 7: Combinações fenotípicas amostradas e localidades em que foram encontradas. Os desenhos ilustram as duas características fenotípicas. A mancha pós-ocular ausente é mostrada, através do desenho verde atrás do olho, como no fenótipo 1. A variação intermediária da mancha aparece nos fenótipos 2, 3 e 5, como uma pequena mancha amarela no meio da faixa verde. Já a mancha presente é ilustrada como uma faixa completamente amarela, como nos fenótipos 4 e 6. A íris clara, presente nos fenótipos 1 e 2, aparece pintada de 'branco-amarelado'. A íris intermediária é ilustrada em cinza, nos fenótipos 3 e 4. E a íris marrom é apresentada nos fenótipos 5 e 6. Os três desenhos da última linha mostram as combinações fenotípicas que foram amostradas apenas uma vez ou nenhuma. Ao lado direito de cada desenho estão as localidades em que aquela combinação fenotípica foi amostrada, com número de indivíduos entre parênteses. Esses esquemas serão utilizados em todo o trabalho para ilustrar as combinações fenotípicas amostradas.

Das cinco amostras de *B. s. sanctithomae* de fora da região de substituição, que foram submetidas ao sequenciamento, quatro apresentaram o fenótipo típico da subespécie. A exceção foi uma amostra de Coari, que apresentou vestígios de penas amarelas em um dos lados da face. Os dois espécimes de *B. s. takatsukasae*, da Ilha de Marajó, apresentam o fenótipo típico dessa subespécie para as duas características.

Em Manacapuru e Manaus, no rio Solimões, foi observada a prevalência do fenótipo típico da subespécie *B. s. sanctithomae* (16 de 21 indivíduos coletados em Manacapuru e quatro de seis em Manaus). Os demais espécimes destas localidades apresentam íris clara, mas com vestígios de penas amarelas na região pós-ocular, sempre de forma irregular ou

pequena e por vezes assimétrica. Este padrão irregular de mancha foi também observado em indivíduos depositados nas coleções zoológicas estudadas, provenientes de localidades a oeste de Manacapuru: INPA 050 coletado a 41km nordeste de Coari, 338 km oeste de Manacapuru; MZUSP Santo Antônio do Içá, 1264km a leste de Manacapuru, comunicação pessoal de Ribas (2013); MPEG Rio Javari, Estirão do Equador, 1749km leste de Manacapuru).

Procedendo de oeste a leste, os primeiros indivíduos com íris intermediária foram amostrados em Novo Remanso (Figura 8). Contudo, para o padrão de mancha foram encontrados apenas indivíduos com mancha ausente ou intermediária nesta localidade. O padrão de mancha pós-ocular muda em Itacoatiara, onde todos os indivíduos passam a ter algum sinal de presença da mancha, e para alguns espécimes (oito, de 20), a mancha se torna bem evidente e simétrica. Nessa localidade também foram amostrados os primeiros indivíduos com íris marrom, e a íris clara não foi amostrada. A presença de todas essas características faz de Itacoatiara a localidade onde o maior número de combinações fenotípicas (quatro) foi amostrado (ver Figura 8).

Em Urucará foram amostrados as mesmas características que Itacoatiara, mas o número de combinações foi menor (três) e o fenótipo puro de *B. s. takatsukasae* já predomina na amostragem (50%). Em Parintins, localidade no extremo leste da região de coleta, oito dos dez indivíduos amostrados apresentaram fenótipo típico de *B. s. takatsukasae*. Outros dois indivíduos ainda apresentaram um padrão de mancha irregular.

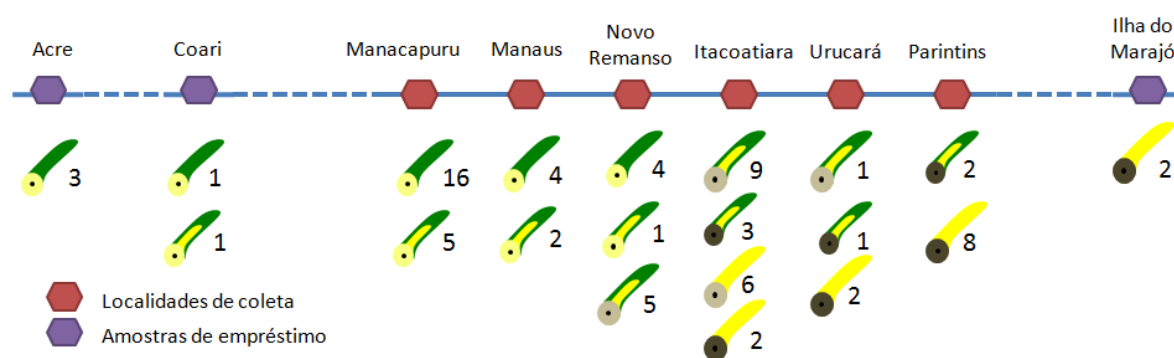


Figura 8: Combinações fenotípicas amostradas e localidades em que foram encontradas.

As distribuições geográficas das duas características fenotípicas puras se limitam nas mesmas localidades: a mancha ausente e a íris clara do *B. s. sanctithomae*, da Amazônia Ocidental, foi encontrada desde Manacapuru até Novo Remanso, e a mancha presente e a íris marrom do *B. s. takatsukasae* foi amostrada a partir de Itacoatiara até Parintins (Figura 8). No entanto, a variação fenotípica chamada de “intermediária” para mancha pós-ocular tem distribuição geográfica distinta da variação intermediária de cor de íris. Enquanto que a mancha pós-ocular intermediária foi amostrada em todas as localidades dentro da região de

coletas (e inclusive fora dela), a íris intermediária esteve restrita às localidades nos limites dos fenótipos puros (Novo Remanso e Itacoatiara) ou vizinhas a ela (Urucará).

Nas duas localidades em que foram realizadas coletas extensivas nas duas margens do rio, Manacapuru e Itacoatiara, não foram detectadas diferenças nas distribuições dos fenótipos entre as margens. Em Manacapuru, as duas combinações de fenótipos (mancha pós-ocular ausente com íris clara; mancha pós-ocular irregular com íris clara) foram encontradas em ambas as margens. Em Itacoatiara, houve maior número de combinações de características fenotípicas amostradas (quatro). Entre elas, a combinação de íris marrom com mancha intermediária só foi amostrada em dois indivíduos na margem norte do rio. No entanto, esta foi uma das combinações registradas com menor frequência, tendo sido coletada apenas seis vezes em toda a região de coleta. Cada uma das características fenotípicas foi amostrada em ambas as margens.

4.1.2. Associação de fenótipo a sexo e idade

Todas as características observadas de cor de íris (clara; intermediária; marrom) e padrão de mancha pós-ocular (ausente; intermediária; presente) foram observadas em machos e fêmeas, de forma que estas características não podem ser associadas claramente a sexo. Para idade, foi observada uma grande incidência de jovens com íris intermediária na localidade de Itacoatiara (nove), onde o maior número de jovens (12) foi coletado. No entanto, foi observado que esta cor também ocorre em adultos (três) de ambos os sexos, e outros indivíduos jovens possuíam íris clara (um) ou marrom (um). Portanto, o grande número de jovens em Itacoatiara, provavelmente devido à época da coleta, se confunde com a prevalência de íris de cor intermediária, que por sua vez não parece estar relacionada conclusivamente com a idade dos indivíduos.

4.2. Variação Genética

O sequenciamento gerou 4.182.466 de leituras, que variaram de oito a mais de 400 pares de bases de comprimento. Para cada indivíduo submetido ao sequenciamento, foram geradas entre 40.000 e 80.000 leituras. Dois indivíduos tiveram eficiência do sequenciamento muito abaixo dos demais (RCC043 e RCC012) e por isso foram excluídos das análises, permanecendo 58 exemplares no estudo molecular.

Para processar os dados no *Stacks* (Catchen *et al.*, 2013) todas as leituras abaixo de 250pb foram excluídas. Essas leituras se tratavam de fragmentos fora da faixa de interesse e que não deveriam ter sido submetidos ao sequenciamento. As leituras com comprimento igual ou acima de 250 pb foram submetidas às análises para criar os catálogos de locos e detectar

SNPs.

O catálogo gerado por *Stacks* contou com um total de 11.484 locos, sendo 2.090 locos polimórficos (com um ou mais SNPs). No entanto, observamos que muitos desses locos foram sequenciados para um número muito baixo de indivíduos em comum. Para as análises a seguir, foi selecionado um *subset* com 364 SNPs, que foram comuns a pelo menos 50% dos indivíduos e cuja frequência dos alelos eram maiores que 5%.

4.2.1. Associação de locos ao fenótipo

As análises de diferenciação genética por loco mostraram que, em todas as comparações fenotípicas, a maior parte do genoma apresentava pouca diferenciação, com poucos locos diferenciados. A frequência dos valores de F_{ST} dos locos apresentou uma distribuição normal, com alguns poucos locos apresentando diferenciação discrepante dos demais (Figuras 9, 10 e 11).

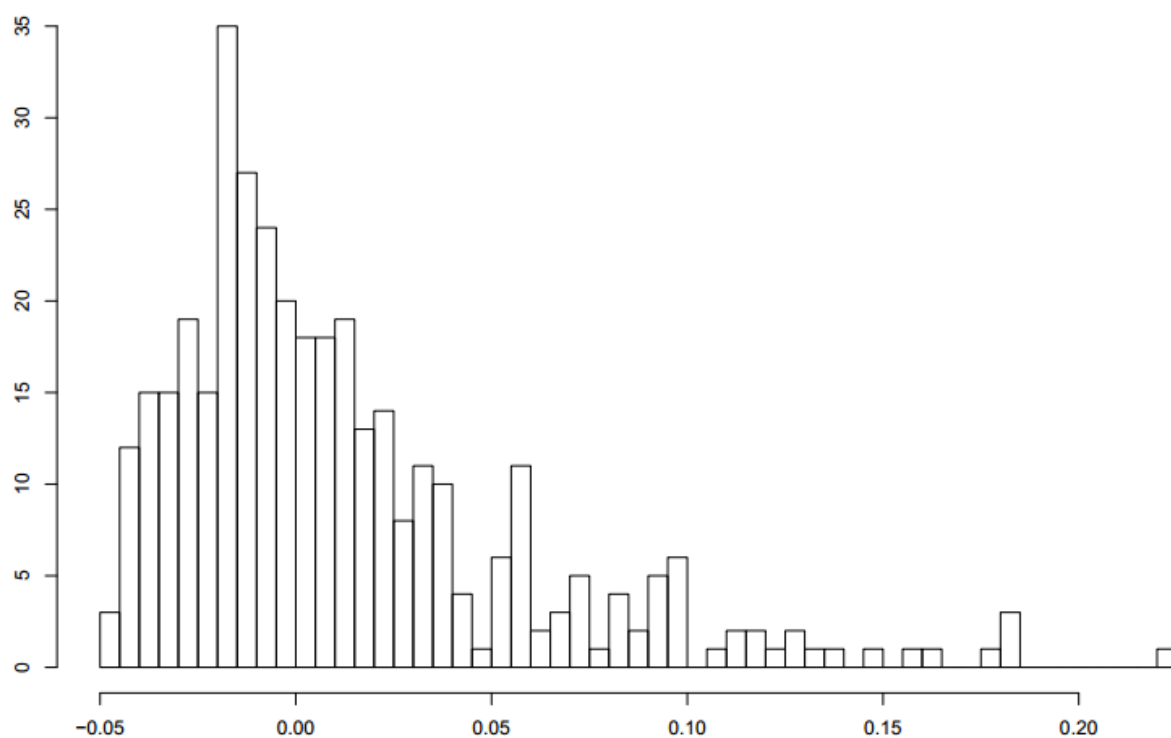


Figura 9: Distribuição de frequências das médias dos valores de F_{ST} por loco, na comparação de populações com padrões de mancha diferentes. No eixo X estão os valores de F_{ST} e no eixo Y o número de locos.

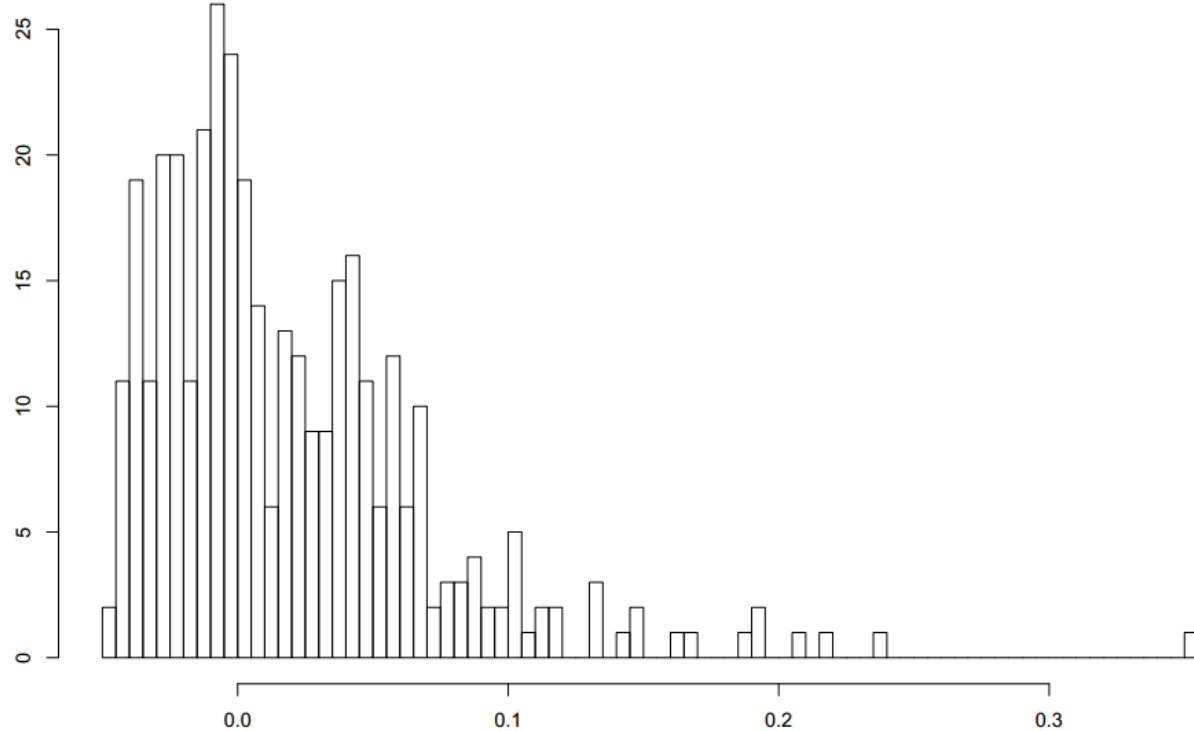


Figura 10: Distribuição de frequências das médias dos valores de F_{ST} por loco, na comparação de populações com cores de íris diferentes. No eixo X estão os valores de F_{ST} e no eixo Y o número de locos.

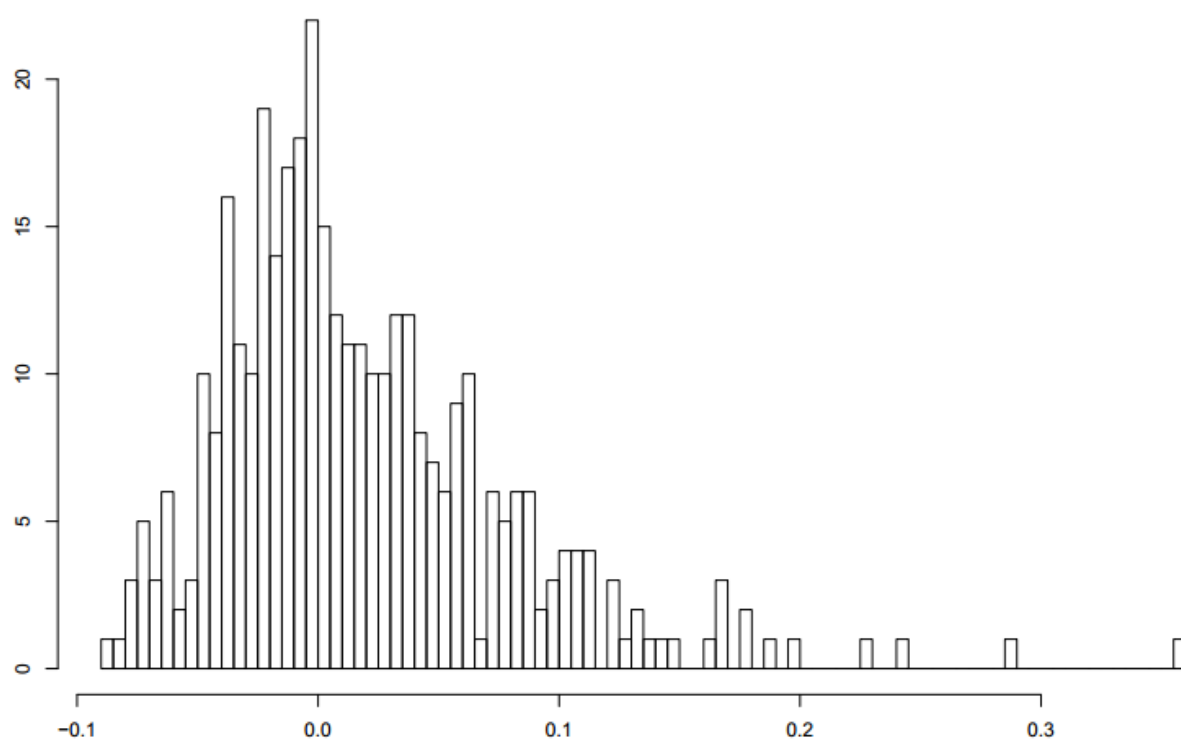


Figura 11: Distribuição de frequências das médias dos valores de F_{ST} por loco, na comparação de populações com diferentes combinações das duas características. No eixo X estão os valores de F_{ST} e no eixo Y o número de

locos.

No número de locos com diferenciação significativa, para o F_{ST} de Wright, as comparações de íris e mancha apresentaram o mesmo número de locos (sete), enquanto que a comparação com as duas características fenotípicas apresentou apenas quatro locos com diferenciação significativa. Os valores de diferenciação nos locos das comparações de íris são, em geral, mais altos que os das comparações de mancha (Tabela 1).

Tabela 1: Locos que apresentaram significância maior que 0,001 para o índice de diferenciação F_{ST} de Wright. As comparações foram realizadas entre os agrupamentos *a priori* de cor de íris, mancha e ambas as características fenotípicas, incluindo todos os caracteres amostrados.

| Íris | | Mancha | | Ambos | |
|----------|-------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| Loco | Valor de F_{ST} | Loco | Valor de F_{ST} | Loco | Valor de F_{ST} |
| 226_90 | 0,205 | 226_90 | 0,164 | 226_90 | 0,286 |
| 309_81 | 0,217 | 309_81 | 0,182 | 309_81 | 0,337 |
| 924_176 | 0,350 | 888_118 | 0,181 | 1008_158 | 0,242 |
| 1008_158 | 0,192 | 924_176 | 0,177 | 1582_247 | 0,225 |
| 1009_209 | 0,194 | 1008_158 | 0,222 | | |
| 1157_41 | 0,237 | 1582_247 | 0,183 | | |
| 1868_124 | 0,186 | 3632_49 | 0,156 | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Número total de locos com diferenciação significativa: | 7 | 7 | 4 |
|---|---|---|---|

As comparações do teste exato de Fisher entre as populações de cores de íris diferentes apresentaram quatro locos com valores significantes, enquanto que as comparações entre as populações com padrão de mancha diferente e entre as populações de combinações fenotípicas apresentaram dois e um, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Locos que apresentaram significância maior que 0,001 no teste exato de Fisher de diferenciação. As comparações foram realizadas entre os agrupamentos *a priori* de cor de íris, mancha e ambas as características fenotípicas, incluindo todos os caracteres amostrados.

| Íris | | Mancha | | Ambos | |
|----------------------------------|------------|----------|------------|----------|------------|
| Loco | Valor de P | Loco | Valor de P | Loco | Valor de P |
| 226_90 | 0,00034 | 1008_158 | 0,00041 | 1008_158 | 0,0005 |
| 1010_199 | 0,00013 | 2177_216 | 0,00037 | | |
| 1010_208 | 0,00022 | | | | |
| 1157_41 | 0,00045 | | | | |
| Número total de locos com | | 4 | | 2 | 1 |

diferenciação
significativa:

4.2.2. Análises de estrutura populacional

O número de grupos biológicos com maior probabilidade de ocorrência entre as amostras sequenciadas é dois ($\ln \Pr (X|K=2) = -10700$). A probabilidade posterior de $K=1$ foi mais baixa ($\ln \Pr (X|K=1) = -10900$) rejeitando a hipótese de panmixia entre todos os indivíduos amostrados. A probabilidade posterior de existir três grupos biológicos entre as amostras também foi mais baixa do que a probabilidade de existência de dois grupos ($\ln \Pr (X|K=3) = -11000$, Figura 12).

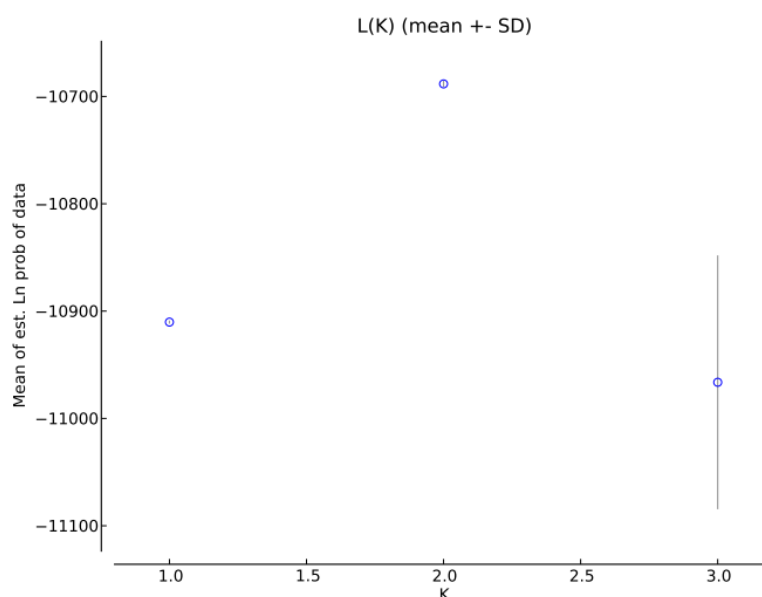


Figura 12: Gráfico de probabilidades posteriores de número de grupos biológicos dentre as amostras de *Brotogetis sanctithomae*. As barras verticais representam o desvio padrão com base em 10 réplicas. Ilustração gerada no programa Harvester.

Os indivíduos com combinações fenotípicas que incluem íris clara possuem quase sempre apresentaram maior probabilidade de pertencer ao grupo biológico vermelho (Figura 13). Da mesma forma, as demais combinações de fenótipos que envolvem íris intermediária ou marrom, são compostas na sua maioria por indivíduos cuja probabilidade de pertencerem ao grupo biológico azul é maior que 85%. Os poucos indivíduos de íris clara cuja probabilidade maior é que pertença ao grupo azul que vermelho (RCC082, com $q_2=54.6\%$ e RCC073, com $q_2=67,83\%$) e os dois indivíduos com íris intermediária ou marrom com percentual de mistura alto (RCC021 $q_2=63,3\%$ e RCC075 $q_2=58,32\%$) são provenientes de Itacoatiara e Novo Remanso, as localidades em que ocorre sobreposição das distribuições dos dois grupos, e região de grande variação nas frequências de q_1 e q_2 .

A diferenciação dos indivíduos com íris clara dos indivíduos com íris intermediária ou marrom, também pôde ser observada quando observamos número de grupos biológicos igual

a três (Figura 13). Quando assumimos este número de grupos, é possível verificar que os indivíduos de íris clara têm maior probabilidade de pertencerem ao grupo vermelho, enquanto que os indivíduos de íris intermediária e marrom possuem probabilidades similares de pertencerem aos grupos verde ou azul. Em nenhuma das hipóteses de número de grupos biológicos ($K=2$ e $K=3$) é possível diferenciar geneticamente as populações de íris intermediária e de íris marrom.

Já para a variação no padrão de mancha pós-ocular, não houve diferenciação tão discreta. Por mais que a maior parte dos indivíduos com cada um dos fenótipos puros esteja em grupos diferentes, a distribuição dos genótipos dos indivíduos com mancha intermediária demonstra que esta é uma mudança em gradiente (clina), sem associação ao fenótipo. A distribuição do padrão de mancha dos indivíduos nos grupos biológicos parece ser melhor explicada pela cor de íris, já que os indivíduos com íris clara estão frequentemente associados à ausência de mancha. Quando observamos as duas características combinadas (figuras 13A e 13D) é possível ver que ficam restritos ao grupo biológico vermelho indivíduos das duas combinações que envolvem íris clara.

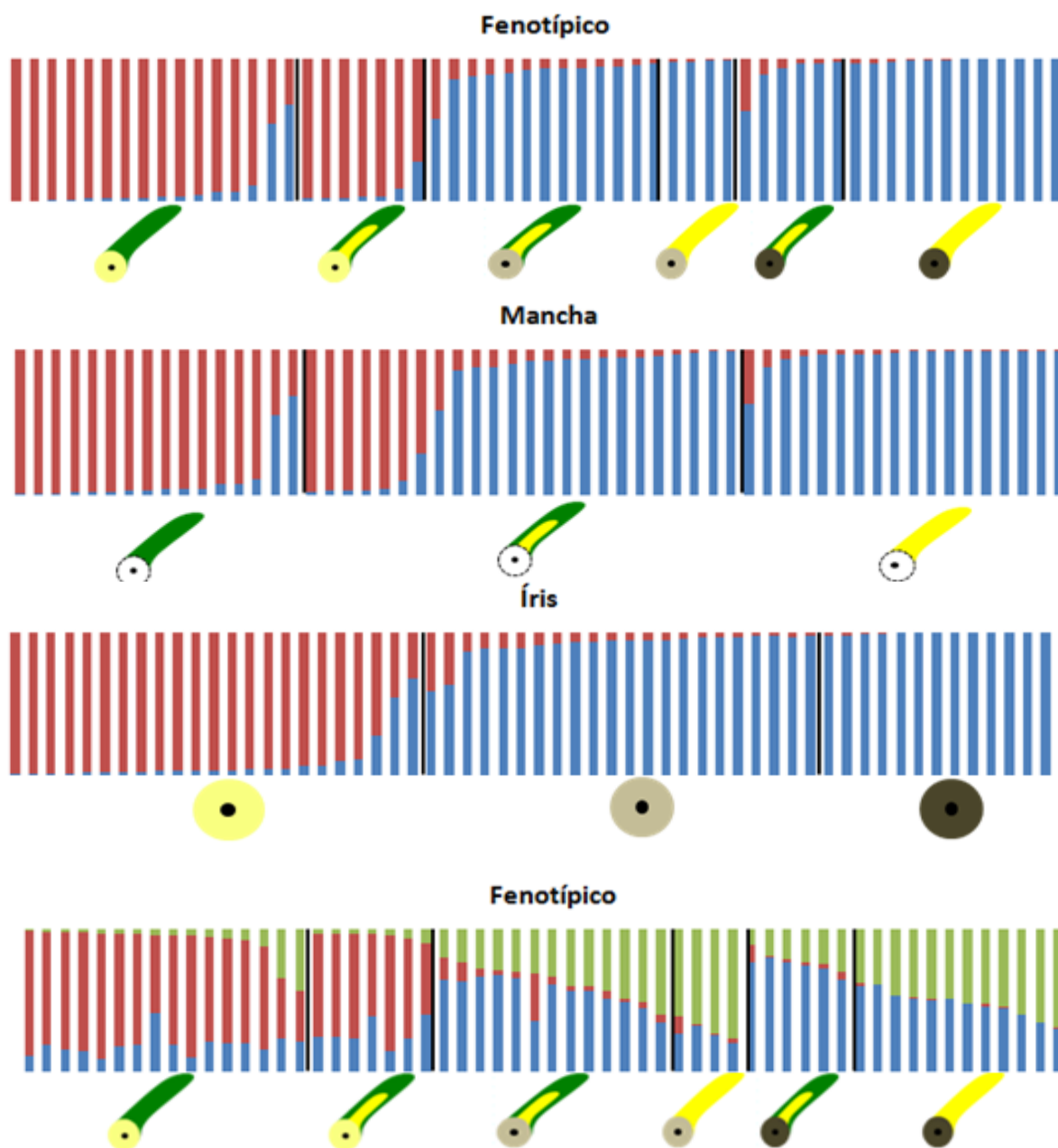


Figura 13: Distribuição dos indivíduos de *B. sanctithomae* segundo as características fenotípicas, a partir de agrupamentos *a priori* de fenótipo. (A) para as duas características juntas, (B) para padrão de mancha e (C) para cor de íris e (13) para os dois fenótipos com $k=3$.

Na distribuição dos indivíduos por localidade (Figura 14A) é possível observar que em cada extremidade geográfica há, em maioria, indivíduos de genótipo puro ou quase puro para uma das subespécies. A oeste, os indivíduos do Acre, Coari e Manacapuru apresentaram $q_1 > 88\%$, enquanto que na Ilha do Marajó e em Parintins, as duas populações mais orientais apresentam sempre $q_2 > 96\%$. A maioria dos indivíduos geneticamente intermediários se encontra no centro da região de substituição, mas com grande variação nas porcentagens de

mistura. Em Novo Remanso, localidade que apresentou maior número de indivíduos geneticamente intermediários, os valores de q_2 variaram de 4,64 a 95,37%. Já Itacoatiara contou com apenas um indivíduo com genoma com grande mistura (RCC021 $q_2=63,3\%$), os demais espécimes desta localidade apresentam $q_2 > 85\%$, ficando gradativamente mais similares a Parintins.

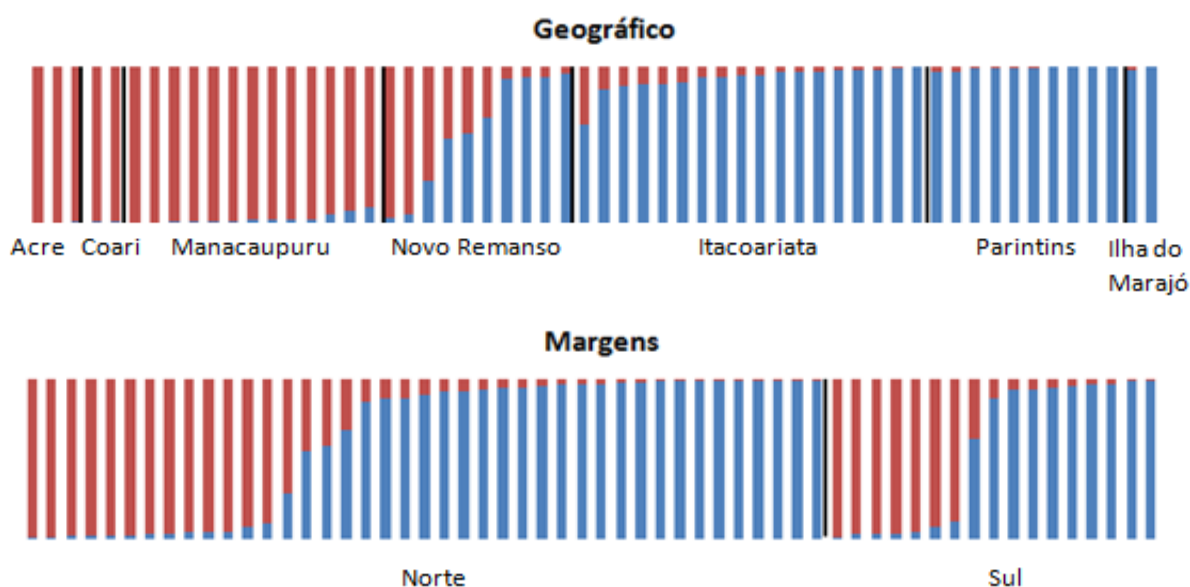


Figura 14: Distribuição dos indivíduos em função dos agrupamentos *a priori* de localidade. (A) para localidade em que foram coletadas ao longo da várzea e (B) para margem dos rios Solimões/Amazonas.

As populações do Acre e de Coari, distantes 1.958, 1.620 e 338 km, respectivamente, a oeste do início da nossa região de coleta, se agruparam com as amostras de Manacapuru. Da mesma forma, os indivíduos da Ilha de Marajó e Parintins, distantes 928 km, também compuseram o mesmo agrupamento biológico. A substituição dos genótipos parece acontecer entre Novo Remanso e Itacoatiara, localidades que estão apenas 72.5 km de distância.

A comparação dos indivíduos entre as margens direita e esquerda do sistema fluvial Solimões/Amazonas, a única que dispõe os indivíduos em uma comparação entre norte e sul, não indica a existência de estrutura genética entre os conjuntos de amostras.

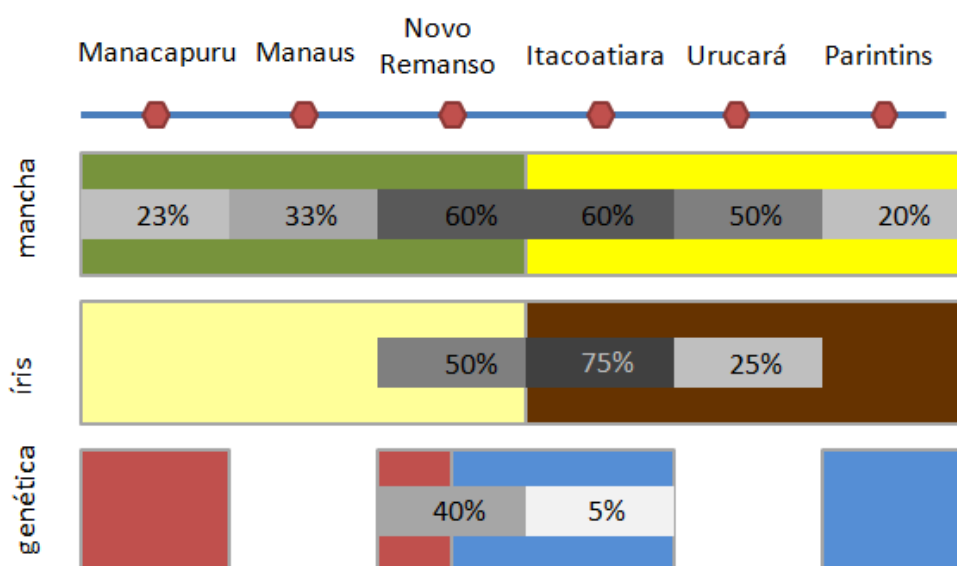


Figura 15: Distribuição geográfica dos fenótipos puros de cada característica e dos grupos biológicos. Na primeira linha, a cor verde corresponde à distribuição da mancha ausente, e a cor amarela da mancha presente. Na segunda linha estão as informações dos fenótipos de íris: branco-amarelado para a distribuição da íris clara, e marrom para íris marrom. Na terceira linha, a cor vermelha se refere à distribuição do grupo genético de *B. s. sanctithomae* e o azul para o *B. s. takatsukasae*. Em cinza estão as frequências das variações intermediárias de íris e de mancha, e de genótipos híbridos, para cada localidade. Os fenótipos típicos se limitaram entre as localidades vizinhas Novo Remanso e Itacoatiara. Indivíduos com genoma “puro” das duas subespécies ocorreram em Novo Remanso. Enquanto que a variação intermediária de mancha foi amostrada em todas as localidades, a variação intermediária de íris e os indivíduos misturados geneticamente foram amostrados apenas nas localidades próximas da substituição das subespécies.

4.2.3. Distância genética

Nas análises de distância genética entre os grupos fenotípicos, as comparações que apresentaram maiores valores foram as que envolvem os fenótipos típicos de cada característica fenotípica. A distância genética entre mancha ausente e mancha presente foi de 0,013 e entre íris clara e íris marrom foi de 0,025 (Tabelas 3 e 4). Já os menores valores foram observados naquelas comparações que envolvem a característica intermediária com o fenótipo de *B. s. takatsukasae* – 0,002 para padrão de mancha e 0,006 para íris.

Tabela 3: Valores de distância genética das comparações par a par entre os grupos de populações de *B. sanctithomae* com padrão de mancha pós-ocular diferente.

| | Mancha ausente | Mancha intermediária |
|----------------------|----------------|----------------------|
| Mancha intermediária | 0,005 | |
| Mancha presente | 0,013 | 0,002 |

Tabela 4: Valores de distância genética das comparações par a par entre os grupos de populações de *B. sanctithomae* com cores de íris diferentes.

| | Íris clara | Íris intermediária |
|--------------------|------------|--------------------|
| Íris intermediária | 0,012 | |
| Íris marrom | 0,025 | 0,006 |

Quando realizadas comparações entre as populações onde os indivíduos foram agrupados a partir da combinação das duas características, foi observado que os maiores valores de distância genética ocorreram quando foram comparadas as duas combinações com íris clara com a combinação fenotípica típica de *B. s. takatsukasae* (0,016 e 0,013, Tabela 5). Todas as comparações de distância genética entre íris intermediária e íris marrom apresentaram valores negativos, demonstrando não haver diferenciação nessas comparações.

Tabela 5: Valores de distância genética das comparações par a par entre os grupos de populações com combinações fenotípicas diferentes.

| | Combinação fenotípica 1 | Combinação fenotípica 2 | Combinação fenotípica 3 | Combinação fenotípica 4 | Combinação fenotípica 5 |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Combinação fenotípica 2 | -0,006 | | | | |
| Combinação fenotípica 3 | 0,011 | 0,007 | | | |
| Combinação fenotípica 4 | -0,195 | -0,201 | -0,212 | | |
| Combinação fenotípica 5 | -1,103 | -0,108 | -0,116 | -0,262 | |
| Combinação fenotípica 6 | 0,016 | 0,013 | -0,003 | -0,227 | -0,102 |

Nas comparações geográficas entre localidades, é possível observar que as localidades imediatamente vizinhas apresentam valores baixos de distância genética (0,009, 0,005 e 0,005, Tabela 4). A maior distância genética foi encontrada entre as localidades que apresentam maior distância geográfica e onde predominam os fenótipos e genótipos “típicos” de cada subespécie – Manacapuru com *B. s. sanctithomae* e Parintins com *B. s. takatsukasae* – com valor de 0,023.

A comparação entre Manacapuru – onde predomina *B. s. sanctithomae* – e Itacoatiara – região que apresentou pouca mistura genética, predominando *B. s. takatsukasae* – apresentou a segunda maior distância genética (0,017), mesmo estas localidades estando a apenas 190km de distância uma da outra. Essa distância geográfica é menor que a distância entre Parintins e Novo Remanso (321,5km) e Parintins e Itacoatiara (249km), cujas distâncias genéticas foram de apenas 0,008 e 0,005, respectivamente (Tabela 6). No entanto, essas outras

comparações envolvem apenas localidades de predominância fenotípica e genotípica do *B. s. takatsukasae* (Parintins e Itacoatiara) ou região de encontro dos grupos genéticos e co-ocorrência dos dois morfotipos típicos (Novo Remanso). O teste de Mantel apresentou coeficiente de correlação alto entre as distâncias genéticas e geográficas ($r=0,706$), mas não significativo ($P=0,13$).

Tabela 6: Valores de distância genética das comparações par a par entre as populações de *B. sanctithomae* de localidades diferentes. Entre parênteses está a distância geográfica entre essas populações, em quilômetros.

| | Manacapuru | Novo Remanso | Itacoatiara |
|--------------|---------------|---------------|-------------|
| Novo Remanso | 0,009 (183) | | |
| Itacoatiara | 0,017 (190,5) | 0,005 (72,5) | |
| Parintins | 0,023 (505) | 0,008 (321,5) | 0,005 (249) |

4.2.4. Variação entre e dentro das populações

A variação genética observada entre as populações com características fenotípicas típicas de íris e de mancha apresentaram valores semelhantes para o coeficiente de variação dentro das populações (19,05 e 19,03, respectivamente) e o entre as populações (80,95 e 80,98, respectivamente) (Tabela 7). Nota-se que, em ambas as comparações, a maior parte da variação genética encontra-se entre as populações, e não dentro delas.

Tabela 7: Coeficiente de variação fenotípica das comparações par a par entre as populações a partir dos agrupamentos *a priori* de cor de íris, padrão de mancha e ambas as características fenotípicas, incluindo todos os caracteres amostrados.

| | Coeficiente de Variação | |
|--------|-------------------------|---------------------|
| | dentro das populações | Entre as populações |
| íris | 19,05 | 80,95 |
| mancha | 19,03 | 80,98 |

4.2.5. Locus sob seleção divergente

Para a análise de possíveis locos sob seleção divergente, foram selecionados apenas aqueles indivíduos que apresentaram fenótipos típicos das subespécies nas duas características e genótipo próximo de “puro” (segundo as análises do STRUCTURE). Esses indivíduos foram separados em dois grupos, cada um correspondendo a uma das subespécies, e foram comparados com uso do *software* Bayescan. Os resultados desta análise também apontaram variação nos valores de diferenciação entre os locos, demonstrando que as subespécies experimentam níveis variados de diferenciação. Entre os 364 locos analisados, a maior parte do genoma mantém diferenciação muito baixa. Os dois locos que apresentam maiores valores de diferenciação (loco 226_90 com $F_{ST}= 0,333$ e loco 1008_158 com

$F_{ST}=0,333$) apresentaram valores de α positivo (1,15 e 1,20, respectivamente). Valores de α positivos significam seleção divergente (Foll & Gaggiotti 2008). Além disso, esses locos apresentaram fator de Bayes de 1,15 e de 0,592, respectivamente, o que segundo a interpretação de Jeffrey (Foll & Gaggiotti 2008) significa que as evidências de seleção divergente para esses locos são substancial e forte, respectivamente.

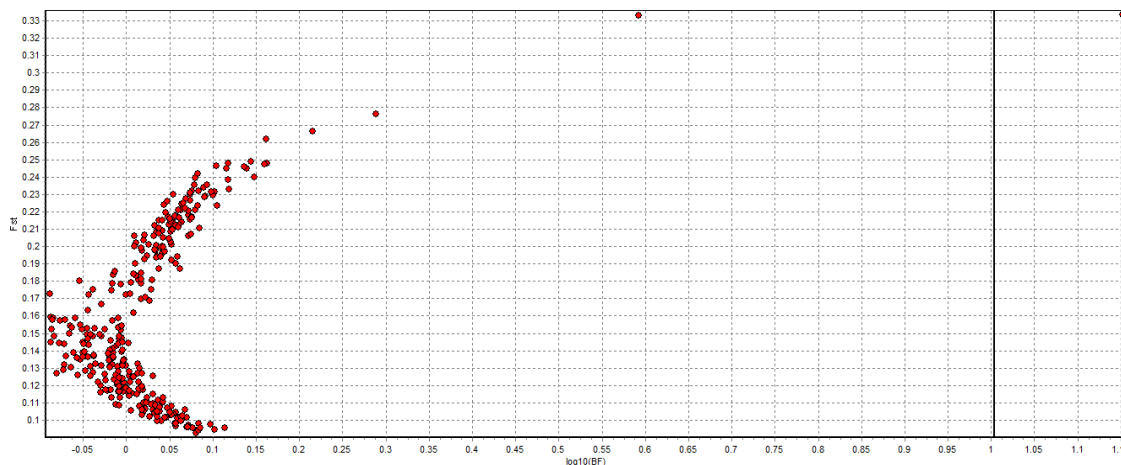


Figura 16: Valores de F_{ST} por loco, realizado no software Bayescan. Um loco (68) apresenta fator de Bayes maior que 1,0 (forte evidência de seleção).

5. DISCUSSÃO

Foi observada a ocorrência de dois morfotipos típicos dentro da espécie *Brotogeris sanctithomae*. *B. s. sanctithomae*, encontrado na porção ocidental da Amazônia possui íris clara e não apresenta penas amarelas na região pós-ocular, enquanto que *B. s. takatsukasae*, da região mais oriental, tem íris marrom e uma mancha amarela na região pós-ocular. Na região de encontro dos dois táxons, observamos a ocorrência de várias formas intermediárias das duas características. As formas intermediárias de íris e de mancha podem ser encontradas em um mesmo indivíduo ou cada uma pode ser combinada com estados puros do outro caráter, gerando várias combinações fenotípicas.

As análises genéticas corroboraram que há dois grupos biológicos entre os indivíduos amostrados. Esses grupos biológicos correspondem aos indivíduos que possuem íris clara (*B. s. sanctithomae*) e aos indivíduos que possuem íris intermediária ou marrom (*B. s. takatsukasae*). Portanto, a cor da íris é uma característica que melhor diagnostica as duas subespécie. É também a característica que separa *B. s. sanctithomae* de todos os demais táxons do gênero, visto que o marrom é a cor de íris de todas as demais espécies. A variação na mancha pós-ocular não diferenciou os grupos biológicos e a ocorrência de manchas irregulares e assimétricas se estendeu por toda a região geográfica amostrada e mesmo fora dela, demonstrando que esta característica pode sofrer introgressão mais frequente que a cor da íris.

Os indivíduos de *B. sanctithomae* amostrados em margens opostas do rio Amazonas não apresentaram diferenças genotípicas e fenotípicas geograficamente consistente, evidenciando que o modelo de endemismo por interflúvios não se aplica para este psitacídeo. Mais de uma vez, durante as coletas, bandos de aproximadamente 20 indivíduos foram observados completando a travessia do rio, partindo de uma margem, até se aproximarem de árvores altas na margem oposta. Neste sentido, o rio Solimões/Amazonas não constitui uma barreira para o fluxo gênico nesta espécie e a variação fenotípica e genotípica indica diferenciação entre a Amazônia Ocidental e Oriental.

5.1. Seleção de locos para análises genéticas

A alta taxa de *missing data* nos bancos de dados de *RAD tags* e *ddRAD tags* é, em partes, explicada pelos polimorfismos nos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição. Em estudo recente com esta técnica, Wagner *et al.* (2013) mostraram que apenas 0,5% dos locos são comuns a mais de 95% dos indivíduos e apenas 5% dos locos estão presentes em mais de 80% dos indivíduos. Além disso, eles verificaram o efeito do tamanho do banco de

dados (e, implicitamente, da quantidade de *missing data* permitida) para reconstrução filogenética. Eles concluíram que, para estudos filogenéticos, mesmo as matrizes menores já conseguiram resolução dos clados, nunca obtida anteriormente com marcadores mitocondriais. No entanto, as árvores com melhor resolução filogenética e maior suporte estatístico foram geradas a partir de matrizes maiores, a despeito da quantidade de *missing data*.

5.2. Variação no genoma de *Brotogeris sanctithomae*

As duas subespécies de *Brotogeris sanctithomae* apresentam níveis variados de diferenciação genética. Alguns locos apresentaram diferenciação em todas as comparações de cada uma das características fenotípicas, e também das duas combinadas. Isso já era esperado, devido à correlação entre as duas características típicas de cada subespécie, que torna os grupos populacionais das comparações similares. Mas isso também pode ser reflexo de alguns fenômenos. Novas mutações são mais prováveis de divergirem entre populações se elas surgirem em regiões genômicas que já apresentam introgressão reduzida (Rieseberg, 2001; Nosil *et al.*, 2009). Supondo que cada uma das características fenotípicas estudadas é regulada por genes diferentes, o fato dos caracteres divergirem entre as duas subespécies, mas em cada subespécie estarem frequentemente associados e apresentarem sinais de diferenciação genética em locos em comum, nos faz cogitar que esses genes possam estar ligados fisicamente. Dessa forma, os SNPs amostrados estariam associados às duas regiões genômicas responsáveis pelos fenótipos e o que explicaria a diferenciação genética em todas as comparações efetuadas. Uma explicação alternativa para essa estrutura genética em locos em comum seria que as duas características são reguladas por um mesmo gene (i. e. pleiotropia).

Quando duas populações apresentam diferenciação genética devido à atuação de seleção divergente, a força da seleção influenciará a quantidade de diferenciação apresentada em locos associados à região genética sob seleção (Nosil *et al.*, 2009). O fato de as comparações de cor de íris apresentarem maior número de locos significativamente diferentes, e por vezes maior estruturação genética, pode significar que esta característica sofre maior seleção, e conseqüentemente, a introgressão desta característica na outra subespécie acontece em menor frequência.

5.3. Separação entre Leste e Oeste da Amazônia e conexão ocasionando contato secundário

O fato dessa região de várzea da Amazônia central brasileira também representar o

local de substituição para vários táxons aparentados de aves (Cohn-Haft *et al.*, 2007) e de outros grupos de organismos (formigas, aranhas, árvores e peixes) (Vasconcelos *et al.*, 2007; Venticinque *et al.*, 2007; *Albernaz et al.*, 2007; Zuanon *et al.*, 2007) nos leva a acreditar que a especiação desses táxons ocorreu devido a um evento de alopatria histórica na várzea, com posterior contato secundário. De fato, de acordo com as evidências geológicas, a história evolutiva da Amazônia envolve um longo período no qual as porções leste e oeste estiveram separadas (Hoorn *et al.*, 2010, Latrubesse *et al.* 2010, Nogueira *et al.* 2013).

De acordo com as reconstruções paleoambientais mais aceitas, antes da drenagem do rio Amazonas existir da forma que a conhecemos hoje, existia na porção ocidental da Amazônia uma grande região dominada por ambientes lacustres, conhecida como lago Pebas. A porção leste, por outro lado, já era caracterizada por um sistema de drenagem fluvial, mas de menor extensão que o atual. Ali, existiu um precursor do baixo rio Amazonas, mas que não se conectava com o sistema lacustre a oeste. A conexão entre as duas regiões se deu apenas após o soerguimento dos Andes, que gerou grande aporte de sedimentos na bacia sedimentar do oeste e propiciou a conexão entre os dois sistemas, causando a drenagem do sistema lacustre e a formação de um sistema fluvial transcontinental direcionado para leste. No entanto, a data desta conexão é altamente debatida na literatura geológica atual. Alguns autores propõem que ela ocorreu há cerca de 10 milhões de anos (Hoorn *et al.*, 2010), enquanto outros estudos propõem uma data bem mais recente, entre seis (Latrubesse *et al.*, 2010) e dois (Campbell *et al.*, 2006) milhões de anos. Por outro lado, pouco se sabe sobre como os ciclos glaciais podem ter afetado as florestas de várzea no passado recente. O último máximo glacial, há cerca de 18 mil anos, parece ter sido uma época mais seca no leste da Amazônia, enquanto o oeste manteve-se úmido (Cheng *et al.*, 2013), mas não sabemos se essa época mais seca poderia causar descontinuidades na distribuição da várzea.

Para entender se algum evento geológico pode ter afetado a distribuição geográfica das linhagens de *B. sanctithomae*, ainda é necessário investigar há quanto tempo esta espécie está divergindo e encontrar hipóteses que expliquem esta divergência. Ainda, é necessário estudar a especiação dos outros pares de linhagens para entender se as regiões de endemismo na várzea podem ser explicadas por uma mesma história evolutiva ou se eventos diferentes podem ter contribuído para as distribuições atuais das linhagens.

5.4. Refutando a hipótese de seleção natural divergente

Na região de substituição das duas subespécies, não existe barreira física atual, apenas diferenças ecológicas sutis. As matas de várzea da Amazônia ocidental e oriental possuem

paisagens diferentes, sendo mais altas, fechadas e densas na região oeste e mais abertas, baixas (e com maior ocupação humana e pecuária) na região leste (Albernaz *et al.*, 2007).

Contudo, seleção divergente somente poderia explicar as diferenças observadas entre as duas subespécies se a substituição de paisagens acontecesse de forma tão súbita quanto a substituição dos morfotipos. Como as paisagens de várzea vão sendo substituídas de forma gradual e a substituição das linhagens acontece de forma abrupta, com uma região de sobreposição estreita, é improvável que as diferenças ecológicas nas paisagens sejam responsáveis por causar a divergência entre as linhagens de *Brotogeris sanctithomae*. Tampouco poderíamos afirmar que a região de sobreposição de linhagens e a presença de morfotipos intermediários caracteriza uma clina, uma vez que cada uma das subespécies tem extensa distribuição e a região de contato e hibridização fica restrita a uma faixa de poucos quilômetros.

Além disso, enquanto que as linhagens apresentam diferenças morfológicas bem evidentes, as diferenças nas paisagens são sutis, e podem ter sido causadas depois da ocupação humana recente. Além do mais, na Amazônia Oriental, ao longo da distribuição de *B. s. takatsukasae*, a mata volta a ficar parecida com as florestas de várzea da Amazônia ocidental, enquanto que a subespécie encontrada continua a mesma, portanto não existe uma adaptação ecológica da subespécie ao ambiente. Acima de tudo, as diferentes características fenotípicas observadas nas duas subespécies não parecem representar vantagens adaptativas. Logo, é presumível que elas não estejam sujeitas a seleção natural.

5.5. Seleção sexual e Hibridização

Duas populações estreitamente aparentadas podem estar em contato e não conseguirem se reproduzir livremente caso exista entre elas alguma forma de isolamento reprodutivo (Dobzhansky, 1970). Esse tipo de barreira impede o fluxo gênico e mantém as populações divergindo. As barreiras reprodutivas podem acontecer antes do cruzamento, através de diferenças ecológicas entre as duas linhagens que as impedem de cruzar e formar zigotos híbridos (Schluter, 2000). Entre os tipos de barreiras pré-cruzamento, está o isolamento sexual, em que a variação não compartilhada entre as linhagens faz com que os indivíduos não possuam atração pelo outro e não se reconheçam como parceiros potenciais. Seehausen *et al.* (2008) demonstraram associação entre a coloração do corpo do macho e preferência sexual da fêmea entre populações divergentes de ciclídeos do lago Victoria, na África. Esse mesmo mecanismo, em que os indivíduos preferem acasalar com seus semelhantes, parece acontecer entre as duas linhagens de *Brotogeris sanctithomae*, mas

eventualmente é superado na região onde as duas linhagens se encontram.

Quanto à existência de barreiras de isolamento após o cruzamento, não é possível saber se toda prole híbrida seria viável e fértil, tampouco sabemos se esses indivíduos possuem *fitness* igual ou inferior àqueles geneticamente puros. Mas nós pudemos observar que há híbridos viáveis e que a introgressão ocorre com frequência. Logo, caso existam barreiras pós-cruzamento, elas são frágeis e frequentemente vencidas. No entanto, a região de contato é geograficamente limitada e foram amostrados poucos indivíduos geneticamente mistos, mesmo dedicando os esforços de coleta a uma região suscetível ao encontro deles. Com isso, é difícil de acreditar que os mecanismos pré-cruzamento, que já apresentam fragilidade, sejam a única barreira que impede as duas subespécies de cruzarem livremente.

Ao contrário das regiões distantes do contato, na região de substituição das subespécies não existe associação perfeita de genótipo puro com fenótipo puro. Os indivíduos morfologicamente intermediários frequentemente possuem o genoma quase puro e os híbridos por vezes apresentam fenótipo típico de uma das subespécies. Isso pode ser explicado por introgressão, em que o híbrido – quando viável e fértil – cruza com outro híbrido ou com indivíduos de uma das linhagens parentais, por mais de uma geração. O cruzamento do híbrido com um indivíduo puro pode gerar uma prole geneticamente mais homogênea, mas que retém uma pequena quantidade de genoma misturado que mantém traços fenotípicos da outra linhagem. E quando o híbrido cruza com outro híbrido, mantém o genoma misturado, mas diminui a heterozigozidade. Com isso, os locos responsáveis pelo fenótipo podem ficar homocigotos e expressar características fenotípicas puras. Sendo assim, na região próxima ao contato entre as duas subespécies, nenhum fenótipo funciona como diagnóstico de híbrido ou linhagem pura.

A distribuição geográfica de híbridos é congruente com a distribuição da variação de íris intermediária, já mancha pós-ocular intermediária foi amostrada ao longo de uma maior extensão, e inclusive a milhares quilômetros de distância da região de contato. Isso corrobora a hipótese que a cor da íris pode ser uma barreira de isolamento mais eficiente em manter as linhagens separadas, e a mancha pós-ocular, por ser uma barreira mais frágil, consegue realizar introgressão com mais frequência e estar presente em maior extensão.

Os híbridos genéticos foram amostrados numa faixa geográfica restrita em Novo Remanso e um indivíduo foi amostrado na vizinha Itacoatiara. Entretanto, as duas localidades adjacentes a esta região - Manaus e Urucará - não foram sequenciadas. Os indivíduos coletados em Manaus apresentaram homogeneidade fenotípica em relação a cor da íris, mas esta localidade está imediatamente ao lado de Novo Remanso, onde foi amostrada maior

frequência de indivíduos geneticamente misturados e contato das duas subespécies. A inclusão de Manaus no sequenciamento poderia aumentar a extensão da faixa onde são encontrados os híbridos. Já Urucará, apesar de apresentar uma maior variação fenotípica, está mais distante do contato dos grupos genéticos e provavelmente seus indivíduos apresentariam genética mais similar à de *B. s. takatsukasae*.

6. CONCLUSÃO

Uma análise filogenética das espécies de *Brotogeris* (Ribas *et al.*, 2009) utilizou amostras das duas subespécies de procedências geográficas distantes centenas de quilômetros da zona de hibridização das duas subespécies, onde presume-se existir apenas indivíduos com fenótipos e genótipos típicos de cada táxon. Embora o objetivo daquele estudo não tenha sido investigar o polimorfismo desta espécie, foram utilizados genes mitocondriais tradicionalmente utilizados em estudos ornitológicos de variação intraespecífica e filogeografia (ND2 e citocromo B), por isso a expectativa de que esses genes pudessem diferenciar as duas subespécies. Contudo, a utilização desses genes não permitiu identificar os limites entre essas duas subespécies, nem para outras subespécies no mesmo gênero. A obtenção de SNPs através do sequenciamento das *ddRAD tags* demonstrou que *Brotogeris sanctithomae* apresenta divergência genômica heterogênea, com a maior parte do genoma mantendo-se indiferenciada. Na presença deste padrão, há necessidade de amostrar maiores quantidade de locos para encontrar as regiões genômicas sob seleção divergente, causando o isolamento reprodutivo ou que estejam fisicamente ligados a estes e reflitam este sinal (Nosil *et al.*, 2009). Não seria possível detectar sinais de divergência evolutiva entre as duas linhagens se não tivéssemos uma amostragem representativa do genoma, especialmente se dedicássemos nossa amostragem a genes supostamente neutros. Sem o sequenciamento de nova geração, a obtenção de grande quantidade de dados se torna inviável, tanto por custo e tempo, quanto por se tornar um trabalho extremamente laborioso, impedindo uma grande amostragem.

Em outras filogenias de psitacídeos neotropicais, algumas espécies tradicionalmente aceitas na taxonomia do grupo não foram reconhecidas e limites específicos não foram resolvidos (Ribas *et al.*, 2006; Ribas *et al.*, 2007). A explicação geral para esses casos é que a evolução das características fenotípicas que diferenciam as espécies parece acontecer de forma mais rápida que as metodologias tradicionais conseguem detectar. No entanto, nem sempre conseguimos chegar a esta conclusão porque filogenias baseadas em poucos genes, quando não encontram monofilia recíproca, não conseguem concluir se isso se deve a fluxo gênico ocorrendo entre as linhagens ou apenas à ausência de diferenças fixadas naquele gene. Essas incertezas nos impedem de conseguir estabelecer limites entre as espécies e entender fenômenos populacionais como a hibridização e separação incompleta de linhagens. Para entender melhor os processos de evolução que diferenciam as espécies e como fenômenos como hibridização afetam evolução dos psitacídeos é necessário maior investigação através

de técnicas que esclareçam esses fenômenos.

Por outro lado, em outros casos, a taxonomia de algumas espécies de psitacídeos (ou mesmo gêneros) foi revista com base em estudos filogenéticos moleculares indicando que grupos que considerávamos aparentados na verdade não o são (Ribas *et al.*, 2003, Ribas *et al.*, 2005). Mais uma vez isto demonstra que não compreendemos totalmente como as características fenotípicas diagnosticam grupos taxonômicos. No caso de *Brotogeris sanctithomae*, o melhor diagnóstico para as duas subespécies, a cor da íris, por todo esse tempo não foi notada como uma variação existente dentro da espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albernaz, A. L., Costa, L. R. F., 2007. Planejamento Sistemático para conservação da várzea. In: A. L. Albernaz. (Ed.). Conservação da várzea: Identificação e caracterização de regiões biogeográficas. Ibama/ProVárzea, Manaus, Amazonas. Páginas: 325-348.
- Albernaz, A. L.; Moreira, M. P.; Ramos, J.; Assunção, P. A.; Franciscon, C. H. 2007. Contribuição ao conhecimento da distribuição de árvores. In: A. L. Albernaz. (Ed.). Conservação da várzea: Identificação e caracterização de regiões biogeográficas. Ibama/ProVárzea, Manaus, Amazonas. Páginas: 77-92.
- Aleixo, A. 2006. Historical diversification of floodplain forest specialist species in the Amazon: a case study with two species of the avian genus *Xiphorhynchus* (Aves: Dendrocolaptidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 89: 383–395
- Baird, N.A.; Etter, P.D.; Atwood, T.S.; Currey, M.C.; Shiver, A.L. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3 (10): 1-7.
- Cadena, C. D.; Gutiérrez-Pinto, N.; Dávila, N.; Chesser, R. T. 2011. No population genetic structure in a widespread aquatic songbird from the Neotropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58: 540–545.
- Capparella, A.P. 1987. Effects of riverine barriers on genetic differentiation of Amazonian forest undergrowth birds. Unpublished DPhil Dissertation, Louisiana State University.
- Catchen, J.; Amores, A.; Hohenlohe, P. A.; Cresko, W. A.; Postlethwait, J. H. 2011. Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3*, 1: 171-182.
- Catchen, J.; Hohenlohe, P. A.; Bassham, S.; Amores, A.; Cresko, W. A. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22: 3124–3140.
- Cheng, H.; Sinha, A.; Cruz, F. W.; Wang, X.; Edward, R. L.; Horta, F. M.; Ribas, C. C.; Vuille, M; Stott, L. D; Auler, A. S. Climate change patterns in Amazonia and biodiversity. *NAT COMMUN*, 4: 1411.
- Cohn-Haft, M.; Naka L.N.; Fernandes, A.M. 2007. Padrões de distribuição da avifauna da várzea dos rios Solimões e Amazonas. In: A. L. Albernaz. (Ed.). Conservação da várzea: Identificação e caracterização de regiões biogeográficas. Ibama/ProVárzea, Manaus, Amazonas. Páginas: 287-323.
- Coyne, J. A.; Orr, H. A. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. 545.
- Dobzhansky, T. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York.

- Ewing, B.; Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*, 8: 186-194.
- Foll, M.; Gaggiotti, O. 2008. A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *Genetics*, 180: 977-993.
- Funk, D. J.; Omland, K. E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34: 397–423
- Gavrilets, S.; Vose, A. 2005. Dynamic patterns of adaptive radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102:18040–18045.
- Hackett, S.J. 1996. Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 368–382.
- Hohenlohe, P. A.; Phillips, P. C.; Cresko, W. A. 2010. Using population genomics to detect selection in natural populations: key concepts and methodological considerations, *Int J Plant Sci*, 171(9): 1059–1071.
- Hoorn, C.; Wesselingh, F. P.; ter Steege, H.; Bermudez, M. A.; Mora, A.; Sevink, J.; Sanmartín, I.; Sanchez-Meseguer, A.; Anderson, C. L.; Figueiredo, J. P.; Jaramillo, C.; Riff, D.; Negri, F. R.; Hooghiemstra, H.; Lundberg, J.; Stadler, T.; Särkinen, T.; Antonelli A. 2010. Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. *Science*, 330: 927-931.
- Latrubesse, E. M.; Cozzuol, M.; Silva-Caminha, S. A. F.; Rigsby, C. A.; Absy, M. L.; Jaramillo, C. 2010. The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth-Science Reviews*, 99: 99–124
- McComarck et al., 2012 McComarck, 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.
- Miller, M. R.; Dunham, J. P.; Amores, A.; Cresko, W. A.; Johnson, E. A. 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, 17: 240–248.
- Nogueira, A. C. R.; Silveira, R.; Guimarães, J. T. F. 2013. Neogene-Quaternary sedimentary and paleovegetation history of the eastern Solimões Basin, central Amazon region. *Journal of South American Earth Sciences*, 46: 89-99.
- Nosil, P.; Egan, S.P.; Funk, D.J. 2008. Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: ‘isolation-by-adaptation’ and multiple roles for divergent selection. *Evolution*, 62: 316–336.

- Nosil, P.; Funk, D. J.; Ortiz-Barrientos, D. 2009 Divergent selection and Heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, 18: 375–402.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Ribas, C. C.; Miyaki, C. Y. 2003. Molecular systematics in *Aratinga* parakeets: species limits and historical biogeography in the *solstitialis* group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 663–675.
- Ribas, C. C.; Gaban-Lima, R.; Miyaki, C. Y.; Cracraft, J. 2005. Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)*, 32: 1409–1427.
- Ribas, C. C.; Joseph, L.; Miyaki, C. Y. 2006. Molecular Systematics and patterns of diversification in *Pyrrhura* (Psittacidae), with special reference to the *Picta-Leucotis* Complex. *The Auk*, 123(3): 660–680.
- Ribas, C. C.; Tavares, E. S.; Yoshihara, C.; Miyaki, C. Y. 2007. Phylogeny and biogeography of Yellow-headed and Blue-fronted Parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with special reference to the South American taxa. *Ibis*, 149: 564–574.
- Ribas, C. C.; Miyaki, C. Y.; Cracraft, J. 2009. Phylogenetic relationships, diversification and biogeography in Neotropical *Brotogeris* parakeets. *Journal of Biogeography*, 36, 1712–1729
- Ribas, C. C.; Aleixo, A.; Nogueira, A. C. R.; Miyaki, C. Y.; Cracraft, J. 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society*, 279, 681–689
- Rundle, H.; Nosil, P. 2005. Ecological speciation. *Ecol. Lett.*, 8:336–352.
- Seehausen, O.; Terai, Y.; Magalhães, I. S.; Carleton, K. L.; Mrosso, H. D. J.; Miyagi, R.; Sluijs, I. V. D.; Schneider, M. V.; Maan, M. E.; Tachida, H.; Imai, H.; Okada, N. Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature*, 455: 620-628.
- Vasconcelos, H. L. 2007; Padrões de distribuição de formigas na várzea amazônica. In: A. L. Albernaz. (Ed.). *Conservação da várzea: Identificação e caracterização de regiões biogeográficas*. Ibama/ProVárzea, Manaus, Amazonas. Páginas: 153-178.
- Venticinque, E. M.; Rego, F. N. A. A.; Brescovit, A. D.; Rheims, C. A.; Ruiz, G. R. S. 2007. A araneofauna (Araneae, Arachnida) das várzeas do rio Amazonas: Padrões de distribuição e estado de conhecimento atual. In: A. L. Albernaz. (Ed.). *Conservação da várzea: Identificação e caracterização de regiões biogeográficas*. Ibama/ProVárzea, Manaus, Amazonas. Páginas: 179-198.
- Via, S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16 (7): 381-390.

Via, S.; West, J. 2008. The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. *Molecular Ecology*, 17: 4334–4345.

Vines, T. H.; Köhler, S. C.; Thiel, M.; Ghira, I.; Sands, T. R.; MacCallum, C. J.; Barton, N.H.; Nürnberg, B. 2003. The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Evolution*, 57:1876–1888.

Wallace, A. R. "On the Monkeys of the Amazon (1852)" (2009). Alfred Russel Wallace Classic Writings. Paper 3. (http://digitalcommons.wku.edu/dlps_fac_arw/3)

Wagner, C. E.; Keller, I.; Wittwer, S.; Selz, O. M.; Mwaiko, S.; Greuter, L.; Sivasundar, A.; Seehausen, O. 2013. Genome-wide RAD sequence data provide unprecedented resolution of species boundaries and relationships in the Lake Victoria cichlid adaptive radiation. *Molecular Ecology*, 22: 787–798.

Wu, C-I. 2001. The genic view of the process of speciation. *J. Evol. Biol.*, 14: 851-865.

Zuanon, J.; Py-Daniel, L. R.; Ferreira, E. J. G.; Claro Jr., L. H.; Mendonça, F. P. 2007. Padrões de distribuição da ictiofauna na várzea do sistema Solimões-Amazonas, entre Tabatinga (AM) e Santana (PA). 2007. In: A. L. Albernaz. (Ed.). Conservação da várzea: Identificação e caracterização de regiões biogeográficas. Ibama/ProVárzea, Manaus, Amazonas. Páginas: 237-286.