

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA

Influência de eventos históricos e recentes na filogeografia e estrutura genética de *Neothraupis fasciata* (Aves: Thraupidae), uma ave endêmica do Cerrado

Cássia Alves Lima
Orientador: Dr. Renato Caparroz

Brasília - DF
Mai 2016

Cássia Alves Lima

Influência de eventos históricos e recentes na filogeografia e estrutura genética de *Neothraupis fasciata* (Aves: Thraupidae), uma ave endêmica do Cerrado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Renato Caparroz

Brasília - DF

Mai 2016

"Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa".

João Guimarães Rosa - Grande sertão: veredas

Agradecimentos

Família e amigos tornam toda jornada muito mais fácil e recompensadora...

... agradeço aos meus pais e irmãos por sempre terem me apoiado nas minhas decisões. O apoio de vocês foi imprescindível para que eu chegasse até aqui. À Renan, minha nova família, que me dedicou tanto amor, carinho e compreensão em todos os momentos deste longo caminho. À Amanda e Priscila por terem me acolhido tão bem todos estes anos, pela ajuda no laboratório e pelas sessões de terapia às quartas-feiras no Pôr-do-Sol. Amanda, muito obrigada por todas as nossas conversas e discussões científicas ao longo destes quatro anos. À Laurinha Gagliardi, pela amizade e ajuda. À Van Pêgos, minha *roommate*, por ter me oferecido abrigo no frio de Minnesota e por ter feito minha estadia muito mais alegre. À todos os meus amigos pelo suporte emocional.

Aos Professores e colegas de laboratório, e todos aqueles que contribuíram para que este projeto pudesse ser realizado, em especial...

... ao meu orientador, Prof. Renato Caparroz, que aceitou o desafio de me orientar durante o doutorado. Obrigada por todo suporte nos trabalhos de campo e discussões científicas, tenho certeza devo à você grande parte do meu crescimento nestes últimos quatro anos. Ao Prof. Robert Zink por ter me recebido durante o doutorado sanduíche em seu laboratório na Universidade de Minnesota e também pelas aulas de tiro que tive durante a minha estadia no Lago Winnie. Ao Laboratório de Genética e Biodiversidade representado pelos Professores David Bertoli, Fernando Rodrigues, Lílian Giugliano e Renato Caparroz, todos os seus orientandos e técnicos. Só tenho à agradecer pelo acolhimento e por todo o aprendizado que construí. Em especial gostaria de agradecer à todos que ainda fazem ou fizeram parte do grupo de Ornitologia do LabGenBio pelo auxílio no trabalho de campo. Afinal de contas foram mais de 12 mil quilômetros percorridos durante as expedições ao campo. Às alunas de iniciação científica Renatinha e Marina, que muito me ajudaram nos trabalhos de campo no IBGE e com os microssatélites.

Aos diretores e funcionários do ParNa das Emas, ParNa Serra da Canastra, ParNa Chapada dos Guimarães, ParNa Grande Sertão Veredas, da Reserva Ecológica Ecológica do IBGE, Estação Ecológica de Águas Emendadas, Estação Ecológica do

Jardim Botânico de Brasília, Fazenda Ouro e Prata em Nova Xavantina, Fazenda Nova Aliança em Ponte Alta do Tocantins e Embrapa Amapá pelo auxílio durante os trabalhos de campo. Aos curadores dos museus consultados, em especial Alexandre Aleixo.

Ao Professor Fernando P. Rodrigues e à Amanda Vaz o meu mais sincero muito obrigada por todas as considerações sobre este manuscrito.

Aos professores Dra. Maria Alice dos Santos Alves e Dr. Natan Medeiros Maciel que participaram da banca de qualificação do projeto.

À Dr. Gustavo S. Cabanne, Dra. Lílian G. Giugliano, Dra. Maria Alice dos Santos Alves, Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães e Dra. Silviene Fabiana de Oliveira que prontamente atenderam ao pedido de participar da banca de avaliação desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e aos professores do Instituto de Biologia.

Ao CNPq e à Capes pela concessão de bolsa de estudos e à FAP-DF pelo auxílio financeiro para participação em eventos científicos.



SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Capítulo I - Introdução Geral	
O Cerrado	4
Marcadores moleculares	8
Modelagem de nicho ecológico	9
Caracterização da espécie alvo	10
Objetivos	11
Referências bibliográficas	12
Capítulo II - Estrutura genética espacial do tiê-do-cerrado (<i>Neothraupis fasciata</i>, Aves: Thraupidae) na paisagem heterogênea e fragmentada das savanas brasileiras	
Resumo	18
Introdução	19
Material e Métodos	22
Resultados	31
Discussão	40
Conclusão	46
Referências bibliográficas	47
Capítulo III - Influência dos eventos climáticos do Quaternário na filogeografia de uma ave endêmica do Cerrado (<i>Neothraupis fasciata</i>, Aves: Thraupidae)	
Resumo	54
Introdução	55
Material e Métodos	58
Resultados	66
Discussão	83
Conclusão	93
Referências bibliográficas	93
Anexos	100
Considerações finais	119
Produção Complementar	
Sexual dimorphism in a cooperative breeding tanager (<i>Neothraupis fasciata</i> , Aves: Thraupidae) seems more complex than literature have shown: the relevance of the black mask	121

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de eventos históricos e recentes sobre a estrutura genética e o padrão filogeográfico de *Neothraupis fasciata* (Lichtenstein, 1823), uma ave endêmica do Cerrado. A tese está dividida em três capítulos: no Capítulo I apresento uma introdução geral sobre os principais temas abordados na tese; no Capítulo II foi investigada a estrutura genética populacional de *Neothraupis fasciata*; e no Capítulo III foi avaliado o padrão filogeográfico desta espécie utilizando sequências de DNA mitocondrial e do genoma nuclear. Com base nos loci microssatélites, esta espécie apresenta estrutura genética populacional moderada com, pelo menos, dois grupos genéticos distintos no Cerrado e outro composto exclusivamente pela população disjunta localizada nas savanas do Amapá. A estrutura genética encontrada nesta espécie não foi influenciada pela distância geográfica (isolamento por distância), nem pela heterogeneidade do habitat ou pela localização das populações no centro ou periferia da área de ocorrência (hipótese de centro-periferia). De forma similar, a intensa fragmentação do bioma devido às ações antrópicas também parece não ter contribuído com o padrão atual de distribuição da diversidade genética nesta espécie. Os resultados dos dados de sequências apontam que a porção sul do Cerrado seja a provável área de origem da espécie, na qual observa-se sinais genéticos de estruturação, possivelmente em decorrência da perda de adequabilidade climática entre as populações durante o início do Pleistoceno. Testes demográficos sugerem ainda um processo recente de expansão populacional, que teria contribuído tanto para o reestabelecimento do fluxo gênico entre as localidades ao sul da distribuição quanto para a colonização (ou recolonização) da porção norte do Cerrado. Sobre as conexões entre a população disjunta e o Cerrado, nossos dados suportam uma colonização recente das savanas do Amapá, possivelmente via corredor Central da Amazônia. Do ponto de vista da conservação, destacamos que a população disjunta localizada nas savanas no Amapá constitui um grupo genético distinto que merece ser considerado como uma Unidade de Manejo. Por fim, nossos resultados reforçam a ideia de que a história biogeográfica do Cerrado é complexa e que este estudo é um dos primeiros passos na tentativa de entender os eventos históricos e recentes relacionados com a diversificação da avifauna deste importante bioma da América do Sul.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the influence of historical and contemporary events on the genetic structure and phylogeography of *Neothraupis fasciata* (Lichtenstein, 1823), an endemic bird endemic of the Cerrado. This thesis is structured in three chapters: Chapter I – a general overview of the main topics discussed in the thesis; Chapter II – the analysis of the genetic structure of *Neothraupis fasciata* using a set of microsatellite *loci*; and Chapter III – a phylogeographic study of *Neothraupis fasciata* using sequences of mitochondrial DNA and nuclear genome. Based on microsatellites results, we found moderate genetic diversity and moderate population structure, with at least two genetic clusters in the main Cerrado and one composed exclusively by the disjunct population from the savannas of Amapá. The genetic structure found has not emerged under a significant influence of geographical distance, neither by habitat heterogeneity nor by the core-periphery effect. Similarly, the intense biome fragmentation by anthropic action has not contributed significantly to the current pattern of genetic structure found. Based on sequence data the southern part of the Cerrado was considered a potential center of origin of *N. fasciata*, where was also observed a historical population structure, possible delimited by the loss of habitat suitability during early Pleistocene climatic changes. The analysis of historical demography suggests a recent population expansion, that likely promoted the gene flow between the populations at the south of species' distribution and also the colonization (or recolonization) of the northern portion of the Cerrado. About the connections among the savannas of Amapá and the main Cerrado our data suggests a recent colonization of this disjunct population, possible following a central Amazonian corridor. For conservation purposes, we highlight that the disjunct population in the savannas of Amapá constitutes a genetic group and should be considered a Management Unit. Finally, our results reinforce the idea that the underlying biogeography of the Cerrado is complex, and this study is important start to understand the influence of historical and contemporary events on the diversification of Cerrado's avifauna.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL



O CERRADO

Distribuição, diversidade e conservação

As savanas sul-americanas formam um complexo vegetacional que compreende o Cerrado, os Llanos, as savanas do Escudo da Guiana e as savanas de Beni (Sarmiento 1983, Huber 1987) (Fig. 1.1). O Cerrado é a maior formação savânica na América do Sul, com uma área original estimada em aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados (Eiten 1972, Ratter *et al.* 1997, Silva & Bates 2002, Machado *et al.* 2004). Segundo a delimitação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2004), este bioma localiza-se principalmente no Planalto Central Brasileiro (Fig. 1.1). A maior parte do Cerrado ocupa uma posição central em relação às outras formações sul-americanas e ao longo de sua distribuição faz limites com a Amazônia, Caatinga, Floresta Atlântica, Chaco e Pantanal (Bigarella *et al.* 1975, Silva 1995). Desta forma, este é o bioma sul-americano que possui o maior número de contatos biogeográficos com outros biomas (Silva 1995).

O clima do Cerrado apresenta sazonalidade marcante, com uma estação seca durante o inverno no hemisfério sul (abril – setembro), precipitação entre 800 – 2.000mm durante a estação chuvosa (outubro – março) e temperatura média anual entre 18 – 28°C (Eiten 1972, Ratter *et al.* 1997). Os solos do Cerrado são predominantemente distróficos, com baixo pH e pobre em nutrientes como cálcio, magnésio, potássio e alguns micronutrientes, e com elevado nível de alumínio (Furley & Ratter 1988, Ratter *et al.* 1997). A vegetação do Cerrado varia desde fitofisionomia campestres até florestais, sendo que a vegetação típica deste bioma, cerrado *stricto sensu*, está associada aos solos bem drenados (*e.g.* Eiten 1972, Ratter *et al.* 1997).

Este bioma apresenta alta diversidade de plantas e animais, sendo que estimativas de riqueza apontam para aproximadamente 90 mil espécies de invertebrados, 10 mil espécies de plantas, 1,2 mil espécies de peixes, 837 espécies de aves e 180 espécies de anfíbios (Myers *et al.* 2000, Machado *et al.* 2004, Mittermeier *et al.* 2011). Considerando os vertebrados, podemos destacar as aves, que representam o segundo grupo mais diverso e que compreende 28 espécies endêmicas do Cerrado (Pichorim *et al.* 2014). Dentre os processos relacionados à origem e manutenção da diversidade de aves descrita para o Cerrado, Silva e Bates (2002) destacam a importância dos eventos climáticos do Quaternário. Segundo estes autores, espécies florestais devem ter contribuído para o aumento da diversidade do Cerrado durante os

períodos mais úmidos, enquanto elementos da Caatinga e do Chaco devem ter expandido em direção ao Cerrado durante os períodos mais secos ocupando áreas de florestas secas em regiões de depressões. Estas espécies oriundas de biomas vizinhos teriam conseguido estabelecer populações e persistido em enclaves florestais no Cerrado que não foram eliminados durante os eventos paleoclimáticos, como no curso de grandes rios ou em manchas de solo propício para estabelecimento de matas secas (Silva & Bates 2002, Pinheiro & Monteiro 2010).

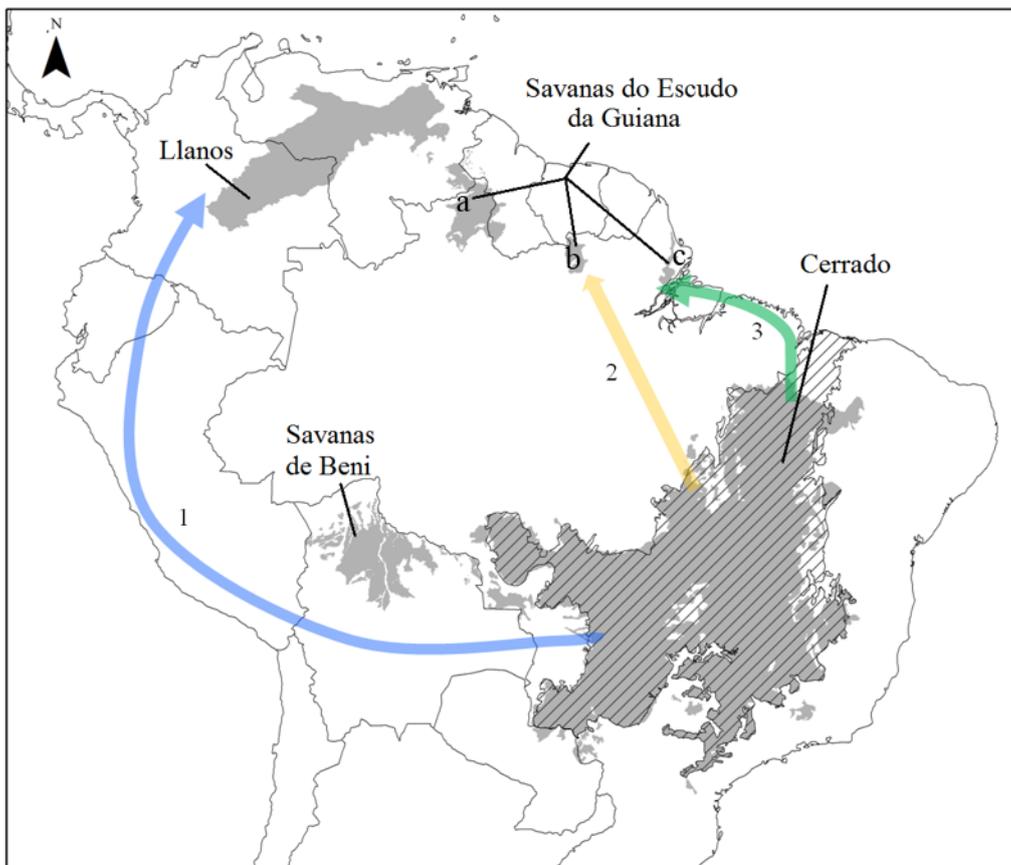


Figura 1.1. Delimitação das principais áreas de savana da América do Sul de acordo com Olson e colaboradores (2001) (área em cinza), e delimitação do Cerrado de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) (área hachurada). As rotas de conexão propostas entre as savanas ao norte e sul da floresta Amazônica são indicadas pelas setas, sendo: (1) corredor Andino, (2) corredor Central Amazônico e (3) corredor Costeiro Atlântico. Savanas do Escudo da Guiana: (a) Roraima–Rupununi, (b) Sipaliwini e (c) Amapá.

O nível de conservação do Cerrado pode ser considerado crítico e muito preocupante (Klink & Machado 2005, Sano *et al.* 2010). Esta conclusão foi feita com base nos cálculos de que a área desmatada no Cerrado até o ano de 2002 é superior à metade da sua área original (Klink & Machado 2005). A maior perda de área ocorreu no

estado de Goiás, no leste do Mato Grosso do Sul, no centro do Tocantins, no extremo oeste da Bahia e no Triângulo Mineiro. Desta forma, os remanescentes de Cerrado podem ser encontrados principalmente na porção norte da distribuição original, enquanto a porção sul foi extensivamente convertida em áreas de uso antrópico (Sano *et al.* 2010). Dentre as principais ameaças para este bioma podemos citar a abertura de áreas para formação de pastagens e a implantação de monoculturas e grandes agronegócios (Klink & Machado 2005, Sano *et al.* 2010). Segundo estimativas, os remanescentes de Cerrado somam entre 44 - 60% da cobertura original (Klink & Machado 2005, Sano *et al.* 2010), sendo que apenas 1,4% da área original do bioma fazem parte de unidades de conservação permanentes (Sano *et al.* 2010). Assim, além da alta riqueza de espécies e endemismos, o Cerrado também é um dos biomas mais ameaçados (Klink & Machado 2005, Marini & Garcia 2005), sendo considerado um *hotspot* mundial de biodiversidade (Myers *et al.* 2000, Mittermeier *et al.* 2011, Marchese 2015).

Principais eventos biogeográficos do Cerrado

A identificação dos mecanismos relacionados à diversificação da biota é essencial para compreender os padrões biogeográficos ao longo das escalas temporais e espaciais. Dentre os principais aspectos biogeográficos do Cerrado podemos destacar a influência dos eventos geológicos do Terciário e as flutuações climáticas e vegetacionais do Quaternário (*e.g.* Silva 1995, Colli 2005, Werneck *et al.* 2012a, Turchetto-Zollet *et al.* 2013). Neste contexto, os principais eventos de diversificação da herpetofauna do Cerrado estão ligados ao Terciário (Giugliano *et al.* 2007, Werneck *et al.* 2009, Maciel *et al.* 2010, Werneck *et al.* 2012b), enquanto variações intra-específicas de plantas (Ramos *et al.* 2007) e invertebrados (Moraes *et al.* 2009) do Cerrado parecem ter sido afetada principalmente pelos eventos climáticos do Quaternário.

Os principais eventos do Terciário relacionados com a diversificação da herpetofauna do Cerrado são a diferenciação climática latitudinal e formação de províncias florísticas criando uma dicotomia entre formações abertas e florestais, soergimento da cordilheira dos Andes, grande transgressão marinha do Mioceno e o soergimento do Planalto Central Brasileiro (revisado por Colli 2005). Desta forma, os eventos do Terciário levaram ao estabelecimento de novas conexões ou alteração das conexões já existentes entre as populações, influenciando os níveis de fluxo gênico e acarretando em diferentes respostas evolutivas da biota. Em relação ao Quaternário, as

oscilações climáticas tiveram grande influência sobre a distribuição das formações abertas e florestais da América do Sul, principalmente em decorrência de alterações na umidade e temperatura (Bigarella *et al.* 1975, Ribeiro & Walter 1998, Cruz Júnior *et al.* 2005). Mais especificamente, é postulado que as savanas sul-americanas tenham expandido em direção às formações florestais durante os períodos frios e secos, enquanto as formações florestais apresentaram uma contração na sua distribuição. Em contrapartida, durante os períodos de maior umidade e temperatura as formações florestais expandiram, limitando a distribuição das formações abertas (*e.g.* Bigarella *et al.* 1975, Gottsberger & Morawetz 1986, Van der Hammen & Absy 1994, Behling & Lichte 1997, Behling 2002, Haffer & Prance 2002, Ledru 2002). Registros palinológicos em Carajás e Katira indicam expansão das áreas do Cerrado em direção à Amazônia durante os períodos frios e secos entre 26 – 14 mil anos atrás (ka) (Van der Hammen & Absy 1994, Ledru 2002). Contudo, resultados encontrados por Werneck e colaboradores (2012a) apontam para um processo inverso ao esperado, com expansão das áreas abertas durante os períodos mais quentes e úmidos e retração durante os períodos mais secos e frios com base em modelagem de nicho ecológico. Embora as variações climáticas tenham sido inicialmente propostas para o Quaternário, alguns autores sugerem a influência destes eventos na diversificação da biota da América do Sul antes mesmo do Quaternário (Potts & Behrensneyer 1992, Haffer & Prance 2002).

Conexões históricas entre o Cerrado e as savanas Amazônicas

As variações climáticas do Quaternário também influenciaram a conexão entre as áreas savanas da América do Sul, que podem ser divididas em dois blocos atualmente isolados pela floresta Amazônica, sendo estes os blocos de savanas do norte e do sul. As similaridades bióticas entre estas savanas apontam que estas formações estiveram conectadas no passado (Haffer 1967, Silva 1995, Silva & Bates 2002). De acordo com Mittermeier e colaboradores (2010), as savanas Amazônicas localizadas entre os Llanos e o Cerrado apresentam influência destas duas formações, sendo o compartilhamento de espécies maior entre o Cerrado e as savanas do Amapá, Sipaliwini e Alter do Chão, enquanto os Llanos compartilham mais espécies com Roraima–Rupununi e Zanderij. A conexão entre as savanas teria se dado provavelmente em períodos secos, sendo três possíveis rotas propostas: (1) o corredor Andino, (2) o corredor Central Amazônico através da área de baixa precipitação na porção central da Amazônia e (3) o corredor Costeiro Atlântico, propiciado pela retração do nível do mar e expansão das áreas

abertas na região norte do litoral do Atlântico (revisado por Silva 1995) (Fig.1.1). Ainda de acordo com Silva (1995), dentre estas três rotas apenas o corredor Andino e o corredor Costeiro Atlântico teriam suporte nos padrões de distribuição de aves que ocupam áreas abertas, não encontrando padrão de distribuição concordante com o corredor central da Amazônia. Similarmente, Mittermeier e colaboradores (2010) e Werneck e colaboradores (2012a) encontraram evidências que suportam apenas os corredores costeiro e/ou andino. Por outro lado, a modelagem de nicho para espécies arbóreas típicas do Cerrado indica adequabilidade climática na área descrita como a região de baixa precipitação da Amazônia durante o Último Interglacial (~130ka), reforçando uma possível conexão via corredor Central Amazônico (Bueno *et al.* 2016).

MARCADORES MOLECULARES

Desde a década de 1990, o uso da abordagem genética para responder questões ecológicas e evolutivas tem se tornado mais eficiente, flexível e disseminado (Selkoe & Toonen 2006). Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis, podemos destacar dois destes que serão utilizados no presente trabalho: sequências de DNA e *locus* microssatélites. As sequências de DNA utilizadas neste trabalho podem ser divididas entre sequências de origem mitocondrial (DNA_{mt}) e as de origem nuclear (DNA_{nuc}). O DNA_{mt} apresenta genoma circular de tamanho pequeno (entre 6 e 20 mil pares de bases) e organização simples (Avise 2000), não sendo observado espessadores gênicos muitos extensos e nem íntrons. O marcador mitocondrial foi o primeiro utilizado em estudos de filogeografia, pois apresenta características importantes, como o fato de ser haplóide, herança predominantemente materna em animais, rápida taxa de evolução e taxas muito baixas de recombinação (Avise *et al.* 1987, Avise 2000).

O DNA nuclear é linear e apresenta herança biparental, taxa de evolução baixa e sistema de reparo mais eficiente, diferentemente do DNA_{mt}. O genoma nuclear apresenta tanto regiões codantes (éxons) quanto não-codantes (íntrons), sendo que os íntrons estão amplamente presentes nos genes dos eucariotos (Zhang & Hewitt 2003). O marcador nuclear utilizado neste trabalho está localizado em um íntron, sendo, portanto, considerado como um marcador neutro. Em comparação ao DNA_{mt}, os marcadores nucleares apresentam maior taxa de recombinação (Avise *et al.* 1987).

O grupo dos marcadores microssatélites pode ser definido como sequências de DNA com unidades de mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos repetidas lado a

lado (em *tandem*) e está amplamente distribuído no genoma nuclear de organismos eucariotos (Tautz & Renz 1984, Tautz & Schlötterer 1994, Selkoe & Toonen 2006). Este marcador apresenta padrão de herança codominante e, em geral, apresentam alta taxa de mutação (entre 10^{-2} e 10^{-6} mutações por *locus* por geração) (Schlötterer 2000), o que gera altos níveis de diversidade alélica (ver revisões de Selkoe & Toonen 2006, Hoshino *et al.* 2012).

MODELAGEM DE NICHOS ECOLÓGICOS

Os fatores climáticos e físicos, em certas escalas, influenciam profundamente a distribuição das espécies (Soberón & Peterson 2005). A distribuição geográfica de uma espécie é definida por suas necessidades ecológicas e tolerâncias, além de interações bióticas e características históricas (Soberón & Peterson 2005). Assim, a ecologia e a história evolutiva de uma espécie são fatores determinantes na compreensão da sua distribuição geográfica, podendo a área de distribuição de uma espécie ser definida por diferentes fatores que compõem seu nicho ecológico fundamental (Peterson 2001). Este conceito de nicho baseia-se na soma de todos os fatores ambientais que agem sobre uma espécie, sendo definido como uma região de um hiper-espaço n -dimensional (Hutchinson 1957).

O princípio da modelagem do nicho ecológico de uma espécie leva em consideração a sua distribuição conhecida, refletindo suas preferências ecológicas (Peterson 2001). A abordagem baseada no uso de modelos de distribuição de espécies utiliza a relação entre os pontos de ocorrência conhecidos e as características ambientais e/ou espaciais destes pontos (Franklin 2009). Assim, esta abordagem identifica as diferentes características climáticas relacionadas à sobrevivência de uma espécie e seus possíveis efeitos sobre a distribuição geográfica em diversos cenários históricos. A modelagem de nicho ecológico tem sido amplamente utilizada em diversas áreas, como a biogeografia, a biologia da conservação e a ecologia (Elith & Leathwick 2009, Elith *et al.* 2011). Atualmente, alguns estudos tem integrado a abordagem baseada na modelagem de nicho ecológico à metodologias utilizando dados genéticos para definir unidades de conservação (*e.g.* Gebremedhin *et al.* 2009, May *et al.* 2011), avaliar cenários biogeográficos (*e.g.* Knowles *et al.* 2007), testar a influência das áreas estáveis na diversidade genética (Hewitt 2004, Carnaval *et al.* 2009) e delimitar espécies (*e.g.* Rissler & Apodaca 2007).

CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE ALVO

Neothraupis fasciata (Lichtenstein, 1823) é uma espécie de ave pertencente à ordem Passeriformes e família Thraupidae, sendo a única representante do seu gênero. Também conhecida por tiê-do-cerrado e cigarrinha-do-campo, está distribuída nas savanas da América do Sul, com ocorrência entre as regiões sul do Maranhão e Piauí, sul de Minas Gerais, norte de São Paulo e oeste do Mato Grosso, leste da Bolívia, nordeste do Paraguai e nas Savanas do Escudo da Guiana (Ridgely & Tudor 1989) (Fig. 1.2). De forma geral, vive em altitudes entre 500 e 1.100 metros e habita as fitofisionomias abertas do Cerrado, como campo sujo e o cerrado *stricto sensu* (Alves 1991, Ridgely & Tudor 1989, Sick 2001).

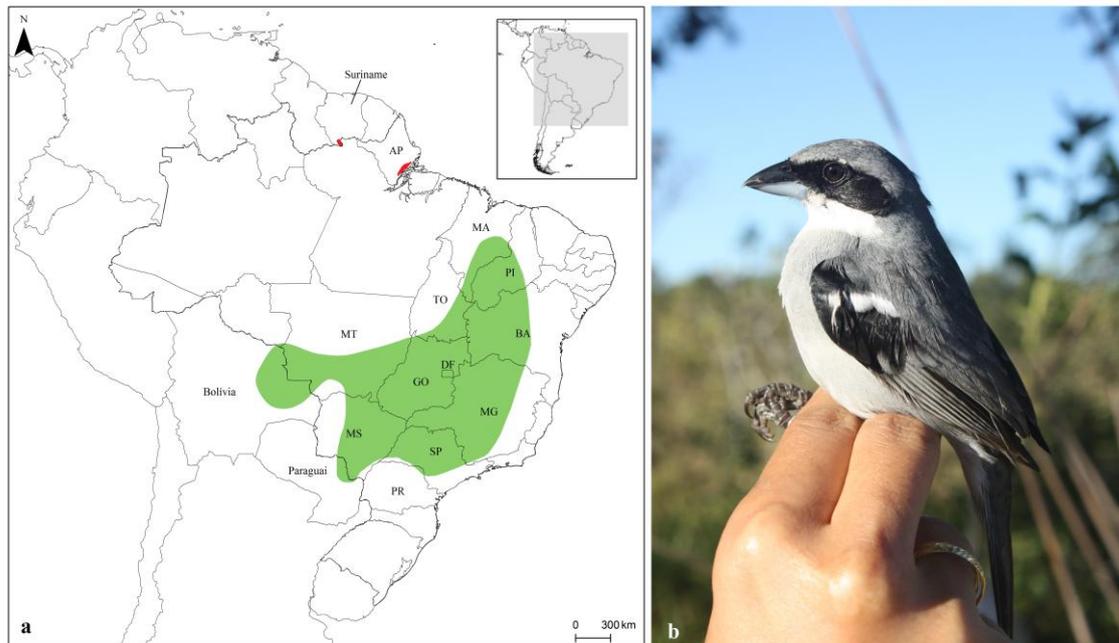


Figura 1.2. Distribuição geográfica (a) de *Neothraupis fasciata* (b). Em verde a distribuição de acordo com a Birdlife International e NatureServe (2014) e em vermelho complementação da distribuição com base nas populações disjuntas no Suriname e nas Savanas do Amapá. As siglas indicam as unidades federativas do Brasil: AP – Amapá; BA – Bahia; DF – Distrito Federal; GO – Goiás; MA – Maranhão; MG – Minas Gerais; MS – Mato Grosso do Sul; MT – Mato Grosso; PI – Piauí; PR – Paraná; SP – São Paulo; e TO – Tocantins.

Esta espécie é considerada endêmica do Cerrado (Pichorim *et al.* 2014) e, desde 2004, é considerada quase ameaçada (*near threatened*), uma vez que é geralmente escassa na sua área de distribuição e apresenta declínio moderadamente rápido em resposta à perda e degradação de habitat (IUCN 2013). De acordo com Tubelis e

Cavalcanti (2000), a abundância de *N. fasciata* é maior em ambientes mais complexos, não sendo encontrada em áreas de pastagens. Este aspecto pode estar relacionado com a dependência da espécie pelo estrato arbustivo, no qual forrageia e nidifica (Alves 1991, Alves 1990).

A dieta do tiê-do-cerrado é considerada generalista, sendo constituída principalmente por frutos e gramíneas durante a estação seca e por insetos e frutos durante a estação chuvosa (Alves 1991). Durante a estação chuvosa, observa-se aumento na disponibilidade de insetos e frutos e, assim como para outros Passeriformes insetívoros do Cerrado, é a época mais propícia para a reprodução desta espécie (Alves & Cavalcanti 1990). *Neothraupis fasciata* é uma espécie de reprodução cooperativa facultativa, residente e territorialista (Alves & Cavalcanti 1990, Alves 1990). Os territórios de cada casal social são bem definidos e defendidos o ano todo, sendo que no caso de casais que são ajudados, a defesa de território é feita por grupos monoespecíficos de 3-6 indivíduos. Assim, cada grupo é formado pelo casal social, aparentemente monogâmico, e pelos ajudantes (Alves 1991, Alves 1990).

OBJETIVOS

Nos capítulos subsequentes apresento os estudos que tiveram por objetivo identificar os eventos históricos e recentes relacionados com o padrão filogeográfico e estrutura genética desta espécie de ave endêmica do Cerrado. Especificamente, o objetivo principal do Capítulo II foi investigar a estrutura genética de *Neothraupis fasciata* e testar diferentes hipóteses sobre os processos que podem ter influenciado a distribuição espacial da variabilidade genética desta espécie com base em marcadores microsatélites. Nosso objetivo também foi avaliar se existem diferenças genéticas entre a população disjunta que ocorre nas savanas do Amapá e as outras localidades amostradas no Cerrado. Assim, as seguintes hipóteses foram avaliadas: 1) isolamento por distância; 2) heterogeneidade do habitat; 3) fragmentação do habitat; e 4) centro-periferia. Por fim, discutimos as implicações de nossos resultados em relação à biogeografia do Cerrado e para esforços de conservação. De forma complementar, o Capítulo III teve como objetivo o estudo filogeográfico da espécie alvo e o teste de diferentes hipóteses que podem estar relacionadas com a diferenciação intra-específica do tiê-do-cerrado. Com base em um conjunto de dados composto por sequências de DNA mitocondrial e do genoma nuclear e na modelagem de nicho ecológico para a

espécie, avaliamos: (1) isolamento por distância; 2) a influência das flutuações climáticas do Quaternário na distribuição das áreas adequadas para a espécie e seus efeitos na sua história demográfica; (3) a hipótese de estabilidade climática como um preditor da diversidade genética das populações; e (4) a possível rota de conexão entre o Cerrado e as savanas Amazônicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, M.A.S. 1990. Social system and helping behavior in the White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*). *The Condor*, 92(2): 470–474.
- Alves, M.A.S. 1991. Dieta e táticas de forrageamento de *Neothraupis fasciata* em cerrado no Distrito Federal, Brasil (Passeriformes: Emberizidae). *Ararajuba*, 2: 25–29.
- Alves, M.A.S., & Cavalcanti, R.B. 1990. Ninhos, ovos e crescimento de filhotes de *Neothraupis fasciata*. *Ararajuba*, 1: 91–94.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. p. 447. Cambridge: Harvard University Press.
- Avice, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522.
- Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: A synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 177: 19–27.
- Behling, H., & Lichte, M. 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research*, 48: 248–358.
- Bigarella, J.J., Andrade, D., & Riehs, P.J. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Simpósio Internacional sobre o Quaternário*, 47: 411–464.
- Birdlife International, & NatureServe. 2014. Bird species distribution maps of the world. *The IUCN Red List of Threatened Species* Version 2015-3.
- Bueno, M.L., Pennington, R.T., Dexter, K.G., Kamino, L.H.Y., Pontara, V., Neves, D.M., Ratter, J.A., & Oliveira-Filho, A.T. 2016. Effects of Quaternary climatic fluctuations on the distribution of Neotropical savanna tree species. *Ecography*, 39: 001–012.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., & Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, 323: 785–789.
- Colli, G.R., 2005. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. In: Scariot, A., Sousa-Silva, J.C., Felfili, J.M. (Eds.), *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Distrito Federal. pp. 249–264.
- Cruz Jr., F.W., Burns, S.J., Karmann, I., Sharp, W.D., Vuille, M., Cardoso, A.O., Ferrari, J.A., Dias, P.L.S., & Viana Jr, O. 2005. Insolation-drive changes in atmospheric circulation over the past 116,000 years in subtropical Brazil. *Nature*, 434(7029): 63–65.

- Eiten, G. 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, 38(2): 201–340.
- Elith, J., & Leathwick, J.R. 2009. Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1): 677–697.
- Elith, J., Phillips, S.J., Hastie, T., Dudík, M., Chee, Y.E., & Yates, C.J. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*, 17(1): 43–57.
- Franklin, J. 2009. Mapping species distributions: Spatial inference and prediction. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Furley, P., & Ratter, J. 1988. Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. *Journal of Biogeography*, 15: 97–108.
- Gebremedhin, B., Ficitola, G.F., Naderi, S., Rezaei, H.R., Maudet, C., Rioux, D., Luikart, G., Flagstad, Ø., Thuiller, W., & Taberlet, P. 2009. Combining genetic and ecological data to assess the conservation status of the endangered Ethiopian walia ibex. *Animal Conservation*, 12(2): 89–100.
- Giugliano, L.G., Collevatti, R.G., & Colli, G.R. 2007. Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 168–179.
- Gottsberger, G., & Morawetz, W. 1986. Floristic, structural and phytogeographical analysis of the savannas of Humaitá (Amazonas). *Flora*, 178: 41–71.
- Haffer, J. 1967. Notas zoogeográficas sobre las avifaunas de las regiones no forestadas de Sudamérica noroccidental. *El Hornero*, 10: 315–333.
- Haffer, J., & Prance, G.T. 2002. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: Sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. *Estudos Avançados*, 16(46): 175–206.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 359: 183–195.
- Hoshino, A.A., Bravo, J.P., Nobile, P.M., & Morelli, K.A. 2012. Genetic Diversity in Microorganisms. In: Caliskan, M. (Ed.), *Genetic Diversity in Microorganisms*. InTech Published. Retrieved from InTech.
- Huber, O. 1987. Neotropical savannas: Their flora and vegetation. *Tree*, 2: 67–71.
- Hutchinson, G. E. 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22: 415–427.
- IBGE. 2004. Mapas de biomas do Brasil. Disponível em: ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas_interativos/
- IUCN. 2013. In IUCN 2013 (Ed.), *IUCN Red List of Threatened Species*. (2013.1 ed.). <www.iucnredlist.org>.
- Klink, C.A., & Machado, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1(1): 147–155.
- Knowles, L.L., Carstens, B.C., & Keat, M.L. 2007. Coupling genetic and ecological- niche models to examine how past population distributions contribute to divergence. *Current Biology*, 17: 940–946.
- Ledru, M.P. 2002. Late Quaternary history and evolution of the Cerrados as revealed by palynological records. In: Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, New York. pp. 33–50.
- Machado, R.B., Neto, M.B.R., Pereira, P.G.P., Caldas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K., & Steininger, M. (2004). *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro*. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.

- Maciel, N.M., Collevatti, R.G., Colli, G.R., & Schwartz, E.F. 2010. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 787–797.
- Marchese, C. 2015. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation*, 3: 297–309.
- Marini, M.Â., & Garcia, F.I. 2005. Conservação de aves no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1): 95–102.
- May, S.E., Medley, K.A., Johnson, S.A., & Hoffman, E.A. 2011. Combining genetic structure and ecological niche modeling to establish units of conservation: A case study of an imperiled salamander. *Biological Conservation*, 144(5): 1441–1450.
- Mittermeier, J.C., Zyskowski, K., Stowe, E.S., & Lai, J.E. 2010. Avifauna of the Sipaliwini Savanna (Suriname) with insights into its biogeographic affinities. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 51: 97–122.
- Mittermeier, R.A., Turner, W.R., Larsen, F.W., Brooks, T.M., & Gascon, C. 2011. Global biodiversity conservation: The critical role of hotspots. In: Zachos, F.E., Habel, J.C. (Eds.), *Biodiversity hotspots: Distribution and protection of priority conservation areas*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3–22. pp. 3–22.
- MMA. 2007. *Biodiversidade do Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação* (Série Biodiversidade, p. 540). Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Moraes, E.M., Yotoko, K.S.C., Manfrin, M.H., Solferini, V.N., & Sene, F.M. 2009. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: Demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, 36: 2136–2147.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A., & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853–858.
- Olson, D.M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E.D., Burgess, N.D., Powell, G.V.N., Underwood, E.C., D’Amico, J.A., Itoua, T., Strand, H.E., Morrison, J.C., Loucks, C.J., Allnutt, T.F., Ricketts, T.H., Kura, Y., Lamoreux, J.F., Wettengel, W.W., Hedao, P., Kassem, K.R. 2001. Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on earth. *BioScience*, 51(11): 933–938.
- Peterson, A.T. 2001. Predicting species’ geographic distributions based on ecological niche modeling. *The Condor*, 103(3): 599–605.
- Pichorim, M., Silva, M., França, B.R.A., Oliveira-Júnior, T.M., Rodrigues, M.C. 2014. A cerrado bird community in the northernmost portion of northeastern Brazil - recommendations for conservation. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 22(4): 347–362.
- Pinheiro, M.H.O., & Monteiro, R. 2010. Contribution to the discussions on the origin of the cerrado biome: Brazilian savanna. *Brazilian Journal of Biology*, 70(1): 95–102.
- Potts, R., & Behrensmeyer, A.K. 1992. Late Cainozoic terrestrial ecosystems. In: Behrensmeyer, A.K., Damuth, J.D., DiMichele, W.A., Potts, R., Sues, H.D., & Wing, S.L. (Eds.), *Terrestrial ecosystems through time: Evolutionary paleoecology of terrestrial plants and animals*. University of Chicago Press, Chicago. pp. 419–541
- Ramos, A.C.S., Lemos-Filho, J.P., Ribeiro, R.A., Santos, F.R., Lovato, M.B. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany*, 100: 1219–1228.

- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F., & Bridgewater, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, 80: 223–230.
- Ribeiro, J.F., & Walter, B.M.T. 1998. Fitofisionomia do bioma cerrado: Os biomas do Brasil. In: Sano, S.M., Almeida, S.P. (Ed), *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: Embrapa/CPAC. pp. 89–116.
- Ridgely, R.S., & Tudor, G. 1989. *The birds of South America. Vol 1, The Oscine Passerines*. Austin: University of Texas Press.
- Rissler, L.J., & Apodaca, J.J. 2007. Adding more ecology into species delimitation: Ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, 56(6): 924–942.
- Sano, E.E., Rosa, R., Brito, J.L.S., & Ferreira, L.G. 2010. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 166: 113–124.
- Sarmiento, G. 1983, The savannas of tropical America. In: Goodall, D.W. (ed.), *Ecosystems of the world – tropical savannas*. Elsevier, Amsterdam.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6): 365–371.
- Selkoe, K.A., & Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5): 615–629.
- Sick, H. 2001. *Ornitologia Brasileira* (Edição revisada). Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira.
- Silva, J. 1995. Biogeographic analysis of the South American Cerrado avifauna. *Steenstrupia*, 21: 49–67.
- Silva, J.M.C., & Bates, J.M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna hotspot. *BioScience*, 52(3): 225 – 233.
- Soberón, J., & Peterson, A.T. 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches an species' distributional areas. *Biodiversity Informatics*, 2: 1–10.
- Tautz, D., & Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10): 4127–4138.
- Tautz, D., & Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*, 4(6): 832–837.
- Tubelis, D.P., & Cavalcanti, R.B. 2000. A comparison of bird communities in natural and disturbed non-wetland open habitats in the Cerrado's central region, Brazil. *Bird Conservation International*, 10: 331–350.
- Turchetto-Zollet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22: 1193–1213.
- Van der Hammen, T., & Absy, M.L. 1994. Amazonia during the last glacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 109: 247–261.
- Werneck, F.P., Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., & Sites Jr, J.W. 2012b. Deep diversification and long-term persistence in the South American 'Dry Diagonal': Integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of Geckos. *Evolution*, 66(10): 3014–3034.
- Werneck, F.P., Giugliano, L.G., Collevatti, R.G., & Colli, G.R. 2009. Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Molecular Ecology*, 18: 262–278.
- Werneck, F.P., Nogueira, C., Colli, G.R., Sites Jr, J.W., & Costa, G.C. 2012a. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of

- South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography*, 39: 1695–1706.
- Zhang, D.X., & Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3): 563–584.

CAPÍTULO II

ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DO TIÊ-DO-CERRADO (*NEOTHRAUPIS FASCIATA*, AVES: THRAUPIDAE) NA PAISAGEM HETEROGÊNEA E FRAGMENTADA DAS SAVANAS BRASILEIRAS



RESUMO

A compreensão da estrutura genética de uma espécie é uma questão crucial em estudos de biologia evolutiva e relevante para os propósitos de conservação. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar a estrutura genética de *Neothraupis fasciata* e avaliar a diferenciação genética da população disjunta localizada nas savanas do Amapá. Para tal, foi avaliada a estrutura populacional em relação a variáveis da paisagem como isolamento por distância (IBD) e heterogeneidade do habitat, além da influência de fatores como a fragmentação do habitat ou proximidade do centro da distribuição da espécie na diversidade genética amostrada. Os dados são provenientes de um conjunto de *loci* microssatélites de indivíduos amostrados em nove localidades distintas, compreendendo uma ampla cobertura da distribuição desta espécie ao longo do Cerrado e também de uma população disjunta nas savanas do Amapá. Foram estimados índices de diversidade genética e identificada a estrutura genética empregando o método de agrupamento hierárquico e duas abordagens bayesianas. A hipótese de IBD foi testada utilizando o teste de Mantel, enquanto a heterogeneidade do habitat foi avaliada contrastando a estrutura esperada de acordo com as províncias biogeográficas descritas por Ratter e a estrutura encontrada no teste de agrupamento e nas análises bayesianas. Para avaliar a influência da fragmentação do habitat e a hipótese centro-periferia na riqueza alélica e heterozigosidade esperada nós utilizamos o teste Kruskal-Wallis. *Neothraupis fasciata* apresentou estrutura genética populacional moderada com pelo menos dois grupos genéticos distintos no Cerrado e outro composto exclusivamente pela população disjunta. A estrutura genética encontrada em *N. fasciata* ao longo do Cerrado não foi significativamente influenciada pela distância geográfica, nem pela heterogeneidade do habitat ou efeito da hipótese de centro-periferia. De forma similar, a intensa fragmentação do bioma devido às ações antrópicas também não parece ter contribuído com o padrão atual de distribuição genética encontrado. Assim, nossos resultados sugerem que a população disjunta deve ser considerada como uma Unidade de Manejo, merecendo atenção especial para sua conservação. Ainda, a estrutura genética de *N. fasciata* não foi explicada pelas hipóteses avaliadas, reforçando a idéia de que os fatores biogeográficos que moldaram a diversidade do Cerrado são complexos e que estudos envolvendo outros aspectos históricos e geográficos são necessários para elucidar a origem e a diversificação desta espécie.

INTRODUÇÃO

A estrutura genética de populações naturais tem atraído a atenção de pesquisadores desde o estabelecimento dos fundamentos da genética de populações (*e.g.* Fisher 1930, Wright 1931). Pesquisadores da área de genética de populações tem tentado entender a distribuição espacial e temporal da diversidade alélica sob a influência de processos microevolutivos, como a deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (Barrowclough 1980, Winker *et al.* 2000). Atributos da paisagem podem exercer influência sobre estes processos microevolutivos, resultando em diferenciação genética em vários níveis (Manel *et al.* 2003, Storfer *et al.* 2010). Entender os padrões que emergem desta interação é o maior foco da área do conhecimento denominada genética da paisagem (Manel *et al.* 2003) e tem implicações diretas nas áreas da ecologia, evolução e biologia da conservação (Manel *et al.* 2003, Segelbacher *et al.* 2010). O número de estudos sobre a genética da paisagem tem aumentado nas últimas duas décadas, mas poucos tem sido conduzidos na América do Sul (Storfer *et al.* 2010). Esta lacuna é ainda maior no Cerrado, a maior savana da América do Sul e com a maior riqueza de espécies no mundo (Eiten 1972, Silva 1995, Myers *et al.* 2000, Klink & Machado 2005).

O "domínio morfoclimático dos Cerrados" delimitado por Ab'Sáber (1977, 1983, 2003) ocupava originalmente uma área de aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados e está localizado no Brasil central, estendendo ao nordeste do Paraguai e oeste da Bolívia (Silva 1995, 1997, Klink & Machado 2005). Este bioma também ocupa uma posição central em relação à outros biomas florestais sul-americanos (Silva 1995, 1997, Klink & Machado 2005, Ratter *et al.* 2003) e apresenta uma paisagem heterogênea formada por um mosaico de fitofisionomias, variando desde campos naturais até florestas de galeria (Eiten 1972). Além do Cerrado, também existem outras formações savânicas na América do sul, como os Llanos, as savanas de Beni e os fragmentos disjuntos de savana Amazônica localizados nos estados brasileiros do Pará, Amapá e Roraima (Silva 1997, Ratter *et al.* 2003).

Existem diversos atributos da paisagem que podem ter contribuído para moldar a estrutura genética da biota do Cerrado, como por exemplo a ampla área ocupada originalmente por este bioma. A grande extensão desta savana pode ter favorecido um cenário de isolamento por distância (IBD) para algumas espécies, que pode ser caracterizado como um padrão de variação na distância genética em função da distância geográfica (Wright 1943, Jenkins *et al.* 2010). O IBD é esperado em espécies com

capacidade de dispersão limitada, considerando-se paisagens homogêneas, e quando o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva é atingido. Em contrapartida, paisagens heterogêneas podem afetar o potencial de dispersão de determinada espécie e causar desvios da hipótese de IBD (Coulon *et al.* 2004). Para espécies com distribuição ampla, também se espera que a diversidade genética possa variar entre populações periféricas e centrais. Para populações localizadas próximo ao centro da distribuição da espécie são esperadas condições ambientais mais favoráveis, podendo abrigar populações maiores e menos fragmentadas, além de menos isoladas e menos endogâmicas do que populações periféricas (Carson 1959, Lawton 1993). Estas características podem ser expressas em termos genéticos, sendo predita maior diversidade genética nas áreas centrais da distribuição da espécie devido ao maior tamanho efetivo populacional e fluxo gênico, decrescendo em direção às áreas periféricas (revisado por Eckert *et al.* 2008). Dentre os poucos estudos disponíveis para o Cerrado, foi encontrado suporte tanto para a hipótese de IBD quanto para distribuição centro-periferia utilizando a espécie de lagarto *Micrablepharus atticolus* como modelo (Santos *et al.* 2014).

De forma geral, a variação ambiental pode afetar diretamente a resposta fenotípica ao ambiente, resultando em um viés na distribuição da diversidade genética (revisado por Pamilo 1988). Além disto, a variação ambiental também pode influenciar a demografia e o fluxo gênico entre populações, afetando processos estocásticos que modelam a diversidade genética (Pamilo 1988). Variação regional na vegetação dentro do Cerrado foi investigada por Ratter e colaboradores (2003), resultado no estabelecimento de pelo menos seis províncias fitogeográficas ao longo do bioma. Estas províncias foram definidas com base nos padrões florísticos do Cerrado, refletindo um cenário de maior similaridade dentro de cada província do que entre províncias diferentes. Com base neste cenário, a heterogeneidade de habitat deve ser menor dentro de cada província. Assim, seria esperado que níveis maiores de fluxo gênico fossem encontrados entre indivíduos dentro da mesma província do que entre indivíduos de províncias diferentes, o que poderia resultar na estrutura populacional seguindo os limites das províncias. Por exemplo, as províncias fitogeográficas foram descritas como um importante aspecto da paisagem para entender a estrutura genética de *Dalbergia miscolobium*, uma espécie de árvore endêmica do Cerrado (Novaes *et al.* 2013).

A heterogeneidade do habitat pode ainda ser resultado da perda da cobertura da vegetação natural e da fragmentação, sendo a matriz um importante fator na determinação da ocupação e persistência de espécies ao longo da paisagem (Storfer *et*

al. 2010, Prugh *et al.* 2008). Como possível resposta às alterações dos habitats naturais populações remanescentes podem passar a apresentar distribuição fragmentada em demes pequenos e/ou isolados na paisagem, o que poderia acarretar na perda de diversidade genética e trazer implicações para os processos evolutivos aos quais cada população está sujeita (*e.g.* Harrisson *et al.* 2012). Assim, a fragmentação do habitat por origem antrópica pode acarretar na redução do fluxo gênico ou aumento dos efeitos da deriva e endogamia em fragmentos pequenos (Frankham 2005, Frankham *et al.* 2009). Desde a década de 1970, mudanças antrópicas na paisagem do Cerrado aumentaram rapidamente em função do estabelecimento de pastagens exóticas e áreas de cultivo permanente e se concentraram inicialmente na porção sul do bioma (Klink & Machado 2005, Sano *et al.* 2010). Assim, o processo de fragmentação do Cerrado seguiu o sentido sul para norte e, embora a vegetação natural ainda cubra cerca de metade da área original do bioma, mais de 80% da porção sul do Cerrado foi perdida, contrastando com cerca de 10% de perda de habitat na porção norte (Klink & Machado 2005, Sano *et al.* 2010).

Apesar da relevância e alta biodiversidade do Cerrado, a bibliografia sobre a estrutura genética de sua fauna ainda é incipiente, sendo poucos estudos conduzidos com sapos (Telles *et al.* 2007, Prado *et al.* 2012) e lagartos (Gamble *et al.* 2012, Guarnizo *et al.* 2016, Santos *et al.* 2014). Considerando as aves, podemos citar o estudo realizado por Bates e colaboradores (2003), que avaliou a diferenciação genética de duas populações de aves localizadas em dois extremos do Cerrado. Desta forma, existe uma clara falta de conhecimento sobre quais processos teriam influenciado a estrutura genética da avifauna do Cerrado. Neste sentido, estudos focando em espécies com uma distribuição ampla e concordante com este bioma, como por exemplo algumas espécies endêmicas, poderiam auxiliar na compreensão de como elementos da paisagem e a perda de habitat podem ter influenciado na estrutura genética de populações naturais nesta savana.

Um bom modelo para este tipo de estudo é o tiê-do-cerrado, *Neothraupis fasciata*, uma ave monotípica da família Thraupidae e uma das 28 espécies de aves endêmicas do Cerrado (Cracraft 1985, Pichorim *et al.* 2014). Este traupídeo está amplamente distribuído ao longo do Cerrado e também possui populações disjuntas localizadas nas savanas Amazônicas, ocorrendo em altitudes entre 500 e 1.000 metros e em vegetações abertas, como campo sujo e cerrado *stricto sensu* (Sick 1984, Alves 1991, Mittermeier *et al.* 2010). Esta espécie não ocorre em áreas muito alteradas uma

vez que é dependente do estrato arbustivo (Tubelis & Cavalcanti 2000) no qual ela forrageia e constrói seus ninhos (Sick 1984, Alves 1990, Alves & Cavalcanti 1990). Por fim, o tiê-do-cerrado é uma ave residente e territorial (Alves 1990, Manica & Marini 2012, Duca & Marini 2014) que apresenta baixo potencial de dispersão, com uma distância média de 200 metros da área natal (Duca & Marini 2014).

Neste estudo foi utilizado um conjunto de marcadores microssatélites para investigar a estrutura genética de *Neothraupis fasciata* e testar diferentes hipóteses sobre os processos que podem ter influenciado a distribuição espacial da variabilidade genética desta espécie. Nosso objetivo também foi avaliar se existem diferenças genéticas entre a população disjunta que ocorre nas savanas do Amapá e as outras localidades amostradas no Cerrado. Assim, as seguintes hipóteses foram avaliadas: 1) isolamento por distância: considerando o baixo potencial de dispersão de *N. fasciata* é esperado o aumento da distância genética em função do aumento da distância geográfica entre as localidades; 2) Províncias fitogeográficas: considerando que a heterogeneidade de habitat pode ser um elemento importante para determinar os níveis de fluxo gênico entre as populações, é esperada uma congruência entre a estrutura genética apresentada por *N. fasciata* e os limites das províncias fitogeográficas do Cerrado; 3) fragmentação do habitat: considerando que o Cerrado tem passado por um intenso processo de fragmentação seguindo o sentido sul para norte, é esperado que as populações localizadas ao sul do Cerrado (fragmentadas) devam apresentar menor diversidade genética do que as populações situadas na porção norte do Cerrado (não fragmentadas); e 4) centro-periferia: tendo como base o pressuposto de menor tamanho efetivo populacional e menor fluxo gênico entre as populações periféricas, é esperada uma maior diversidade genética nas populações localizadas próximas ao centro da distribuição da espécie. Por fim, discutimos as implicações de nossos resultados em relação à biogeografia do Cerrado e para esforços de conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Entre 2011 e 2014 amostras de sangue ou tecido de *Neothraupis fasciata* foram coletadas em nove localidades distintas cobrindo grande parte da distribuição desta espécie (Fig. 2.1, Tabela 2.1). A maior parte das localidades amostradas fazem parte de unidades de conservação (Parques Nacionais ou Estações Ecológicas) nas quais ainda é

possível encontrar cerrado *stricto sensu*, habitat preferencial da espécie alvo (Sick 1984, Alves 1991, Ridgely & Tudor 1989). As localidades amostradas foram: Área de Proteção Ambiental das Bacias do Gama e Cabeça de Veado (AGCV), Estação Ecológica de Águas Emendadas (EEAE), Fazenda Experimental da Embrapa Macapá (MACA), Parque Nacional Chapada dos Guimarães (PNCG), Parque Nacional Serra da Canastra (PNSC), Parque Nacional das Emas (PNEM), Parque Nacional Grande Sertão Veredas (PGSV) e Ponte Alta do Tocantins (PATO) e Uruçuí (URUC). Em duas das localidades amostradas (PATO e URUC) as amostras foram obtidas nos arredores de unidades de conservação. Ainda, estas áreas estão localizadas na porção do Cerrado onde o nível de fragmentação do habitat é relativamente baixo (Sano *et al.* 2010) (ver Fig. 2.1). MACA está localizada nas savanas do Amapá, que se estendem por aproximadamente 900 mil hectares e é composta por um estrato herbáceo dominado por espécies de capins, por um estrato arbóreo com 3-10 metros de altura e florestas de galeria com mais de 25 metros de altura localizadas nos vales (Silva 1997).

A captura dos indivíduos foi realizada utilizando redes de neblina e *playback* para atrair os indivíduos para a rede. Amostras de sangue foram obtidas de cada indivíduo pela punção da veia braquial utilizando uma agulha e o material coletado utilizando tubos capilares estéreis. O material coletado foi armazenado em etanol absoluto e mantido à -20 °C após a chegada no Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília. Em relação à URUC, amostras de tecido preservadas em etanol foram gentilmente emprestadas pelo Museu Paraense Emilio Goeldi. O nível de ossificação craniana foi utilizado para classificar os indivíduos entre jovens e adultos (Cemave 1994, Roos 2010). Indivíduos com ossificação craniana incompleta foram classificados como jovens, enquanto aqueles com ossificação completa foram classificados como adultos. Para as amostras provenientes de museu foi utilizada a informação obtida junto ao curador da coleção.

Todo o trabalho foi conduzido sob a aprovação da Comissão de Ética da Universidade de Brasília (UnBDoc n° 75111/2013) e as autorizações de captura foram emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO n° 27682-1). Todos os indivíduos capturados foram marcados com anilhas metálicas cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE) e em seguida soltos no local de captura.

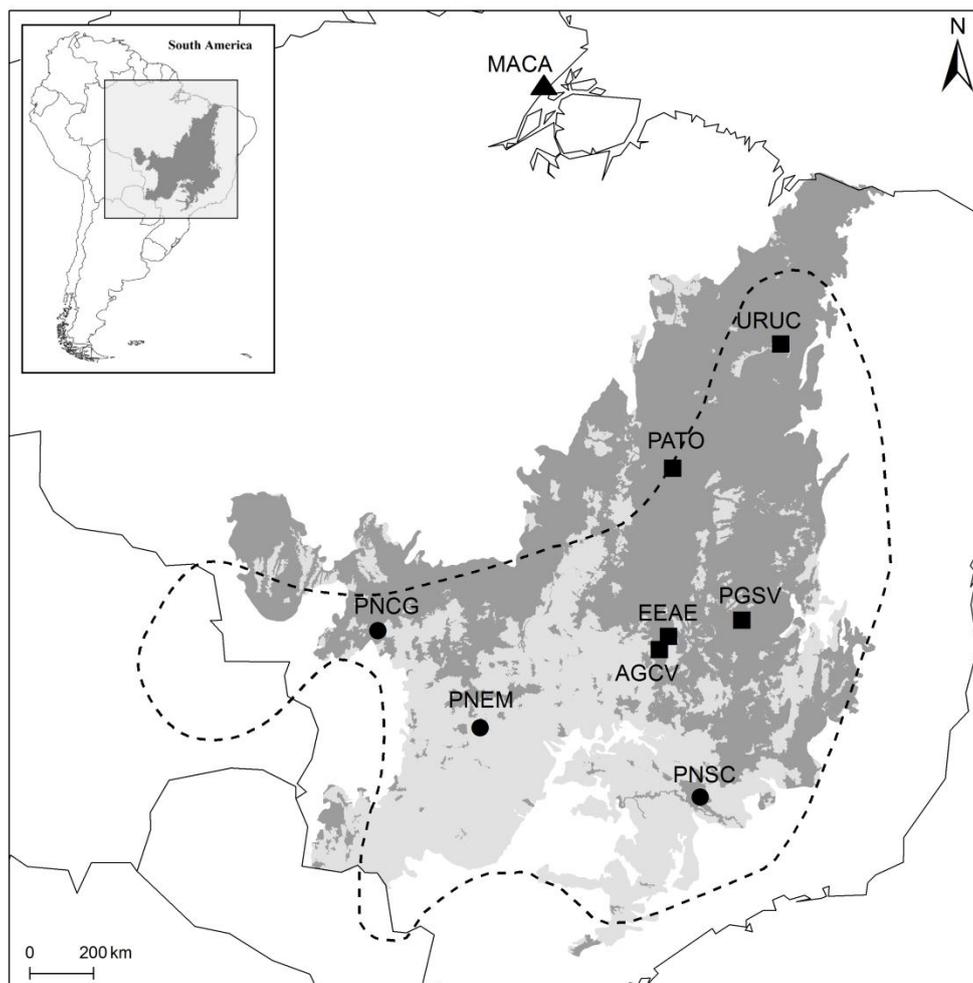


Figura 2.1. Área de distribuição de *Neothraupis fasciata* (linha tracejada) e locais de captura no Cerrado e savanas do Amapá. Em cinza escuro as áreas remanescentes do Cerrado e em cinza claro as áreas de Cerrado já fragmentadas de acordo com o MMA (2007). As localidades estão inseridas na matriz fragmentada (círculos pretos) e não-fragmentada (quadrado preto) de acordo com a cobertura da vegetação remanescente do Cerrado. A linha tracejada indica os limites da distribuição da espécie de acordo com a BirdLife International e NatureServe (2014). Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Extração do DNA total e obtenção dos genótipos

O DNA total de 118 indivíduos adultos de *N. fasciata* foi isolado utilizando o procedimento padrão de digestão com proteinase K seguida de purificação com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação em etanol absoluto (Bruford *et al.* 1992). As oito amostras de tecidos provenientes de museu foram extraídas utilizando o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen) e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Tabela 2.1. Locais de captura de *Neothraupis fasciata* ao longo da distribuição da espécie. São indicados o local de captura, a sigla da localidade, suas coordenadas geográficas e o número de indivíduos amostrados em cada uma das áreas.

Localidade	Sigla	Latitude	Longitude	N
Área de Proteção Ambiental Gama e Cabeça de Veado	AGCV	15°56'S	47°51'W	30
Estação Ecológica de Águas Emendadas	EEAE	15°33'S	47°36'W	07
Campo Experimental da Embrapa Cerrado	MACA	00°23'N	51°03'W	09
Ponte Alta do Tocantins	PATO	10°45'S	47°30'W	18
Parque Nacional da Chapada dos Guimarães	PNCG	15°24'S	55°49'W	10
Parque Nacional das Emas	PNEM	17°55'S	52°58'W	10
Parque Nacional Grande Sertão Veredas	PGSV	15°18'S	45°37'W	27
Parque Nacional Serra da Canastra	PNSC	20°20'S	46°38'W	07
Uruçuí	URUC	08°30'S	44°59'W	08

Um total de nove marcadores microssatélites polimórficos (NF0304, NF0506, NF1112, NF1314, NF1516, NF1920, NF2122, NF2526 e NF2930), desenvolvidos para o tiê-do-cerrado por Corrêa e colaboradores (Corrêa *et al.* 2010), foram amplificados e usados para obtenção dos genótipos dos 126 indivíduos amostrados. As reações de amplificação foram realizadas via reação em cadeia da polimerase utilizando as condições descritas por Corrêa e colaboradores (2010). O sucesso da amplificação e a qualidade dos produtos obtidos foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1,2% e visualização sob transiluminador de luz ultravioleta. Após essa verificação os produtos da PCR foram enviados para análise em sequenciador automatic ABI PRISM 3130 da Applied Biosystems na Universidade Católica de Brasília. O tamanho dos alelos foi determinado utilizando o programa GENEIOUS 6.1.6 (Biomatters), sendo empregado o marcador de tamanho 500 ROXTM (Applied Biosystems) como referência.

Estimativas de diversidade genética

O desequilíbrio de ligação entre todos os pares de *loci* foi testado utilizando o teste exato para desequilíbrio genotípico no programa GENEPOP 4.3 (Rousset 2008). A significância foi avaliada baseada em 10.000 permutações com 10.000 *batches* e 5.000 interações por *batch*. Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) por *locus* e por

localidade foram avaliados utilizando o teste de déficit de heterozigotos e o teste de Haldane no programa GENEPOP. Para todas as análises citadas, o valor de significância (p) foi ajustado para múltiplos testes utilizando o procedimento de Bonferroni (Rice 1989). Também avaliamos a ocorrência de erros na determinação dos genótipos devido a alelos nulos, *dropout*, e *stutter peaks* no programa MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) com base em 1.000 cadeias de Monte Carlo e intervalo de confiança de acordo com a correção de Bonferroni.

Índices de diversidade genética foram estimados para cada localidade. O número de alelos (N_A) e o número médio de alelos corrigido pelo menor tamanho amostral (riqueza alélica - A_R) foram estimados por *locus* e localidade no FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). A heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram estimadas por *locus* por população utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010). O mesmo programa foi utilizado para estimar o coeficiente de endogamia (F_{IS}) por localidade e a significância foi avaliada com base em 50.000 permutações, sendo os valores de significância ajustados de acordo com o método de Bonferroni.

Estrutura genética

A abordagem baseada no agrupamento hierárquico das localidades amostradas, similar ao método descrito por Holsinger e Mason-Gamer (1996), foi implementada para construir um dendrograma que pode ser interpretado como uma representação da estrutura genética dos dados. Resumidamente, primeiro foi calculado o F_{ST} par-a-par considerando cada localidade amostrada como uma possível população. A diferenciação entre as localidades amostradas foi avaliada calculando o F_{ST} par-a-par no programa ARLEQUIN. O suporte estatístico foi obtido utilizando 50.000 permutações e o nível de significância de p foi ajustado para múltiplas comparações utilizando o método de Bonferroni. Em seguida, foi agrupado o par de localidades com menor valor de F_{ST} , sendo o índice de diferenciação recalculado. Este processo foi repetido até que todas as localidades amostradas fossem reunidas em um único agrupamento.

Os grupos genéticos de *N. fasciata* também foram identificados empregando duas abordagens baseadas no método bayesiano, sendo estas a *Bayesian Analysis of Population Structure* (BAPS) e STRUCTURE. A primeira análise, BAPS, foi implementada considerando o nível populacional (opção *group of individuals*) e a posição geográfica das localidades amostradas no programa BAPS 6.0 (Corander *et al.* 2008). De acordo com Corander e colaboradores (2008), esta é melhor opção dado um conjunto de *loci*

reduzido. Adicionalmente, esta análise considera que as populações podem apresentar frequências alélicas diferentes quando avaliado no nível populacional, com a vantagem de evitar particionar indivíduos tendo como base o HWE. O módulo de agrupamento espacial produz diagramas de Voronoï, sendo cada célula colorida de acordo com a associação ao grupo ao qual foi atribuída. A análise foi realizada considerando o número máximo de grupos (K) igual a 9 e 20 réplicas de cada K , uma vez que cada localidade amostrada pode representar uma população diferente.

A segunda abordagem bayesiana foi realizada no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) utilizando como parâmetros *no-admixture + location prior + correlated allele frequencies*. O parâmetro *no-admixture* foi escolhido considerando a baixa capacidade de dispersão da espécie (Duca & Marini 2014) e a distância relativamente longa entre muitas localidades amostradas. Adicionalmente, este modelo é mais eficiente para detectar a estrutura populacional sob baixo nível de divergência ou com menor número de marcadores (Hubisz *et al.* 2009). Para cada valor de K avaliado (1 – 9) foram geradas 600.000 gerações e 10 iterações para cada K , sendo descartadas as primeiras 100.000 gerações. A inferência do número ótimo de grupos foi realizada utilizando o método descrito por Evanno e colaboradores (2005) que considera o maior valor de ΔK como o número provável de grupos utilizando o STRUCTURE HARVESTER 0.6.8 (Earl & vonHoldt 2012). A representação gráfica dos resultados do STRUCTURE foi construída utilizando o CLUMPAK (Kopelman *et al.* 2015) para calcular as probabilidades de atribuição de cada indivíduo considerando o valor de K encontrado.

Por fim, foi estimado o nível de diferenciação genética entre os grupos obtidos pelos métodos de agrupamento hierárquico e bayesianos utilizando a Análise de Variância Molecular (AMOVA) no programa ARLEQUIN. Foi realizada uma AMOVA do tipo *locus by locus* considerando uma matriz de F_{ST} . O suporte estatístico foi avaliado por meio de 50.000 permutações não paramétricas.

Influência da distância geográfica na diversidade genética

Para avaliar se a distância genética entre as localidades é influenciada pela distância geográfica foi utilizado teste de Mantel. Este teste consistiu na regressão dos valores de distância genética ($F_{ST}/1 - F_{ST}$) e de logaritmo da distância euclidiana entre os pares de localidades usando a plataforma on-line IBD WEB SERVICE 3.23 (IBDWS; Jensen *et al.* 2005). A distância euclidiana entre os pares de populações foi calculada utilizando recurso on-line do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

(<http://www.dpi.inpe.br/calcula/>). A significância dos coeficientes de regressão foi testada a partir de 30.000 permutações na plataforma IBDWS. Também foi avaliada a correlação entre a diversidade genética e os gradientes geográficos. Para tal, foram realizadas regressões entre os valores dos índices de diversidade genética A_R e H_E em função da latitude e longitude (grau decimal) utilizando o coeficiente de correlação de Spearman no programa PAST 3.11 (Hammer *et al.* 2001).

Heterogeneidade do habitat: Províncias fitogeográficas do Cerrado

Ratter e colaboradores (2003) analisaram a composição florística de 376 áreas de Cerrado e savanas Amazônicas e, com base em análises multivariadas, descreveram seis províncias fitogeográficas distintas. Estas províncias podem ser delimitadas geograficamente e classificadas como províncias do Sul (S), central e sudeste (C & SE), norte e nordeste (N & NE), centro-oeste (CW), mesotróficas do extremo oeste (FWM) e fragmentos disjuntos na Amazônia (DA) (Fig. 2.2).

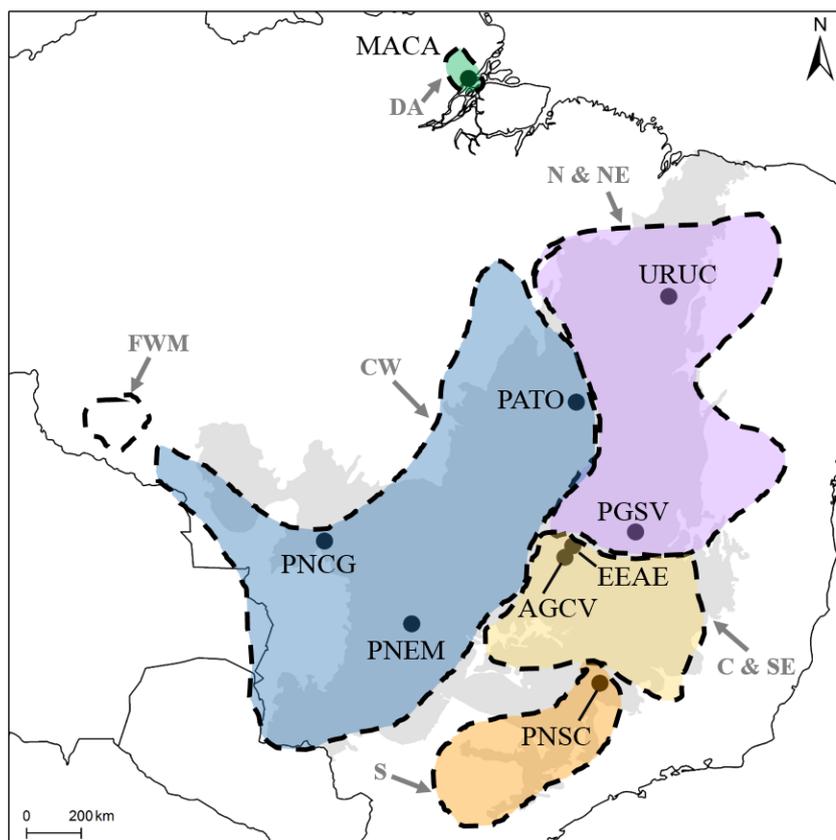


Figura 2.2. Representação das localidades amostradas em relação às províncias fitogeográficas do Cerrado propostas por Ratter e colaboradores (2003) (linhas pontilhadas). Siglas das províncias: fragmentos disjuntos na Amazônia (DA), norte e nordeste (N & NE), centro-oeste (CW), central e sudeste (C & SE), mesotróficas do extremo oeste (FWM) e sul (S). Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Para avaliar se a heterogeneidade de habitat teve influência no fluxo gênico entre as populações amostradas a estrutura genética esperada de acordo com a delimitação das províncias fitogeográficas (para detalhes ver a Fig. 2.2) foi comparada com os resultados obtidos pelos métodos de agrupamento e bayesianos. Também foi implementada a análise AMOVA utilizando os grupos esperados de acordo com as províncias fitogeográficas para estimar o nível de diferenciação entre os grupos e comparar com os valores obtidos para os métodos de agrupamento hierárquico e bayesianos.

Hipótese da fragmentação do habitat

Para avaliar se o processo de fragmentação do Cerrado afetou negativamente a variabilidade genética de *N. fasciata*, as localidades amostradas foram classificadas como pertencentes à uma paisagem fragmentada (PNSC, PNEM e PNCG) ou não fragmentada (AGCV, EEAE, PGSV, PATO e URUC) de acordo com a base de dados disponibilizada pelo MMA (2007) (Fig. 2.1). Para testar se as diferenças na diversidade genética (A_R e H_E) em relação à fragmentação do habitat foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis no PAST.

Adicionalmente, é esperado que populações localizadas nas áreas fragmentadas sofram redução do tamanho populacional (efeito gargalo ou *bottleneck*) devido à redução do habitat e isolamento das populações. Populações que tenham passado por um declínio abrupto no seu tamanho efetivo devem apresentar um excesso na heterozigosidade observada em comparação à heterozigosidade esperada de acordo com o equilíbrio entre mutação e deriva (Cornuet & Luikart 1996). Para detectar redução recente no tamanho efetivo populacional, foi utilizado o teste de Wilcoxon para excesso de heterozigotos no programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996). Este teste foi escolhido por ser o mais robusto para a análise de conjuntos de dados com menos de 20 *loci* polimórficos e pequeno tamanho amostral (≤ 30 indivíduos por população analisada) (Piry *et al.* 1999). Os parâmetros selecionados para este teste foram modelo de duas fases (*two-phased model* - TPM) com variância igual a 12 e proporção de mutações *stepwise* de 95%, como recomendado por Piry e colaboradores (1999). Foram utilizadas 100.000 iterações para obtenção do suporte estatístico desta análise.

Hipótese centro-periferia

Para testar a hipótese de maior diversidade no centro da distribuição em comparação com as áreas periféricas, as localidades amostradas foram categorizadas como centrais ou periféricas com base no mapa de distribuição de *Neothraupis fasciata* disponibilizado pela Birdlife International e NatureServe (2014). Para tal, dois cenários de amplitude da distribuição periférica foram definidos: 1) periferia estreita, determinada por uma zona de 150 km paralela com o limite da distribuição da espécie; e 2) periferia ampla, tendo como base uma distância máxima de 300 km da borda da distribuição da espécie (Fig. 2.3). Com base no cenário cuja delimitação da periferia é mais restritiva, AGCV, EEAE, PGSV, PNEM e PNSC foram consideradas como localidades centrais, enquanto PATO, PNCG e URUC foram consideradas periféricas. Para o segundo cenário, de periferia mais ampla, AGCV, EEAE e PGSV foram categorizadas como centrais, enquanto PATO, PNCG, PNEM, PNSC e URUC foram categorizadas como periféricas. Diferenças na diversidade genética (A_R e H_E) entre centro e periferia foram avaliadas com base no teste Kruskal-Wallis implementado no PAST.

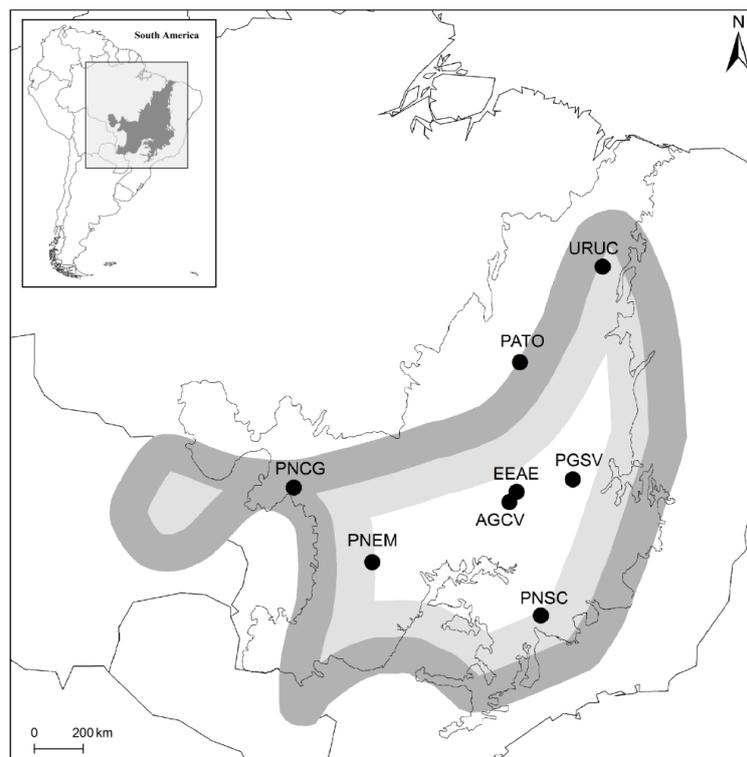


Figura 2.3. Cenários centro-periferia com base na distribuição geográfica conhecida para *Neothraupis fasciata* (Birdlife International & NatureServe 2014): cenário amplo em à partir da borda até a área delimitada em cinza escuro e cenário estrito estendendo da borda até a área delimitada em cinza claro. Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Também foi realizado um teste de correlação entre os índices de diversidade genética (A_R e H_E) e a distância geográfica de cada localidade amostrada do centróide da distribuição da espécie. A distância euclidiana entre cada localidade e o centróide da distribuição foi calculada utilizando o recurso on-line do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. As correlações foram avaliadas utilizando o coeficiente de Spearman no programa PAST.

RESULTADOS

Diversidade genética

O teste de desequilíbrio de ligação não foi significativo para nenhuma das comparações feitas ($p > 0,05$), indicando a segregação independente dos *loci* avaliados. De acordo com os resultados do MICROCHECKER, foi encontrada evidência significativa de alelos nulos em dois *loci* avaliados, NF0506 e NF2526. Considerando que alelos nulos podem levar à interpretações equivocadas do número de heterozigotos e, conseqüentemente, comprometer as estimativas de variabilidade genética, todas as análises subsequentes foram conduzidas excluindo esses *loci*. Adicionalmente, o *locus* NF1112 também foi excluído das análises por problemas no processo de amplificação e por dificuldades na definição do tamanho dos alelos. A partir do conjunto de dados composto por seis *loci*, apenas MACA apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,0015$) de acordo com o teste de déficit de heterozigotos (Tabela 2.2).

O número médio de alelos por localidade variou entre 3,33 (PNEM) e 6,33 (PGSV), enquanto a riqueza alélica variou entre 2,95 (PNEM) e 4,17 (EEAE) (Tabela 2.2). Adicionalmente, os maiores valores de heterozigosidade esperada e observada foram encontrados em EEAE ($H_E = 0,632$ e $H_O = 0,761$), enquanto que os menores valores foram reportados em PNEM ($H_E = 0,398$ e $H_O = 0,400$). (Tabela 2.2). O coeficiente de endogamia não foi estatisticamente significativo em nenhuma das localidades avaliadas utilizando a correção de Bonferroni, sendo o menor valor reportado para PNCG (-0,23) e o maior valor para MACA (0,20) (Tabela 2.3).

Tabela 2.2. Índices de diversidade genética por locus e por localidade estimados para *Neothraupis fasciata* com base na análise de nove loci de microssatélites. Número de indivíduos analisados (n), número de alelos (N_a), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) por locus e localidade. Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando a correção de Bonferroni * $p < 0,0055$; ** $p < 0,0083$ estão indicados em negrito. Locus monomórficos são indicados pela sigla *mono*. Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Localidade	Locus	N_a	A_R	H_E	H_O	Localidade	Locus	N_a	A_R	H_E	H_O
AGCV n=30	NF0304	4	2,583	0,490	0,466*	PNEM n=10	NF0304	3	2,720	0,484	0,300
	NF0506	8	4,610	0,768	0,266*		NF0506	5	3,893	0,726	0,500
	NF1112	10	-	0,811	0,450*		NF1112	6	-	0,863	0,333*
	NF1314	4	1,782	0,159	0,166		NF1314	1	1,000	<i>mono</i>	<i>mono</i>
	NF1516	4	2,471	0,545	0,633		NF1516	3	2,484	0,468	0,600
	NF1920	2	1,528	0,126	0,133		NF1920	3	2,000	0,194	0,200
	NF2122	5	3,734	0,721	0,833		NF2122	3	2,484	0,468	0,600
	NF2526	5	4,029	0,732	0,689		NF2526	4	3,105	0,536	0,700
NF2930	12	6,491	0,896	0,833	NF2930	7	5,053	0,773	0,700		
EEAE n=07	NF0304	4	3,648	0,714	1,000	PGSV n=27	NF0304	6	3,414	0,626	0,592*
	NF0506	3	2,988	0,67	0,285		NF0506	7	4,053	0,712	0,461*
	NF1112	8	-	1,000	1,000		NF1112	10	-	0,822	0,764
	NF1314	4	3,648	0,714	1,000		NF1314	4	2,462	0,329	0,333
	NF1516	4	3,648	0,714	0,857		NF1516	5	2,822	0,556	0,444
	NF1920	1	1,000	<i>mono</i>	<i>mono</i>		NF1920	4	1,556	0,109	0,111
	NF2122	4	3,912	0,758	0,857		NF2122	7	4,293	0,760	0,741
	NF2526	4	3,667	0,697	1,000		NF2526	5	3,871	0,684	0,434*
NF2930	8	6,494	0,89	0,857	NF2930	12	6,470	0,894	0,889		

Continua

Localidade	Locus	Na	A_R	H_E	H_o	Localidade	Locus	Na	A_R	H_E	H_o
MACA n=09	NF0304	3	2,634	0,392	0,444	PNSC n=07	NF0304	4	3,143	0,395	0,286
	NF0506	2	2,000	0,529	0,111		NF0506	5	4,297	0,67	0,571
	NF1112	-	-	-	-		NF1112	7	-	0,909	0,833
	NF1314	2	1,992	0,400	0,000		NF1314	1	1,000	<i>mono</i>	<i>mono</i>
	NF1516	2	1,993	0,425	0,333		NF1516	2	2,000	0,494	0,429
	NF1920	2	2,000	0,522	0,667		NF1920	3	2,429	0,275	0,286
	NF2122	5	3,874	0,683	0,625		NF2122	4	3,637	0,648	0,714
	NF2526	3	3,000	0,451	0,333		NF2526	4	3,818	0,78	0,428
	NF2930	7	5,538	0,843	0,444*		NF2930	7	5,945	0,857	0,714
PATO n=18	NF0304	4	2,437	0,376	0,278	URUC n=08	NF0304	3	2,617	0,491	0,625
	NF0506	5	3,693	0,673	0,278		NF0506	3	2,713	0,538	0,143
	NF1112	11	-	0,901	0,692		NF1112	4	-	0,821	0,750
	NF1314	1	1,000	<i>mono</i>	<i>mono</i>		NF1314	3	2,839	0,508	0,625
	NF1516	2	2,000	0,515	0,647		NF1516	4	3,492	0,641	0,625
	NF1920	2	1,826	0,246	0,167		NF1920	2	1,875	0,233	0,250
	NF2122	5	3,709	0,698	0,889		NF2122	4	3,858	0,767	1,000
	NF2526	5	4,069	0,746	0,611		NF2526	3	2,985	0,667	0,333
	NF2930	9	5,809	0,856	0,889		NF2930	5	4,617	0,800	1,000
PNCG n=10	NF0304	4	3,676	0,695	1,000	<i>Média</i> (6 Loci)	AGCV	5,16	3,495	0,489	0,511
	NF0506	6	4,220	0,674	0,300*		EEAE	4,17	4,167	0,632	0,761
	NF1112	-	-	-	-		MACA	3,50	3,331	0,544	0,419
	NF1314	3	2,940	0,626	0,900		PATO	3,83	3,113	0,449	0,478
	NF1516	3	2,720	0,484	0,600		PNCG	4,33	4,005	0,612	0,728
	NF1920	3	2,263	0,279	0,300		PNEM	3,33	2,950	0,398	0,400
	NF2122	4	3,725	0,699	0,667		PGSV	6,33	4,027	0,546	0,518
	NF2526	6	5,108	0,842	0,700		PNSC	3,50	3,500	0,445	0,405
	NF2930	9	6,361	0,889	0,900		URUC	3,50	3,448	0,573	0,687

Tabela 2.3. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste de redução populacional (BOTTLENECK) das nove localidades amostradas para *Neothraupis fasciata*. O valor de significância do F_{IS} foi obtido utilizando a correção de Bonferroni ($p < 0,0083$). Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Localidade	Endogamia		<i>Bottleneck</i>
	F_{IS}	p	p
AGCV	-0,04402	0,81273	0,92188
EEAE	-0,22684	0,99055	0,10938
MACA	0,20362	0,03479	0,42188
PATO	-0,07769	0,87455	0,50000
PNCG	-0,23052	0,99860	0,34375
PNEM	-0,00465	0,58622	1,00000
PGSV	0,05126	0,17799	0,98438
PNSC	0,09735	0,26563	0,95313
URUC	-0,21579	0,99332	0,50000

Estrutura genética do tiê-do-cerrado

Do total de 36 comparações de F_{ST} par a par, aproximadamente 60% (22 comparações) foram estatisticamente significativas utilizando a correção de Bonferroni (Tabela 2.4). PGSV apresentou o maior número de comparações significativas, enquanto PNSC apresentou o menor número de comparações significativas com as demais localidades.

A estrutura genética obtida pelo método de agrupamento hierárquico indica a presença de cinco grupos genéticos, sendo dois destes representados por mais de uma localidade e três representados por uma única localidade amostrada: Grupo 1 - AGCV, PATO, PNEM e PNSC; Grupo 2 - EEAE e PNCG; Grupo 3 - URUC; Grupo 4 - PGSV; e Grupo 5 - MACA (Figs. 2.4 e 2.5B). A análise bayesiana implementada no STRUCTURE mostrou suporte para quatro grupos genéticos distintos (Fig. 2.5C e 2.6), divergindo do resultado encontrado no método de agrupamento pela posição de URUC, que foi agrupada com EEAE e PNCG. A análise no BAPS indicou a existência de três populações, com o Log(marginal likelihood) da melhor partição igual a -1935,0265 e probabilidade de 0,99701. A melhor partição encontrada pelo BAPS mostrou suporte para os Grupos 2 e 5, mas reuniu os Grupos 1, 3 e 4 em um único agrupamento genético (Fig. 2.5D).

Tabela 2.4. Valores de diferenciação (F_{ST} ; diagonal inferior) e distância euclidiana em quilômetros (diagonal superior) entre os pares de localidades amostradas. Valores significativos de diferenciação de acordo com a correção de Bonferroni ($p < 0,0013$) estão destacados em negrito. Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

	AGCV	EEAE	MACA	PATO	PNCG	PNEM	PGSV	PNSC	URUC
AGCV		54	1794	560	858	596	267	521	991
EEAE	0,080		1770	525	900	650	218	546	943
MACA	0,085	0,117		1265	1795	2046	1790	2315	1147
PATO	0,009	0,135	0,104		1046	1017	526	1068	501
PNCG	0,073	0,017	0,079	0,106		456	1115	1114	1538
PNEM	0,042	0,145	0,117	0,060	0,124		860	682	1510
PGSV	0,044	0,091	0,157	0,077	0,097	0,123		598	840
PNSC	0,021	0,122	0,061	0,011	0,081	0,012	0,102		1437
URUC	0,041	0,033	0,103	0,063	0,078	0,102	0,071	0,063	

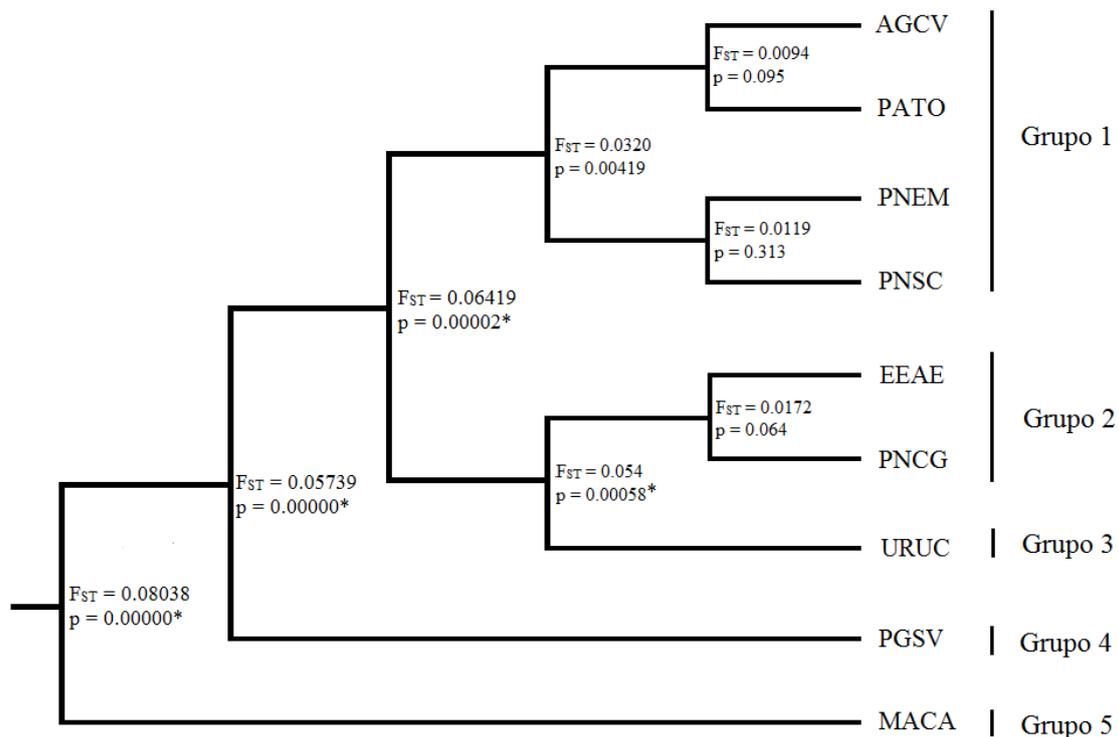


Figura 2.4. Dendrograma da estrutura genética de *Neothraupis fasciata* de acordo com o método de agrupamento hierárquico. Os números em cada nó indicam o valor de F_{ST} e o respectivo valor de significância. Os valores significativos são destacados com um asterisco (*). Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Os resultados da AMOVA mostraram que para o arranjo obtido pelo método de agrupamento hierárquico e STRUCTURE aproximadamente 91% da variação genética está distribuída dentro das localidades amostradas, sendo este valor menor para o arranjo do BAPS (~89%) (Tabela 2.5). A AMOVA ainda indicou que uma parte significativa da variação genética está distribuída entre localidades dentro dos grupos tanto para o método de agrupamento hierárquico ($F_{CT} = 0,068$) quanto métodos bayesianos (F_{CT} STRUCTURE = 0,057 e F_{CT} BAPS = 0,060) e que a diferenciação entre localidades dentro dos grupos foi menor no método de agrupamento ($F_{SC} = 0,02$), seguido pelo STRUCTURE ($F_{SC} = 0,03$) e BAPS ($F_{SC} = 0,05$).

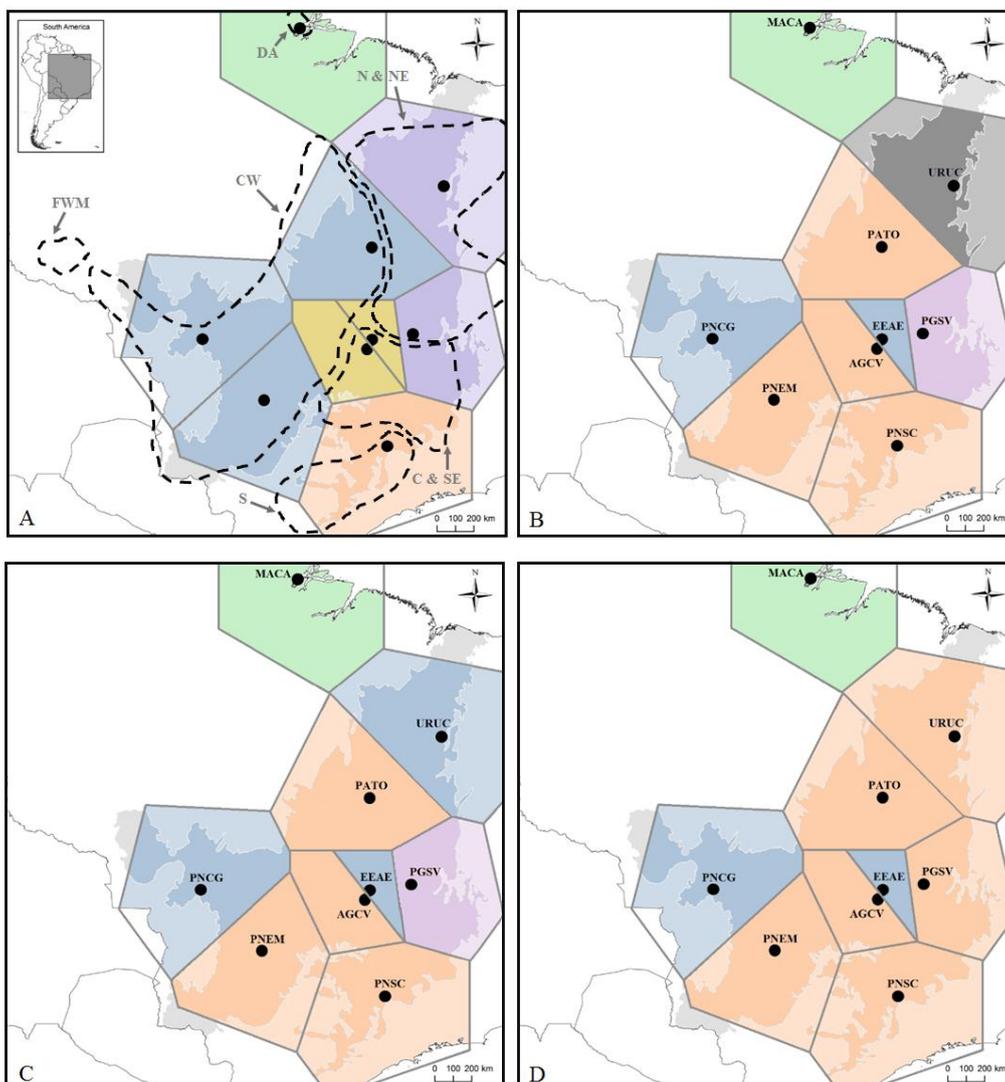


Figura 2.5. Estrutura genética de *Neothraupis fasciata* de acordo com os diferentes métodos empregados. A) estrutura esperada segundo as províncias fitogeográficas do Cerrado; B) estrutura de acordo com o método de agrupamento hierárquico; C) estrutura de acordo com o STRUCTURE; e D) estrutura de acordo com o BAPS. As cores indicam o grupo genético ao qual cada localidade foi atribuída. Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Tabela 2.5. Análise de Variância Molecular dos grupos genéticos de *Neothraupis fasciata* identificados de acordo com as análises BAPS, STRUCTURE e agrupamento hierárquico, além do esperado segundo as províncias fitogeográficas do Cerrado. As estatísticas correspondem à soma dos quadrados (SS), porcentagem de variação (Var %) e valor de significância (*p*).

Estrutura populacional	Fonte da variação	SS	Var(%)	<i>p</i>
BAPS	Entre grupos	15,119	6,013	0,00078
	Entre localidades dentro dos grupos	23,328	4,737	<0,0001
	Dentro da localidade	371,502	89,250	<0,0001
STRUCTURE	Entre grupos	24,741	5,721	0,00008
	Entre localidades dentro dos grupos	13,706	2,973	<0,0001
	Dentro da localidade	371,502	91,306	<0,0001
Agrupamento hierárquico	Entre grupos	28,801	6,818	0,00012
	Entre localidades dentro dos grupos	9,645	1,994	0,00064
	Dentro da localidade	371,502	91,188	<0,0001
Províncias fitogeográficas	Entre grupos	19,062	-1,098	0,60273
	Entre localidades dentro dos grupos	19,384	8,364	<0,0001
	Dentro da localidade	371,502	92,734	<0,0001

BAPS: $F_{CT} = 0,060$; $F_{SC} = 0,050$; $F_{ST} = 0,107$

STRUCTURE: $F_{CT} = 0,057$; $F_{SC} = 0,031$; $F_{ST} = 0,087$

Agrupamento hierárquico: $F_{CT} = 0,068$; $F_{SC} = 0,021$; $F_{ST} = 0,088$

Províncias fitogeográficas: $F_{CT} = -0,011$; $F_{SC} = 0,083$; $F_{ST} = 0,073$

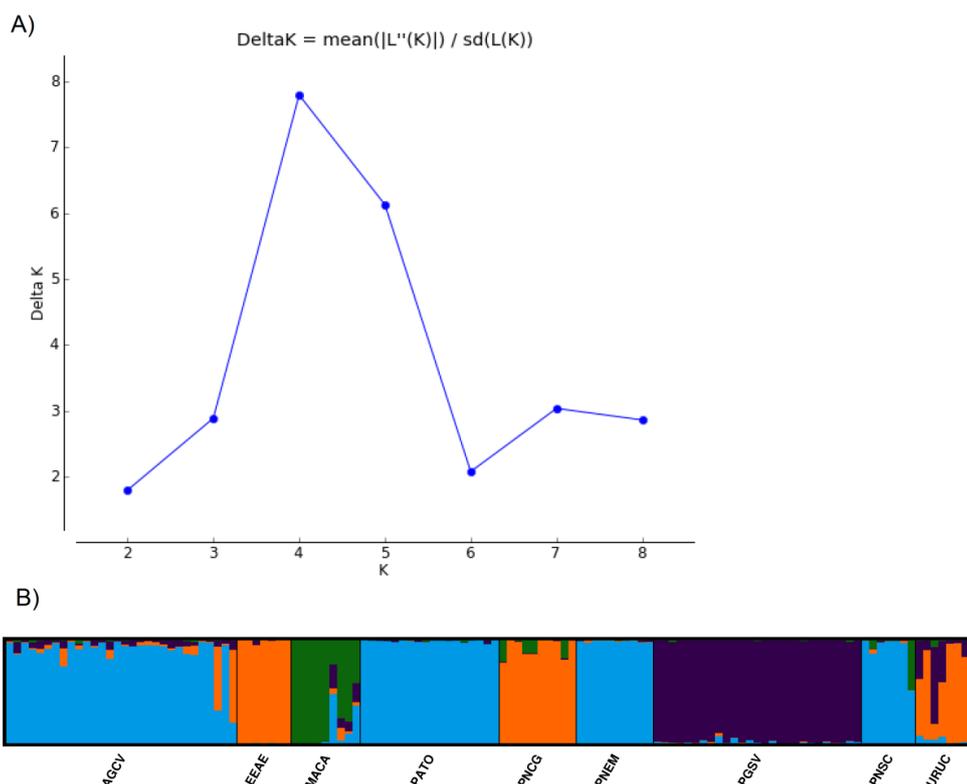


Figura 2.6. Análise da estrutura genética do tiê-do-cerrado utilizando o programa STRUCTURE. A) valores de Evanno ΔK ; B) Atribuição de cada indivíduo aos grupos identificados assumindo $K=4$. Para o nome das localidades ver Tabela 2.1.

Gradientes geográficos

A hipótese nula de ausência na correlação entre a distância geográfica e distância genética não foi rejeitada no teste de Mantel ($r = 0,088$; $Z = 9,531$; $p = 0,332$). Assim, distância geográfica não parece exercer influência no nível de diferenciação genética observada entre as localidades amostradas. Como exemplo podemos citar a diferenciação genética entre EEAE e AGCV, que embora apresentem uma distância geográfica relativamente baixa (~50 km), apresentaram um valor moderado e significativo de diferenciação genética ($F_{ST} = 0,08$; $p = 0,00014$; Tabela 2.3). Em contrapartida, localidades geograficamente mais distantes como PNSC e PATO apresentaram um valor de diferenciação baixo e não significativo ($F_{ST} = 0,011$; $p = 0,2245$). Quanto à diversidade genética, não foi encontrada correlação significativa entre A_R e H_E e os gradientes geográficos (A_R e latitude: $r_s = -0,151$; $p = 0,699$; A_R e longitude: $r_s = 0,176$; $p = 0,653$; H_E e latitude: $r_s = 0,417$; $p = 0,249$; H_E e longitude: $r_s = 0,0667$; $p = 0,843$).

Influência das províncias fitogeográficas na estrutura genética do tiê-do-cerrado

Nenhuma das análises da estrutura genética de *N. fasciata* revelaram um padrão concordante com o esperado tendo como base as províncias fitogeográficas delimitadas por Ratter e colaboradores (2003) (Fig. 2.5). Por exemplo, embora as localidades AGCV e EEAE façam parte da mesma província (C & CE), foi encontrado um valor significativo e moderado de diferenciação entre estas (Tabela 2.4), além de fazerem parte de grupos genéticos distintos tanto pelo método de agrupamento hierárquico quanto pelos métodos bayesianos (Fig. 2.5). Considerando os resultados da AMOVA para a estrutura populacional esperada de acordo com as províncias fitogeográficas foi observado que mais de 92% da variação genética está distribuída dentro das localidades amostradas. Dentre os quatro arranjos testados, o valor de diferenciação entre localidades dentro dos grupos foi maior para o agrupamento seguindo as províncias fitogeográficas (~8%; Tabela 2.5). Por fim, este arranjo também apresentou o menor valor de F_{ST} (0,073) e o maior valor de F_{SC} (0,083).

Influência da fragmentação do habitat na diversidade genética

Em geral, as localidades classificadas como não fragmentadas apresentaram valor médio de A_R igual a 3,65 (SD \pm 0,44) enquanto as áreas fragmentadas apresentaram valor médio de 3,48 (SD \pm 0,53). A H_E média foi de 0,54 (SD \pm 0,07) nas áreas não fragmentadas e 0,48 (SD \pm 0,11) nas áreas fragmentadas. Os valores de diversidade genética não foram significativamente diferentes nas áreas fragmentadas e não fragmentadas (A_R : $H = 0,3556$, $p = 0,548$; H_E : $H = 1,089$; $p = 0,297$). Desta forma, a hipótese de que áreas fragmentadas apresentam menor diversidade genética do que áreas não fragmentadas foi rejeitada para ambos os índices de diversidade avaliados. De acordo com a análise de redução no tamanho populacional avaliada no programa BOTTLENECK nenhuma localidade apresentou valores significativos de excesso de heterozigotos (Tabela 2.3), indicando que as localidades analisadas não passaram por redução recente no tamanho populacional.

Hipótese centro-periferia

Considerando a delimitação de periferia estreita a A_R média foi de 3,9 (SD \pm 0,35) no centro e de 3,4 (SD \pm 0,41) na periferia, enquanto H_E média foi de 0,56 (SD \pm 0,07) no centro e 0,49 (SD \pm 0,09) na periferia. Para o cenário de periferia ampla, a região central apresentou A_R média igual a 3,63 (SD \pm 0,49) e H_E igual a 0,50 (SD \pm 0,09), enquanto a

região periférica apresentou A_R igual a 3,52 (SD \pm 0,45) e H_E igual a 0,54 (SD \pm 0,08). De acordo com os resultados do teste de Kruskal-Wallis não foi observada diferença na A_R entre a região central e periférica da distribuição da espécie tanto para o limite de periferia estreito (H = 3,2; $p = 0,072$) quanto para o amplo (H = 0,556; $p = 0,453$). De forma similar, não foi observada diferença na H_E tanto para a o cenário de periferia estreita (H = 1,089; $p = 0,297$) quanto ampla (H = 0,556; $p = 0,456$). O teste de correlação entre os índices de diversidade genética das localidades amostradas e a respectiva distância do centróide da distribuição também não foi significativa (A_R : $rs = -0,239$; $p = 0,567$; H_E : $rs = 0,1428$; $p = 0,703$). Desta forma, a hipótese de centro-periferia foi rejeitada por todos os testes empregados, indicando que as localidades amostradas situadas na periferia e centro da distribuição apresentam valores similares de diversidade genética.

DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro esforço para entender os processos relacionados com a estrutura genética da avifauna do Cerrado com base em uma amostragem ampla no bioma. Um estudo prévio com foco na avifauna do Cerrado avaliou a diferenciação genética em 10 espécies amostradas no oeste da Bolívia e no Amapá, tendo como base um pequeno número de indivíduos (máximo de quatro indivíduos por espécie) (Bates *et al.* 2003). No referido estudo, os resultados indicaram uma baixa diferenciação entre estas duas populações. Diante da lacuna de estudos sobre a diversidade genética de espécies de vertebrados do Cerrado, em especial as aves, a interpretação e comparação dos nossos resultados torna-se ainda mais complexa.

A diversidade genética de *Neothraupis fasciata* encontrada ao longo das localidades amostradas pode ser considerada moderada. De acordo com Evans e Sheldon (2008), a heterozigosidade média de uma espécie é negativamente correlacionada com o risco de extinção, sendo os valores médios de H_E próximos de 0,6 em espécies quase ameaçadas e menores que 0,4 em espécies criticamente ameaçadas. Neste sentido, o nível de variabilidade encontrado para o tiê-do-cerrado, uma espécie quase ameaçada segundo os critérios da IUCN (2013), é concordante com o resultado reportado por Evans e Sheldon (2008). Alternativamente, a redução do tamanho populacional não se refletiu ainda na redução da diversidade genética. Mesmo considerando a localidade com o menor nível de variabilidade genética (PNEM), os

valores encontrados são próximos aos reportados para outra espécie australiana não ameaçada e que ocupa áreas abertas, o Mallee Emu-wren, *Stipiturus mallee* (Brown 2013). *Neothraupis fasciata* também apresentou estrutura populacional moderada, caracterizada por pelo menos três grupos genéticos distintos. Contudo, nenhum dos processos e padrões analisados no presente estudo, como isolamento por distância, heterogeneidade do habitat relacionada às províncias fitogeográficas, fragmentação do habitat ou distribuição central e periférica parece ter contribuído diretamente com a estrutura genética observada nesta espécie endêmica do Cerrado, como discutido a seguir.

MACA: População disjunta e com diferenciação genética moderada

Localizada no grupo das savanas disjuntas da Amazônia no norte do Brasil, MACA é uma das localidades mais isoladas no extremo norte da distribuição da espécie (ver Mittermeier *et al.* 2010 para registro de ocorrência em Sipaliwini, no Suriname). Todos os métodos utilizados para avaliar a estrutura genética identificaram MACA como um grupo genético distinto das demais localidades (Fig. 2.5). A diferenciação genética entre MACA e as demais localidades amostradas no Cerrado é evidente, sendo mais pronunciada em relação a localidades situadas no centro da distribuição e relativamente menos pronunciada nas comparações com localidades situadas próximas à borda do bioma, como URUC e PNCG (Tabela 2.4). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Bates e colaboradores (2003), no qual foi identificado baixo nível de divergência genética entre diversas espécies de aves amostradas nas savanas do Amapá (aqui representadas por MACA) e no Parque Nacional Noel Kempff Mercado (região relativamente próxima do PNCG). E ainda, a baixa diferenciação genética observada entre MACA e as localidades situadas na borda da distribuição da espécie sugere que a restrição do fluxo gênico entre estas localidades pode ter ocorrido recentemente. Este resultado parece estar de acordo com a hipótese de que as populações de aves características das savanas ao sul da Amazônia que habitam as savanas do Amapá são oriundas de uma expansão populacional recente do Cerrado, potencialmente tanto por um corredor Andino quanto pelo corredor Costeiro Atlântico (Silva 1995, Silva & Bates 2003). Estas conexões históricas entre as savanas disjuntas no norte da Amazônia e o Cerrado devem ter ocorrido em resposta aos eventos de expansão das formações abertas da América do Sul durante os períodos mais secos e/ou frios das flutuações climáticas do Quaternário (Haffer 1967, 1985, Silva & Bates 2002, Werneck *et al.* 2012).

Nossos resultados também mostraram que MACA apresentou uma redução significativa na heterozigiosidade observada. A teoria da genética de populações prediz que a redução na diversidade genética deve ocorrer principalmente em resposta à fatores como a deriva genética e endogamia em populações pequenas parcial ou completamente isoladas durante diversas gerações (Wright 1969). Com base neste pressuposto, o déficit de heterozigotos observado em MACA pode ser interpretado como um sinal de que acasalamentos não aleatórios podem estar ocorrendo em um nível mais elevado que o habitual nesta localidade, possivelmente devido ao pequeno tamanho efetivo populacional, o que deve ser melhor investigado no futuro.

As savanas do Amapá tem sido rapidamente modificadas pela atividade antrópica para diversos usos, acarretando na redução de áreas naturais e possivelmente impactando as populações animais que ocorrem nesta formação. A interferência humana nas savanas do Amapá começou na década de 1970 e desde então mais de 200.000 hectares, cerca de 22% da área histórica, foram convertidos em áreas de cultivo de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* e, mais recentemente, de soja (Melém-Júnior 2003, Oliveira 2009). Assim, a fragmentação e perda de habitat pode ter contribuído para a redução do tamanho efetivo populacional de *N. fasciata*, acelerando o processo de erosão genética desta população. Neste sentido, mais estudos são necessários para identificar os impactos potenciais das alterações antrópicas nas savanas do Amapá e auxiliar na tomada de decisões para mitigar quaisquer impactos sobre esta população, garantindo a manutenção da variabilidade genética remanescente desta população atualmente isolada.

Por fim, a identificação de populações geneticamente distintas tem sido uma importante ferramenta na biologia da conservação (Avice 1989, Moritz 1994, Moritz & Faith 1998, Brooks *et al.* 1992). Nesse sentido, de acordo com Moritz (1994), Unidades de Manejo podem ser reconhecidas como populações com divergência significativa nas frequências alélicas em *loci* nucleares ou mitocondriais, independentemente da distinção filogenética destes alelos. Assim, sugerimos que a população de *N. fasciata* situada nas savanas do Amapá deve ser considerada uma Unidade de Manejo distinta na orientação dos esforços de conservação desta espécie.

Isolamento por distância não explica a estrutura genética do tiê-do-cerrado

A hipótese de isolamento por distância foi rejeitada para esta espécie, indicando que restrições no fluxo gênico entre as localidades amostradas não está relacionada com a distância geográfica. O padrão encontrado neste trabalho é similar ao reportado para a

espécie de sapo *Physalaemus cuvieri* na porção central do Cerrado, no qual a diferenciação populacional tem pouca correspondência espacial (Telles *et al.* 2007). Por outro lado, o estudo realizado com uma espécie de lagarto endêmico do Cerrado, *Micrablepharus atticolus*, reportou resultados significativos para a hipótese de isolamento por distância (Santos *et al.* 2014).

O tiê-do-cerrado é uma espécie residente, territorial e com baixa capacidade de dispersão (Duca & Marini 2014), o que torna a rejeição da hipótese de IBD um resultado inesperado. Contudo, esta espécie tem forte associação com determinadas fitofisionomias abertas do Cerrado, como campo sujo e cerrado *stricto sensu*, nas quais ela forrageia e nidifica (Sick 1984, Alves 1991). Considerando que paisagens heterogêneas podem afetar o potencial de dispersão de uma espécie e levar à desvios da hipótese de isolamento por distância (Coulon *et al.* 2004), a heterogeneidade da paisagem do Cerrado pode ter grande impacto na estrutura genética desta espécie. Adicionalmente, observações de que localidades geograficamente próximas, como EEAE e AGCV apresentam maior diferenciação genética (F_{ST}) do que localidades mais distantes como PNSC e URUC parecem reforçar esta hipótese. Assim, estudos utilizando uma escala geográfica mais refinada, como o realizado por Broquet e colaboradores (2006) parecem ser uma alternativa para elucidar a importância do isolamento por distância para esta espécie. Contudo, cabe ressaltar que o IBD só é esperado se as populações tiverem atingido o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética, sendo que alguns estudos sugerem que pode demorar um tempo relativamente longo para o equilíbrio ser estabelecido em algumas espécies (*e.g.* Castric & Bernatchez 2003).

As províncias fitogeográficas e a fragmentação do habitat parecem não influenciar a estrutura genética de *Neothraupis fasciata*

De acordo com a hipótese de heterogeneidade do habitat representada pelas províncias fitogeográficas delimitadas para o Cerrado (Ratter *et al.* 2003), seria esperado um maior fluxo gênico entre as localidades amostradas dentro da mesma província. Como resultado, também seria esperada uma maior similaridade genética entre localidades da mesma província do que entre localidades amostradas em províncias diferentes. Contudo, todas as análises de estrutura genética utilizadas (agrupamento hierárquico, STRUCTURE, BAPS e AMOVA) indicaram que a estrutura genética de *N. fasciata* é discordante com a maioria das províncias descritas (Fig. 2.5). As províncias constituem

uma importante iniciativa para avaliar a distribuição dos padrões da flora do Cerrado, e estão relacionadas, por exemplo, com a distribuição da estrutura genética da espécie de planta *Dalbergia miscolobium* (Novaes *et al.* 2013). Contudo, é importante ressaltar que a heterogeneidade florística é uma característica marcante do Cerrado, cuja vegetação natural pode formar mosaicos não homogêneos ao longo do bioma (Ratter *et al.* 2003, Silva *et al.* 2006) e até mesmo dentro das províncias fitogeográficas. Desta forma, em uma escala mais detalhada a distribuição das unidades ecológicas do Cerrado (baseadas na fisionomia e fenologia da vegetação, topografia e drenagem dos solos) apresenta um padrão disjunto (Silva *et al.* 2006) e pode constituir uma hipótese alternativa para algumas das barreiras genéticas encontradas para *N. fasciata*. Também é importante ressaltar que a seleção natural em ambientes heterogêneos é um dos mecanismos direcionadores da variação genética em populações naturais (revisado por Byers 2005). Contudo, nossos resultados tem como base um conjunto de marcadores neutros, que não estão sob influência direta da seleção. Assim, a possibilidade de que a heterogeneidade da estrutura florística do Cerrado tenha afetado a diversidade adaptativa de *N. fasciata* e outras espécies que habitam este bioma ainda necessita ser melhor investigada.

De forma similar, não foi encontrado suporte para a hipótese de menor diversidade genética nas localidades situadas na área mais fragmentada do Cerrado, representadas principalmente pela porção sul do bioma (Klink & Machado 2005, Klink & Moreira 2002, Sano *et al.* 2010). Assim, tanto localidades amostradas em áreas mais preservadas quanto aquelas imersas em uma matriz mais fragmentada apresentaram valores de diversidade genética similares. Adicionalmente, as localidades amostradas também parecem estar em equilíbrio quanto à mutação e deriva uma vez que não foi encontrado sinal de redução populacional recente, apesar da taxa alarmante de perda de habitat que *N. fasciata* está submetida devido ao desmatamento do Cerrado. A resposta genética de uma população à redução e isolamento em decorrência da fragmentação pode estar associada diretamente com a escala temporal em que a redução do habitat e o aumento do isolamento dos fragmentos remanescentes ocorreram (revisado por Keyghobadi 2007). Desta forma, como possível explicação para o cenário observado podemos citar uma defasagem (*time-lag*) entre o tempo no qual ocorreu o processo de desmatamento e a resposta genética das populações.

Neste contexto, as alterações antrópicas no Cerrado tiveram início na porção sul do bioma durante o século XVIII e aceleraram com a expansão das fronteiras agrícolas e pecuaristas em 1950, seguindo o rápido processo de desenvolvimento em direção ao

norte (Klink & Machado 2005, Sano *et al.* 2010). De acordo com o histórico relativamente recente de ocupação do Cerrado e assumindo um intervalo de geração de dois anos para *N. fasciata*, seriam esperadas aproximadamente 30 gerações desde a intensificação do processo de fragmentação do bioma, sendo este número de gerações relativamente curto desde o início a intensificação da fragmentação do Cerrado poderia ser insuficiente para observar perdas significativas na diversidade genética desta espécie. Ainda neste sentido, o fato de MACA apresentar apenas uma pequena redução da variabilidade genética em comparação as demais localidades amostradas, embora possivelmente represente uma população pequena e isolada das demais por pelo menos centenas de anos (Silva 1995, Silva & Bates 2002) também reforça a hipótese de defasagem na resposta à fragmentação do habitat.

Como segundo cenário alternativo podemos sugerir que o fluxo gênico entre as localidades amostradas não seria afetado pela fragmentação do habitat, evitando a perda de diversidade pela deriva e endogamia. Contudo, *N. fasciata* é descrita como uma espécie moderadamente sensível aos impactos antrópicos do Cerrado (Parker III *et al.* 1996), possivelmente em resposta à dependência desta espécie ao estrato arbustivo (Alves 1990, Tubelis & Cavalcanti 2000). Desta forma, este cenário parece o menos provável uma vez que a abundância do tiê-do-cerrado decresce com a perda da complexidade do habitat, sendo que esta espécie não habita áreas altamente impactadas, como plantações e pastagens (Tubelis & Cavalcanti 2000).

Contrastando com nossos resultados, Telles e colaboradores (2007) encontraram que a descontinuidade genética apresentada na espécie de sapo *Physalaemus cuvieri* na parte central do Cerrado parece estar relacionada com os padrões de fragmentação do habitat de origem antrópica. Para algumas espécies de plantas também tem sido reportado impactos negativos da fragmentação do habitat na variabilidade genética observada (Diniz-Filho 2009, Telles *et al.* 2014). Assim, embora nossos resultados não apontem um efeito direto da fragmentação do habitat na diversidade genética atual de *N. fasciata* este resultado deve ser visto com cautela. Destacamos que estudos de médio e longo prazo são necessários para compreender os efeitos da fragmentação do Cerrado na diversidade genética desta e outras espécie de aves do Cerrado.

Populações centrais não abrigam maior diversidade genética

A hipótese de maior diversidade genética no centro da distribuição da espécie foi rejeitada em todos os testes empregados. Adicionalmente, o agrupamento genético entre

algumas populações centrais e periféricas também reforça a rejeição desta hipótese. Para a espécie de lagarto endêmica do Cerrado, *Micrablepharus atticolus*, um padrão diferente foi encontrado, sendo reportada baixa diversidade haplotípica e nucleotídica e sinais de expansão demográfica nas populações periféricas, corroborando a hipótese de centro-periferia (Santos *et al.* 2014). A análise da diversidade genética da espécie de árvore endêmica do Cerrado *Caryocar brasiliensis* também mostrou suporte para a hipótese de centro-periferia (Diniz-Filho *et al.* 2009). Embora a hipótese de centro-periferia já tenha sido corroborada em outras espécies endêmicas do Cerrado, populações periféricas de *Neothraupis fasciata* não apresentam uma menor diversidade genética do que populações centrais.

Em termos ecológicos/ambientais nossos resultados indicam que tanto populações periféricas quanto centrais podem abrigar tamanho efetivo populacionais similares, estando, desta forma, igualmente susceptíveis aos efeitos deriva, endogamia e migração. Uma possível explicação é que a adequabilidade do habitat para *N. fasciata* não decresce linearmente em função da distância do centro da distribuição da espécie. Assim, ao invés de apresentar um decréscimo linear no tamanho efetivo populacional em direção à periferia da distribuição a espécie pode apresentar múltiplos picos de abundância na sua área de distribuição em resposta às mudanças nas condições ambientais (revisado por Sagarin e Gaines 2002, Sagarin *et al.* 2006).

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que *N. fasciata* apresenta uma estrutura populacional moderada, caracterizada por pelo menos três grupos genéticos distintos. Dentre os grupos genéticos observados, a população amostrada nas savanas do Amapá constitui um grupo isolado, apresentando níveis moderados de diferenciação genética em relação às demais localidades. Desta forma, sugerimos que esta população seja considerada como uma Unidade de Manejo e que mais esforços de conservação sejam direcionados para esta área. Os outros dois grupos genéticos identificados estão localizados no Cerrado, sendo que o padrão observado não parece ter sido influenciado pela distância geográfica, pela heterogeneidade do habitat (com base nas províncias fitogeográficas do Cerrado) ou mesmo com a hipótese centro-periferia. De forma similar, a fragmentação do habitat também não apresentou uma relação significativa com o padrão atual de diversidade genética observado neste estudo. Contudo, nossos resultados devem ser

vistos com cautela, uma vez que o processo de intensificação do desmatamento do Cerrado é relativamente recentemente (menos de 60 anos) e que os impactos na diversidade genética da espécie podem demorar para serem percebidos (efeito *time-lag*). Assim, nossos resultados reforçam a ideia de que a história biogeográfica do Cerrado é complexa (Silva 1997, Werneck 2011, Prado *et al.* 2012) e que estudos que abordem outros aspectos históricos e geográficos (*e.g.* áreas estáveis, história demográfica, dentre outros) são necessários para a compreensão da origem e diferenciação intra-específica desta espécie, bem como da avifauna do Cerrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Sáber, A. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul: Primeira aproximação. *Geomorfologia*, 52: 1–21.
- Ab'Sáber, A. 1983. O domínio dos cerrados: Introdução ao conhecimento. *Fundação Centro Formação do Servidor Público*, 3: 41–55.
- Ab'Sáber, A. 2003. *Os domínios de natureza no Brasil: Potencialidades paisagísticas*. 4ª ed. São Paulo: Ateliê Editorial.
- Alves, M.A.S. 1990. Social system and helping behavior in the White-Banded Tanager (*Neothraupis fasciata*). *The Condor*, 92: 470–474.
- Alves, M.A.S. 1991. Dieta e táticas de forrageamento de *Neothraupis fasciata* em Cerrado no Distrito Federal, Brasil (Passeriformes: Emberizidae). *Ararajuba*, 2: 25–29.
- Alves, M.A.S., & Cavalcanti, R.B. 1990. Ninhos, ovos e crescimento de filhotes de *Neothraupis fasciata*. *Ararajuba*, 1: 91–94.
- Avise, J.C. 1989. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology & Evolution*, 4: 279–81.
- Barrowclough, G.F. 1980. Gene flow, effective population sizes, and genetic variance components in birds. *Evolution*, 34: 789–798.
- Bates, J.M., Tello, J.G., & Silva, J.M.C. 2003. Initial assessment of genetic diversity in ten bird species of South American Cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 38: 87–94.
- Birdlife International, & NatureServe. 2014. Bird species distribution maps of the world. *The IUCN Red List of Threatened Species Version 2015-3*.
- Brooks, D.R., Mayden, R.L., & McLennan, D.A. 1992. Phylogeny and biodiversity: Conserving our evolutionary legacy. *Trends in Ecology & Evolution*, 7: 55–59.
- Broquet, T., Ray, N., Petit, E., Fryxell, J.M., & Burel, F. 2006. Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Landscape Ecology*, 21: 877–889.
- Brown, S.M., Harrisson, K.A., Clarke, R.H., Bennett, A.F., & Sunnucks, P. 2013. Limited population structure, genetic drift and bottlenecks characterize an endangered bird species in a dynamic, fire-prone ecosystem. *PLoS One*, 8: e59732–e59732.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., & Burke, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR (ed). *Molecular genetic analysis of populations*. IRL Press. pp. 225–269.

- Byers, D.L. 2005. Evolution in heterogeneous environments and the potential of maintenance of genetic variation in traits of adaptive significance. *Genetica*, 123: 107–124.
- Carson, H.L. 1959. Genetic conditions which promote or retard the formation of species. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 24: 87–105.
- Castric, V., & Bernatchez, L. 2003. The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Genetics*, 163: 983–996.
- CEMAVE. 1994. Manual de Anilhamento de Aves Silvestres. 2ª Edição. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.
- Corander, J., Sirén, J., & Arjas, E. 2008. Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics*, 23: 111–129.
- Cornuet, J.M., & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001–2014.
- Corrêa, C.L., Collevatti, R.G., & Caparroz, R. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes) with widely cross amplification in Neotropical passerines. *Journal of Heredity*, 101: 385–389.
- Coulon, A., Cosson, J.F., Angibault, J.M., Cargnelutti, B., Galan M., Morellet, N., Petit, E., Aulagnier, S., & Hewison, A.J. 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: An individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13: 2841–2850.
- Cracraft, J. 1985. Historical Biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: Areas of endemism. *Ornithological Monographs*, (36): 49–84.
- Diniz-Filho, J.A.F., Nabout, J.C., Bini, L.M., Soares, T.N., Telles, M.P.C., Marco, P., & Collevatti, R.G. 2009. Niche modelling and landscape genetics of *Caryocar brasiliense* (“Pequi” tree: Caryocaraceae) in Brazilian Cerrado: An integrative approach for evaluating central-peripheral population patterns. *Tree Genetics & Genomes*, 5: 617–627.
- Duca, C., & Marini, M.Â. 2014. Territorial system and adult dispersal in a cooperative-breeding tanager. *The Auk*, 131: 32–40.
- Earl, D.A., & vonHoldt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359–361.
- Eckert, C.G., Samis, K.E., & Loughheed, S.C. 2008. Genetic variation across species’ geographical ranges: The central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17: 1170–1188.
- Eiten, G. 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *The Botanical Review*, 38: 201–340.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.
- Evans, S.R., & Sheldon, B.C. 2008. Interspecific patterns of genetic diversity in birds: Correlations with extinction risk. *Conservation Biology*, 22: 1016–1025
- Excoffier, L., & Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–7.
- Fisher, R. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Clarendon.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126: 131–140.
- Frankham, R., Ballou, J.D., & Briscoe, D.A. 2009. *Introduction to conservation*

- genetics*. 2^a ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., Werneck, F.P., & Simons, A.M. Phylogeny and cryptic diversity in geckos (*Phyllopezus*; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America's open biomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 943–53.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485–486.
- Guarnizo, C.E., Werneck, F.P., Giugliano, L.G., Santos, M.G., Fenker, J., Sousa, L., D'Angiolella, A.B., Santos, A.R., Strüssmann, C., Rodrigues, M.T., Dorado-Rodrigues, T.F., Gambles, T., & Colli, G.R. 2016. Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (Squamata, Dactyloidae) of the Cerrado hotspot. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94: 279–289.
- Haffer, J. 1967. Notas zoogeográficas sobre las avifaunas de las regiones no forestadas de Sudamérica noroccidental. *El Hornero*, 10: 315–333.
- Haffer, J. 1985. Avian zoogeography of the Neotropical lowlands. *Ornithological Monographs*, 113–146.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4–9.
- Harrisson, K.A., Pavlova, A., Amos, J.N., Takeuchi, N., Lill, A., Radford, J.Q., & Sunnucks, P. 2012. Fine-scale effects of habitat loss and fragmentation despite large-scale gene flow for some regionally declining woodland bird species. *Landscape Ecology*, 27: 813–827.
- Holsinger, K.E., & Mason-Gamer, R.J. 1996. Hierarchical analysis of nucleotide diversity in geographically structured populations. *Genetics*, 142: 629–639.
- Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322–1332.
- IUCN. 2013. In IUCN 2013 (Ed.), *IUCN Red List of Threatened Species*. (2013.1 ed.). <www.iucnredlist.org>.
- Jenkins, D.G., Carey, M., Czerniewska, J., Fletcher, J., Hether, T., Jones, A., Knight, S., Knox, J., Long, T., Mannino, M., McGuire, M., Rifle, A., Shannon, S., Shappell, L., Sterner, A., Strickler, T., & Tursi, R. 2010. A meta-analysis of isolation by distance: Relic or reference standard for landscape genetics? *Ecography*, 33: 315–320.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., & Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, 6: 13.
- Keyghobadi, N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology*, 85: 1049–1064.
- Klink, C., & Moreira, A. 2002. Past and current human occupation, and land-use. In: Oliveira PS, Marquis RJ (eds). *The Cerrado of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna*. New York: Columbia University Press. pp. 69–88.
- Klink, C.A., & Machado, R.B. 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1: 147–155.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., & Mayrose, I. 2015. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15: 1179–1191.
- Lawton, J.H. 1993. Range, population abundance and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 409–413.

- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., & Taberlet, P. 2003. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197.
- Manica, L.T., & Marini, M.Â. 2012. Helpers at the nest of White-banded Tanager *Neothraupis fasciata* benefit male breeders but do not increase reproductive success. *Journal of Ornithology*, 153: 149–159.
- Melém-Júnior, N.J., Neto, J.T.F., & Yokomizo, G.K.I. 2003. Caracterização dos Cerrados do Amapá. *Comunicado Técnico Embrapa Amapá*, 105: 105–108.
- Mittermeier, J.C., Zyskowski, K., Stowe, E.S., & Lai, J.E. 2010. Avifauna of the Sipaliwini savanna (Suriname) with insights into its biogeographic affinities. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 51: 97–122.
- MMA. 2007. Biodiversidade do Cerrado e Pantanal: Áreas e ações prioritárias para conservação. *Série Biodiversidade 17*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Moritz, C. 1994. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9: 373–375.
- Moritz, C., & Faith, D.P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7: 419–429.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A., & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853–858.
- Novaes, R.M.L., Ribeiro, R.A., Lemos-Filho, J.P., & Lovato, M.B. 2013. Concordance between phylogeographical and biogeographical patterns in the Brazilian Cerrado: Diversification of the endemic tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). *PLoS One*, 8: e82198–e82198.
- Oliveira, C.P. 2009. *O método de avaliação por múltiplos critérios como apoio ao planejamento ambiental: Aplicação experimental no Cerrado central do Amapá, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Amapá.
- Pamilo, P. 1988. Genetic variation in heterogeneous environments. *Annales Zoologici Fennici*, 25: 99–106.
- Parker III, T.A., Stotz, D.F., & Fitzpatrick, J.W. 1996. Neotropical birds: Ecology and conservation. In: DF Stotz, Fitzpatrick JW, III TAP, Moskovits DK, editors. *Ecological and distributional databases*. Chicago, IL.: University of Chicago Press.
- Pichorim, M., Silva, M., Rodrigo, B., & França, D.A. 2014. A Cerrado bird community in the northernmost portion of northeastern Brazil - recommendations for conservation. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 22: 347–362.
- Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J.M. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502–503.
- Prado, C.P.A., Haddad, C.F.B., & Zamudio, K.R. 2012. Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Molecular Ecology*, 21: 921–941.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Prugh, L.R., Hodges, K.E., Sinclair, A.R.E., & Brashares, J.S. 2008. Effect of habitat area and isolation on fragmented animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 20770–20775.
- Ratter, J.A., Bridgewater, S., & Ribeiro, J.F. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: Comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany*, 60: 153–180.

- Ridgely, R.S., & Tudor, G. 1989. *The birds of South America. Vol 1, The Oscine Passerines*. Austin: University of Texas Press.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Roos, A.L. 2010. Capturando Aves. In: Matter SV., Straube FC, Accordi I, Piacentin V, Cândido-Jr. FJ (eds). *Ornitologia e conservação: Ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento*. Rio de Janeiro: Technical Books Editora.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Sagarin, R., & Gaines, S. 2002. The “abundant centre” distribution: To what extent is it a biogeographical rule? *Ecology Letters*, 5: 137–147.
- Sagarin, R.D., Gaines, S.D., & Gaylord, B. 2006. Moving beyond assumptions to understand abundance distributions across the ranges of species. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 524–530.
- Sano, E.E., Rosa, R., Brito, J.L.S., & Ferreira, L.G. 2010. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 166: 113–124.
- Santos, M.G., Nogueira, C., Giugliano, L.G., & Colli, G.R. 2014. Landscape evolution and phylogeography of *Micrablepharus atticolus* (Squamata, Gymnophthalmidae), an endemic lizard of the Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography*, 41: 1506–1519.
- Segelbacher, G., Cushman, S.A., Epperson, B.K., Fortin, M.J., Francois, O., Hardy, O.J., Holderegger, R., Taberlet, P., Waits, L.P., & Manel, S. 2010. Applications of landscape genetics in conservation biology: Concepts and challenges. *Conservation Genetics*, 11: 375–385.
- Sick, H. 1984. *Ornitologia Brasileira, uma introdução*. Brasília: Editora Universidade de Brasília.
- Silva, J. 1995. Biogeographic analysis of the South American Cerrado avifauna. *Steenstrupia*, 21: 49–67.
- Silva, J.F., Fariñas, M.R., Felfili, J.M., & Klink, C.A. 2006. Spatial heterogeneity, land use and conservation in the Cerrado region of Brazil. *Journal of Biogeography*, 33: 536–548.
- Silva, J.M.C. 1997. Endemic bird species and conservation in the Cerrado Region, South America. *Biodiversity and Conservation*, 6: 435–450.
- Silva, J.M.C., & Bates, J.M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna hotspot. *Bioscience*, 52: 225 – 233.
- Storfer, A., Murphy, M. A., Spear, S.F., Holderegger, R., & Waits, L.P. 2010. Landscape genetics: Where are we now? *Molecular Ecology*, 19: 3496–3514.
- Telles, M.P.C., Dobrovolski, R., Souza, K.S., Lima, J.S., Collevatti, R.G., Soares, T.N., Chaves, L.J., & Diniz-Filho, J.A.F. 2014. Disentangling landscape effects on population genetic structure of a Neotropical savanna tree. *Natureza & Conservação*, 12: 65–70.
- Telles, M.P.D.C., Diniz-Filho, J.A.F., Bastos, R.P., Soares, T.N., Guimarães, L.D.A., & Lima, L. 2007. Landscape genetics of *Physalaemus cuvieri* in Brazilian Cerrado: Correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. *Biological Conservation*, 139: 37–46.
- Tubelis, D.P., & Cavalcanti, R.B. 2000. A comparison of bird communities in natural and disturbed non-wetland open habitats in the Cerrado's central region, Brazil. *Bird Conservation International*, 10: 331–350.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., & Shipley, P. 2004. Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in

- microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- Werneck, F.P. 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30: 1630–1648.
- Werneck, F.P., Nogueira, C., Colli, G.R., Sites, J.W., & Costa, G.C. 2012. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: Implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography*, 39: 1695–1706.
- Winker, K., Graves, G.R., & Braun, M.J. 2000. Genetic differentiation among populations of a migratory songbird: *Limnothlypis swainsonii*. *Journal of Avian Biology*, 31: 319–328.
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16: 97–159.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.
- Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations, vol.2: The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press.

CAPÍTULO III

**INFLUÊNCIA DOS EVENTOS CLIMÁTICOS DO QUATERNÁRIO NA
FILOGEOGRAFIA DE UMA AVE ENDÊMICA DO CERRADO
(*NEOTHRAUPIS FASCIATA*, AVES: THRAUPIDAE)**



RESUMO

A diversidade genética avaliada em um nível intra-específico produz informações importantes sobre os padrões espaciais e temporais da estrutura da população, auxiliando na compreensão dos processos ecológicos e evolutivos envolvidos. Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi realizar o estudo filogeográfico de *Neothraupis fasciata*, uma ave endêmica do Cerrado, e testar diferentes hipóteses que podem estar relacionadas com a diferenciação intra-específica desta espécie. Para tal, indivíduos amostrados em distintas localidades de sua distribuição no Cerrado e nas savanas do Amapá foram sequenciados utilizando um conjunto de dados mitocondrial e nuclear. Com base neste conjunto de dados foi avaliada a diversidade genética das localidades amostradas e a estrutura genética populacional, a correlação entre os índices de diversidade genética e os gradientes geográficos, a hipótese de isolamento por distância, a correlação entre a estabilidade climática durante o Quaternário e os índices de diversidade, além de testes demográficos. Os resultados sobre diversidade genética e distribuição dos haplótipos basais apontam a porção sul da distribuição como provável área de origem da espécie. A estrutura genética encontrada indica uma estruturação histórica na possível área de origem da espécie, possivelmente em decorrência da perda de adequabilidade climática histórica entre as populações identificadas. Os testes demográficos indicam um processo recente de expansão demográfica, que teria contribuído tanto para o reestabelecendo o fluxo gênico entre as localidades ao sul da distribuição atual quanto para a colonização/recolonização da porção norte do Cerrado. Com base nos resultados obtidos foram encontradas evidências para a conexão entre a população disjunta e as demais localidades via corredor Central da Amazônia. Adicionalmente, não encontramos suporte para as hipóteses de isolamento por distância e de maior diversidade genética nas áreas estáveis. Por fim, discutimos como nossos resultados podem auxiliar na conservação da espécie, com foco principal na população disjunta nas savanas do Amapá.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é a maior formação savânica da América do Sul e o segundo maior bioma brasileiro, com aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados (Eiten 1972, Silva 1995, Machado *et al.* 2004). Com cobertura vegetal variada, possui desde fitofisionomias campestres até florestais, sendo a vegetação típica deste bioma, o cerrado *stricto sensu*, associada aos solos bem drenados (*e.g.* Eiten 1972, Ratter *et al.* 1997). O Cerrado caracteriza-se por abrigar elevada diversidade biológica, alto endemismo para alguns grupos de animais e plantas e por ser um dos biomas mais devastados do Brasil, sendo então classificado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (Myers 2000, Mittermeier *et al.* 2011, Marchese 2015).

A elevada biodiversidade desta savana tem sido relacionada principalmente aos eventos geológicos e climáticos do Terciário e às flutuações climáticas do Quaternário (*e.g.* Silva 1995, Colli 2005, Werneck *et al.* 2012a, Turchetto-Zollet *et al.* 2013). Mais especificamente, os principais eventos de diversificação da herpetofauna do Cerrado estão ligados ao Terciário (Giugliano *et al.* 2007, Werneck *et al.* 2009, Maciel *et al.* 2010, Werneck *et al.* 2012b) enquanto a diversificação/estruturação de espécies de plantas (Ramos *et al.* 2007) e invertebrados (Moraes *et al.* 2009) do Cerrado deve ter sido influenciada principalmente pelos eventos climáticos do Quaternário.

Dentre os principais eventos do Terciário podemos citar a diferenciação climática latitudinal e formação de províncias florísticas, o soerguimento da cordilheira dos Andes, a grande transgressão marinha do Mioceno e o soerguimento do Planalto Central Brasileiro (revisado por Colli 2005). Pinheiro e Monteiro (2010) também ressaltam que os eventos climáticos durante o Terciário tardio foram relevantes na determinação das características morfológicas, fisionômicas e florísticas do Cerrado. Assim, os eventos geomorfológicos e climáticos do Terciário resultaram na criação e/ou alteração de conexões e barreiras para o fluxo gênico que possivelmente influenciaram na evolução biótica.

Em relação ao Quaternário podemos destacar as flutuações climáticas, sendo que durante os períodos mais secos e frios a distribuição do Cerrado deve ter expandido em direção às formações florestais, enquanto nos períodos quentes e úmidos houve uma retração na área do Cerrado (*e.g.* Bigarella *et al.* 1975, Gottsberger & Morawetz 1986, Van der Hammen & Absy 1994, Silva 1995, Behling & Lichte 1997, Ledru 2002, Behling 2002). Estes eventos cíclicos de expansão e retração das formações abertas e

florestais no Quaternário são considerados importantes na diversificação da fauna do Cerrado (e.g. Silva 1995, Silva & Bates 2002, Werneck 2011). As variações climáticas do Quaternário também influenciaram a conexão entre as savanas da América do Sul, sendo proposto que a conexão entre as savanas ao norte e sul da Amazônia tenha se dado em períodos secos pelo corredor Andino, corredor Central Amazônico e/ou corredor Costeiro Atlântico (revisado por Silva 1995).

A diversidade genética avaliada em um nível intra-específico produz informações importantes sobre os padrões espaciais e temporais da estrutura da população, auxiliando na compreensão dos processos ecológicos e evolutivos responsáveis por esses padrões (Avice 2000). Dentre os fatores que podem influenciar a distribuição geográfica da variabilidade genética de uma espécie podemos destacar o fluxo gênico, expansão da área de distribuição e contatos secundários. Para espécies em que o equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética é atingido, o padrão de isolamento por distância é esperado quando os indivíduos apresentam capacidade de dispersão limitada (Wright 1943, Jenkins *et al.* 2010). Neste sentido, hipótese de isolamento por distância pode ser caracterizada como um padrão de variação na distância genética em função da distância geográfica (Wright 1943, Jenkins *et al.* 2010). A expansão da área de distribuição de uma espécie pode resultar em uma distribuição clinal da diversidade genética em decorrência de sucessivos eventos fundador ao longo da rota de colonização (ou recolonização), resultando na redução da variabilidade no sentido da expansão (Merila *et al.* 1997, Gillespie & Roderick 2014). Por fim, com o reestabelecimento do fluxo gênico entre populações parcial ou completamente isoladas (contato secundário) é esperada uma assinatura genética indicando um aumento da diversidade genética no sentido em que a expansão se deu em maior intensidade. Essa hipótese é levantada considerando que populações que recebem migrantes tenham um aumento na diversidade genética, em função dos alelos novos que podem ser inseridos pelos migrantes (Gillespie & Roderick 2014).

Na área da filogeografia, a modelagem de nicho tem sido aplicada como forma de explorar a influência das variações climáticas na distribuição histórica da espécie e como essa variação pode ter refletido na distribuição da variabilidade genética (Carstens & Richards 2007, Knowles *et al.* 2007). Assim, esta ferramenta tem ganhado destaque na proposição de hipóteses filogeográficas. O princípio da modelagem do nicho ecológico de uma espécie leva em consideração a sua distribuição conhecida, refletindo suas preferências ecológicas (Peterson 2001). Desta forma, são identificadas as

diferentes características ambientais relacionadas à sobrevivência de uma espécie e seus possíveis efeitos sobre a distribuição geográfica em diferentes cenários climáticos.

Ao longo de uma escala temporal são esperadas quebras da adequabilidade climática em partes da distribuição da espécie, levando à formação de manchas de habitat favorável, denominados refúgios. Assim, é possível que em determinadas partes da distribuição potencial de uma espécie a adequabilidade ocorra durante todos os períodos avaliados formando áreas estáveis, enquanto em outras partes da distribuição a adequabilidade estaria restrita à algumas séries temporais. De forma geral, é esperado que em áreas estáveis sejam encontradas populações com alta diversidade genética, além de forte estrutura filogeográfica entre as áreas de refúgios (Hewitt 2004, Carnaval *et al.* 2009). Em contrapartida, populações de áreas não estáveis apresentariam menor diversidade genética em decorrência de eventos de extinção e recolonização (Hewitt 2004, Carnaval *et al.* 2009).

Apesar da alta biodiversidade, poucos aspectos sobre a avifauna do Cerrado têm sido estudados, destacando-se os estudos sobre a biologia reprodutiva das espécies (*e.g.* Alves & Cavalcanti 1990, Medeiros & Marini 2007, Marini *et al.* 2009, 2012) e a estrutura e composição das comunidades nas diferentes fitofisionomias ou em áreas remanescentes (*e.g.* Tubelis & Cavalcanti 2000, Marini 2001, Motta-Júnior *et al.* 2008, Manica *et al.* 2010). Nesta perspectiva, existe uma lacuna no conhecimento sobre os processos e padrões que influenciaram a distribuição espacial e temporal da diversidade genética da avifauna associada ao Cerrado (revisado por Turchetto-Zollet *et al.* 2013).

O tiê-do-cerrado, *Neothraupis fasciata* (Lichtenstein, 1823), é uma espécie de ave da ordem Passeriformes e família Thraupidae, considerada endêmica do Cerrado (Pichorim *et al.* 2014). Único representante do gênero, *N. fasciata* ocupa as regiões sul do Maranhão e Piauí, sul de Minas Gerais, norte de São Paulo e oeste do Mato Grosso, além do leste da Bolívia e nordeste do Paraguai (Ridgely & Tudor 1989). E ainda, existe registro de populações disjuntas desta espécie nas savanas Amazônicas do escudo da Guiana (Silva 1995, Mittermeier *et al.* 2010). De forma geral, esta espécie habita as fitofisionomias abertas do Cerrado (Ridgely & Tudor 1989, Alves 1991, Sick 2001), é residente e territorialista (Alves 1990, Alves & Cavalcanti 1990) e apresenta baixo potencial de dispersão (Duca & Marini 2014). Desde 2004, o tiê-do-cerrado é considerado quase ameaçado pela IUCN (*near threatened*; IUCN 2013), uma vez que é geralmente escasso na sua área de distribuição e considera-se que apresenta declínio moderadamente rápido em resposta à perda e degradação de habitat. Do ponto de vista

genético, o Capítulo II indica uma estrutura genética moderada para *Neothraupis fasciata*, que não foi explicada pelos fatores avaliados, como a heterogeneidade de habitat, o isolamento por distância, a distribuição central ou periférica das populações, ou até mesmo o processo recente de fragmentação do Cerrado, sugerindo um processo histórico de estruturação genética da espécie.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo filogeográfico de *N. fasciata* ao longo do Cerrado e das Savanas do Amapá com o intuito de testar hipóteses relacionadas à diversificação da biodiversidade nas formações savânicas neotropicais. De forma mais específica, com base em um conjunto de dados mitocondrial e nuclear e na modelagem de nicho ecológico para a espécie, avaliamos: (1) a hipótese de isolamento por distância, sendo esperado um aumento na diferenciação genética entre as populações em função do aumento da distância geográfica entre estas; 2) a influência das flutuações climáticas do Quaternário na distribuição das áreas adequadas para a espécie e seus efeitos na sua história demográfica, sendo esperado; (a) aumento no tamanho efetivo populacional em decorrência da expansão das áreas adequadas, e (b) redução na diversidade genética no sentido da expansão e/ou aumento na diversidade genética em decorrência do reestabelecimento do fluxo gênico entre populações historicamente isoladas; (3) a hipótese de estabilidade climática como um preditor da diversidade genética das populações, sendo esperada maior diversidade genética nas áreas estáveis do que nas não-estáveis; e (4) a possível rota de conexão entre o Cerrado e as savanas Amazônicas, sendo esperada uma menor diferenciação genética e maior compartilhamento de haplótipos entre a população isolada na savana Amazônica e a população no Cerrado mais próxima de onde o corredor se estabeleceu.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem molecular

Amostras de tecido ou sangue de 137 indivíduos de *N. fasciata* foram obtidas em coleções ornitológicas e em expedições ao campo, totalizando 11 localidades amostradas (Fig. 3.1). Amostras de tecido conservadas em etanol absoluto provenientes de Uruçuí (URUC) e Brasilândia de Minas (BRMI) foram obtidas junto ao Museu Paraense Emílio Goeldi. Em relação às expedições de campo, foram amostradas nove localidades, sendo estas: Área de Proteção Ambiental das Bacias do Gama e Cabeça de Veado (AGCV), Estação Ecológica de Águas Emendadas (EEAE), Fazenda

Experimental da Embrapa Macapá (MACA), Nova Xavantina (NXAV), Parque Nacional Chapada dos Guimarães (PNCG), Parque Nacional Serra da Canastra (PNSC), Parque Nacional das Emas (PNEM), Parque Nacional Grande Sertão Veredas (PGSV) e Ponte Alta do Tocantins (PATO).

Os pontos de amostragem dentro de cada localidade foram selecionados de acordo com a preferência da espécie por fitofisionomias abertas, como campo sujo e o cerrado *stricto sensu* (Sick 2001). A captura dos indivíduos em campo foi realizada com rede de neblina e uso de *playback*, sendo que de cada indivíduo foi coletada uma amostra de sangue (50-100µL) da veia braquial com uso de um tubo capilar sem heparina, posteriormente armazenado em microtubos contendo etanol absoluto. Todos os indivíduos amostrados em campo foram marcados com anilhas metálicas cedidas pelo CEMAVE e soltos após a coleta das amostras.

A autorização para a execução das atividades foi emitida pelo ICMBio (SISBIO n° 27682-1) e os métodos de obtenção das amostras foram avaliados e autorizados pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (UnBDoc n° 75111/2013).

Modelagem da distribuição potencial

Os cenários de distribuição potencial de *N. fasciata* foram gerados usando o algoritmo de máxima entropia implementado no programa MAXENT (Phillips *et al.* 2006). O algoritmo escolhido prevê a distribuição da espécie usando conjuntamente dados ambientais e climáticos com os dados de ocorrência (presença) da espécie. Dados de ocorrência georreferenciados de *N. fasciata* foram obtidos por meio de registros de coleções ornitológicas, de trabalhos de campo do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília, e de artigos científicos e no Global Biodiversity Information Facility (GBIF, disponível em <http://www.gbif.org/>). Para estimar a adequabilidade do habitat utilizamos os dados de altitude e bioclimáticos disponibilizados pelo WorldClim (disponível em <http://www.worldclim.org/>), sendo que os dados bioclimáticos incluem 19 variáveis que representam padrões anuais, sazonais e fatores ambientais extremos ou limitantes relacionados à precipitação e temperatura (BIO1 – BIO19, Anexo 3.1).

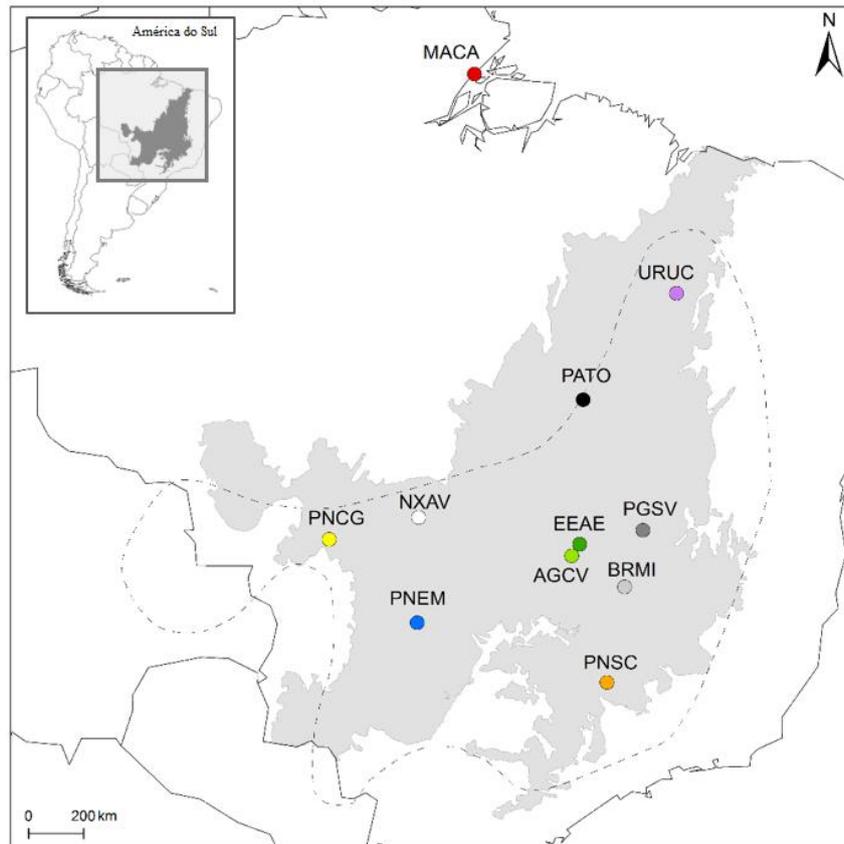


Figura 3.1. Pontos de amostragem de *Neothraupis fasciata* no Cerrado e savanas Amazônicas. Em destaque a delimitação da distribuição da espécie segundo a IUCN (linha tracejada) e a abrangência do Cerrado segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) (área em cinza). As siglas correspondem às seguintes localidades: Área de Proteção Ambiental das Bacias do Gama e Cabeça de Veado (AGCV), Brasilândia de Minas (BRMI), Estação Ecológica de Águas Emendadas (EEAE), Fazenda Experimental da Embrapa Macapá (MACA), Nova Xavantina (NXAV), Parque Nacional Chapada dos Guimarães (PNCG), Parque Nacional Serra da Canastra (PNSC), Parque Nacional das Emas (PNEM), Parque Nacional Grande Sertão Veredas (PGSV), Ponte Alta do Tocantins (PATO) e Uruçuí (URUC).

A simulação da distribuição atual da espécie foi realizada para três modelos iniciais, sendo estes: (M1) modelo contendo todas as variáveis bioclimáticas e altitude, (M2) modelo contendo as variáveis não colineares usando um valor de corte menos restritivo e (M3) modelo contendo as variáveis não colineares usando um valor de corte mais restritivo. Os valores das variáveis BIO1 – BIO19 e altitude foram extraídos para todos os pontos de ocorrência obtidos e para identificar as variáveis colineares que deveriam ser excluídas de cada modelo foi usada a função *vif* (*Variance inflation factor*) do pacote *USDM*, sendo a função menos restritiva *vifcor* ($th=0,9$) e a mais restritiva

vifstep ($th=10$), como proposto por Dormann e colaboradores (2012). Para avaliar qual o melhor modelo para o período atual utilizamos o valor de AUC, que avalia a habilidade do modelo em discriminar entre os locais em que a espécie está presente contra aqueles na qual está ausente (Elith *et al.* 2006). O uso do AUC tem sido extensivamente empregado em trabalhos sobre a modelagem da distribuição de espécies e seus valores variam entre 0 e 1, sendo valores inferiores a 0,5 indicativos de uma performance pior do que o acaso, valores iguais a 0,5 considerados como não diferentes do acaso e valores próximos a 1 indicando uma excelente performance do modelo (Elith *et al.* 2006).

Tendo como base o modelo selecionado para o presente, foram construídos os cenários de distribuição potencial de *N. fasciata* para o Holoceno médio (6 mil anos atrás - ka), o Último Máximo Glacial (LGM 21 ka) e o Último Interglacial (LIG ~120 – 140 ka). Para os três períodos foi utilizado o modelo de circulação geral estimados pela *Community Climate System Model* (CCSM), além do modelo de circulação geral estimado pela *Model for Interdisciplinary Research on Climate-Earth System Model* (MIROC-ESM) para o Holoceno e LGM. Para utilizar mesma resolução em todos os períodos avaliados foi utilizada uma base de dados com resolução espacial de 2,5 arc-minutos, aproximadamente 5 km. Desta forma, os dados períodos LIG foram transformados da resolução 30 arc-segundos para 2,5 arc-minutos utilizando a média dos valores de cada variável com a ferramenta *aggregate* do programa ARCMAP 10.1 (Esri).

Para avaliar a presença/ausência das áreas adequadas foi aplicada a regra de limiar baseada no *equal training sensitivity and specificity* para todos os modelos. Para as simulações dos períodos com duas bases de dados (Holoceno e LGM) o cenário final para o respectivo período foi construído considerando a área consenso entre os modelos de presença/ausência obtidos para cada base de dados. Em seguida, a delimitação das áreas estáveis foi realizada por meio da sobreposição de todos os cenários de presença/ausência obtidos. Assim, áreas de adequabilidade climática concordantes ao longo de todos os cenários foram definidas como estáveis durante o Quaternário. Todos os mapas foram gerados utilizando o programa ARCMAP .

Extração, amplificação e sequenciamento

O DNA total das amostras de sangue foi extraído utilizando o procedimento padrão de digestão com proteinase K seguida de purificação com fenol, clorofórmio e álcool

isoamílico (25:24:1) e precipitação em etanol absoluto, de acordo com o proposto por Bruford e colaboradores (1992). Para as amostras provenientes de museus a extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen) e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Os dados moleculares foram obtidos a partir da amplificação de um fragmento de DNA mitocondrial, o gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2), e outro nuclear, o íntron 5 do gene β -fibrinogênio (FIB-5). A amplificação dos fragmentos via reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando os iniciadores LMET (J. Groth *apud* Ribas *et al.* 2005) e H6313 (Sorenson *et al.* 1999) para o ND2 e os iniciadores FIB5 e FIB6 (Marini & Hackett 2002) para o FIB-5. Cada reação de PCR foi realizada utilizando 30ng DNA, 2,5mM de dNTP, 30mM Cloreto de Magnésio, 1mM de cada iniciador, 1X de tampão e meia unidade de Taq polimerase, em um volume final de reação de 10 μ L. Os ciclos de PCR consistiram em desnaturação inicial de 300 segundos à 95°C; 35 ciclos de 60 segundos à 95°C, 45 segundos à 52°C, 60 segundos à 72°C; e extensão final de 600 segundos à 72°C. O sucesso da amplificação e a qualidade dos produtos obtidos foi avaliada por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1,2% e a visualização sob transiluminador de luz ultravioleta. O produto amplificado foi purificado usando 0,1 unidade de exonuclease e 1 unidade de SAP e posteriormente sequenciado utilizando BigDye V3.1 (Applied Biosystems) com eletroforese no sequenciador automatizado ABI 3130 (Applied Biosystems) na Universidade Católica de Brasília.

Para cada indivíduo a sequência consenso dos fragmentos sequenciados foi obtida utilizando o programa GENEIOUS PRO (Geneious Co., Wellington, New Zealand), sendo os sítios heterozigotos do fragmento nuclear denominados segundo o código da IUPAC. Além de altamente variáveis, sequências intrônicas também podem apresentar variação no comprimento total do fragmento em decorrência de eventos de inserção e deleção (*indel*) (Lewin 1997). Para a reconstrução das sequências dos indivíduos heterozigotos para o *indel* utilizamos a metodologia descrita no Anexo 3.2. O alinhamento das sequências consenso foi obtido implementando o algoritmo Muscle implementado no programa GENEIOUS PRO. Posteriormente, a fase gamética dos genótipos nucleares foi resolvida utilizando o DnaSPPhase implementado pelo programa DNASP 5.10 (Librado & Rozas 2009).

Conjunto de dados moleculares

Durante o processo de obtenção das sequências do fragmento mitocondrial foram encontradas algumas dificuldades na plataforma de sequenciamento utilizada, resultando na não obtenção deste fragmento para 43 indivíduos amostrados. Por outro lado, todos os indivíduos amostrados foram sequenciados para o fragmento nuclear. Para obter o máximo de informação sobre a variação genética existente foram geradas matrizes de dados contendo todos os indivíduos sequenciados por marcador (matrizes completas). Para fins de comparação, também foi gerada uma terceira matriz contendo os indivíduos que foram sequenciados para os dois marcadores, sendo necessário reduzir a matriz do FIB-5 (Anexo 3.3). Por fim, BRMI e NXAV foram excluídas das análises e comparações no nível de localidade devido ao baixo tamanho amostral ($N \leq 2$).

Caracterização da diversidade genética

Índices de diversidade. – Os índices de diversidade genética foram calculados por localidade amostrada, e no conjunto destas, com base no número de sítios variáveis (S), número de haplótipos (h), número de haplótipos únicos (Uh) e diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (π), calculados no programa DNASP.

Rede de haplótipos. – Para representar a variação interespecífica as redes de haplótipos são, na maioria das vezes, mais informativas do que árvores filogenéticas, uma vez que haplótipos ancestrais podem estar presentes e as reticulações da rede de haplótipos tem uma performance melhor considerando a incerteza na relação ancestral-descendente (Mardulyn 2012). Desta forma, a relação entre os haplótipos da matriz de dados completa do fragmento mitocondrial e matrizes completa e reduzida do fragmento nuclear foi avaliada utilizando o algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999) no programa POPART 1.7 (Leigh & Bryant 2015). A frequência de cada haplótipo também foi avaliada espacialmente usando o mesmo programa.

Estrutura genética

A diferenciação genética entre os pares de populações (Φ_{ST}) foi calculada utilizando o programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010). A estrutura genética de *N. fasciata* foi determinada utilizando a Análise Espacial de Variância Molecular no programa SAMOVA 2.0 (Dupanloup *et al.* 2002). Esta abordagem define os grupos de

populações (K) de forma a minimizar a diferenciação dentro do grupo e maximizar a diferença entre grupos (Dupanloup *et al.* 2002). A SAMOVA avalia os índices hierárquicos de fixação entre populações (Φ_{ST}), entre populações dentro do grupo (Φ_{SC}) e entre grupos (Φ_{CT}), obtidos via análise de variância molecular (AMOVA) com valor de significância avaliado empregando 1.000 permutações. Para cada conjunto de dados foram conduzidas análises com o valor inicial de K igual a 2 até o valor máximo de 8 grupos, usando o valor de condições iniciais igual a 100. Considerando os modelos de evolução disponíveis no SAMOVA foi utilizado o Tamura-Nei (93) para o ND2 e Tamura para o FIB-5, sendo estes os mais próximos dos modelos selecionados no programa JMODELTEST 2.1.3 (Darriba *et al.* 2012) empregando o critério bayesiano (BIC). Para identificar o valor máximo de grupos foi avaliado o valor de Φ_{SC} , uma vez que a subdivisão das populações em mais grupos não é desejável quando o valor de Φ_{SC} atinge o valor positivo mais próximo a zero, indicando que o máximo de diferenciação entre os grupos foi obtido (Rodríguez-Robles *et al.* 2010). Desta forma, os valores Φ_{SC} e K foram representados graficamente para avaliar o melhor número de grupos formados a partir das localidades amostradas.

Estimativa de tempo do ancestral comum mais recente (TMRCA)

A estimativa do TMRCA foi realizada utilizando o processo de coalescência no programa BEAST 1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007). Considerando os modelos implementados pelo BEAST, foi utilizado o modelo Tamura-Nei (TN93) para conjunto de dados mitocondrial, Hasegawa-Kishino-Yano com sítios invariáveis (HKY+I) para a matriz nuclear completa e Tamura-Nei com sítios invariáveis (TN93+I) para a matriz nuclear reduzida. Análises coalescentes necessitam de um modelo demográfico, sendo os modelos de tamanho constante, crescimento exponencial, crescimento logístico e crescimento por expansão os mais comuns (Drummond *et al.* 2005). Contudo, é necessário escolher previamente entre os modelos disponíveis, sob o risco de nenhum dos modelos se encaixar adequadamente no conjunto de dados. Desta forma, foi utilizado o método "*bayesian skyline*", que é uma alternativa para estimar a dinâmica populacional ao longo do tempo sem a dependência de escolher um modelo paramétrico específico para a história demográfica (Drummond *et al.* 2005). O método do relógio molecular estrito foi empregado, uma vez que este é mais apropriado para dados intraespecíficos (Ho & Duchêne 2014). A taxa de substituição empregada foi de 0,009 substituições por sítio por milhão de anos para o ND2 (Pacheco *et al.* 2011), e de 0,0036

substituições por sítio por milhão de anos para o FIB-5 (Axelsson *et al.* 2004). Ao todo foram realizadas 100 milhões de gerações para cada conjunto de dados e a convergência das cadeias foi analisada utilizando o valor do *effective sample size* (ESS) no programa TRACER 1.4 (Rambaut & Drummond 2003). O valor mínimo aceitável de ESS foi de 200, como indicado no manual do programa. Após o descarte das primeiras 20 milhões de gerações a árvore consenso da maioria foi gerada para acessar o suporte dos clados considerando a probabilidade posterior e também para estimar o tempo do ancestral comum mais recente da espécie. Para tal, a distribuição posterior dos clados foi resumida no programa TREEANNOTATOR 1.8.1 e as árvores visualizadas utilizando o FIGTREE 1.4.2.

Influência dos padrões geográficos na distribuição da diversidade genética

Para testar a hipótese de isolamento por distância foi empregado o teste de Mantel, que tem por objetivo avaliar se a distância genética entre as localidades é correlacionada com a distância geográfica. O teste de Mantel foi realizado separadamente para cada marcador na plataforma on-line IBD WEB SERVICE 3.23 (IBDWS; Jensen *et al.* 2005), utilizando a distância genética linearizada ($\Phi_{ST}/1 - \Phi_{ST}$) e o log da distância geográfica euclidiana. A distância euclidiana entre os pares de localidades foi calculada utilizando a ferramenta on-line disponibilizada pelo Instituto Brasileiro de Pesquisas Espaciais (<http://www.dpi.inpe.br/calcula/>). O suporte estatístico do teste foi avaliado por meio de de 30 mil permutações também no programa IBDWS.

A relação entre a diversidade genética e os gradientes latitudinal e longitudinal foi avaliada para cada marcador no programa PAST 3.11 (Hammer *et al.* 2001). Para tal foram realizadas regressões dos valores de diversidade ($\% \pi$ e Hd) em função da latitude e longitude da respectiva localidade (grau decimal) empregando coeficiente de Spearman no programa PAST.

Influência das áreas estáveis na diversidade genética

Para avaliar a hipótese de maior diversidade genética nas áreas estáveis em comparação às áreas não-estáveis foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis no programa PAST, sendo a variável explicativa a estabilidade climática da localidade e as variáveis resposta diversidade nucleotídica e diversidade haplotípica. Para tal, as localidades amostradas foram classificadas com base na sua posição geográfica em relação às áreas estáveis. As comparações foram realizadas separadamente para cada matriz de dados.

História demográfica

Para avaliar possíveis variações no tamanho populacional em cada localidade amostrada, e no conjunto destas, foram utilizados testes de neutralidade. Desvios da neutralidade seletiva foram averiguados pelos testes D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu (Fu 1997) no programa DNASP. A estatística R_2 de Ramos-Onsins e Rozas (2002) também foi calculada para avaliar a hipótese de expansão populacional. Estes testes são sensíveis à expansão e contração populacional sendo que valores negativos e significativos de D e F_s ou valores próximos à zero de R_2 indicam expansão populacional recente, enquanto o declínio populacional está associado a valores positivos dos testes de neutralidade ou valores altos de R_2 . O suporte estatístico dos testes foi obtido através de 10.000 simulações de coalescência no programa DNASP.

A história demográfica também foi avaliada utilizando o método de coalescência com base no modelo *bayesian skyline plot*, previamente descrito. Para tal, a reconstrução gráfica do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo foi realizada utilizando a variante linear no programa TRACER.

Conexão entre o Cerrado e as savanas Amazônicas

As rotas de dispersão entre as savanas Amazônicas e o Cerrado durante as mudanças climáticas do Quaternário possivelmente ocorreram pelos seguintes corredores: (1) Andino, (2) Central Amazônico e/ou (3) Costeiro Atlântico (revisado por Silva 1995). Para avaliar a rota de dispersão mais provável, foi avaliada a diferenciação genética (Φ_{ST}) entre MACA, que faz parte de um fragmento de savana Amazônica, e outras três localidades distribuídas no Cerrado, sendo estas: corredor Andino - PNCG, ponto amostral localizado na parte sudoeste da distribuição atual; corredor Central da Amazônia - PATO, localizada próximo à área centro-norte de distribuição; e corredor Costeiro Atlântico - URUC, localidade próxima ao extremo norte da distribuição. Também foi avaliado o padrão de compartilhamento de haplótipos entre MACA e as demais localidades.

RESULTADOS

Modelagem da distribuição potencial

Considerando as diferentes bases de dados avaliadas foi compilado um total de 162 pontos de ocorrência de *N. fasciata* (Anexo 3.4). A distribuição dos pontos de

ocorrência abrange quatro países sul-americanos, sendo estes Brasil, Paraguai, Suriname e Bolívia. Contudo, a maior parte dos registros de ocorrência desta espécie se concentra no Cerrado brasileiro (Fig. 3.2).

O teste de colinearidade considerando o critério menos restritivo (M2) mostrou que as variáveis BIO 2 – 4, 7, 9, 12 –15, 18 –19 e altitude deveriam ser mantidas, enquanto o critério mais restritivo (M3) manteve as variáveis BIO 2 – 4, 8, 13, 15 e 18 – 19. A partir dos registros de ocorrência obtidos, o modelo que apresentou o maior valor de AUC foi o M1 (AUC = 0,951) (Fig. 3.3), além de não serem observadas grandes diferenças na curva de omissão entre os cenários testados. Considerando o maior valor de AUC e que o cenário obtido pelo M1 foi o mais concordante com a distribuição atual conhecida da espécie (Fig. 3.3) decidimos utilizar este modelo para as simulações dos demais períodos.

As simulações para o Quaternário sugerem que partindo do LIG para o período atual houveram tanto eventos de maior conexão quanto fragmentação das áreas adequadas, mais especificamente:

- LIG - em relação ao período atual, o LIG apresentou uma área adequada mais fragmentada, principalmente na porção norte da distribuição potencial e uma maior faixa de habitat adequada na à oeste da distribuição e na porção central da Amazônia (Fig. 3.4a);
- LGM - foi observado um aumento da conexão entre as áreas adequadas em relação ao LIG, mesmo utilizando o consenso entre as duas bases de dados modeladas para o período. Este aumento na conexão e possível aumento na área de distribuição da espécie foi observado principalmente na faixa central e norte da distribuição, com uma pequena redução das áreas adequadas na parte sul da distribuição (Fig. 3.4b);
- Holoceno - parece ter sido o período menos favorável climaticamente para *N. fasciata*. A distribuição potencial no Holoceno foi a mais fragmentada, marcada pelo isolamento das populações à oeste e leste da distribuição atual da espécie e por uma faixa de habitat adequado na porção central do Cerrado seguindo o sentido norte-sul (Fig. 3.4c).

Assim, foi observada uma maior conexão das áreas adequadas entre o LIG e o LGM, seguido por um processo de fragmentação entre o LGM e o Holoceno.

Posteriormente observa-se novamente expansão da distribuição potencial, com reconexão das áreas adequadas entre o Holoceno e o período atual (Fig. 3.4, Anexo 3.5).

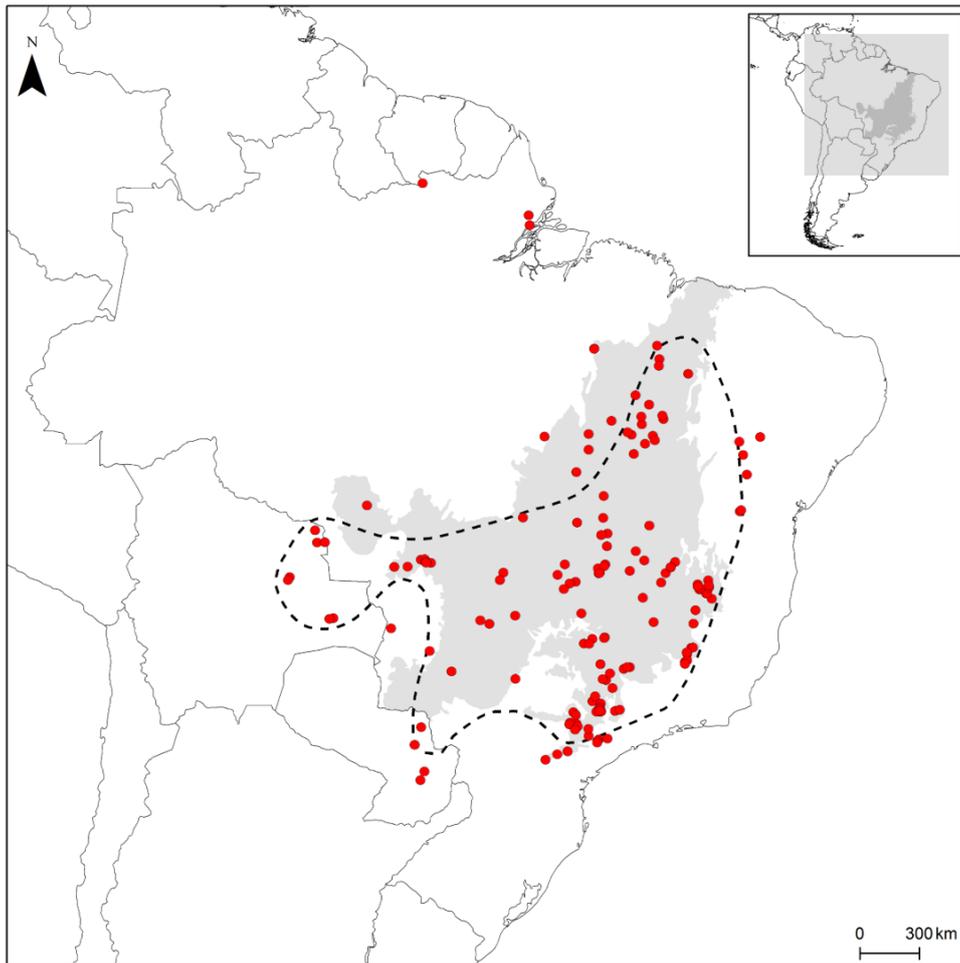


Figura 3.2. Pontos de ocorrência de *Neothraupis fasciata* utilizados na modelagem de nicho ecológico. A linha tracejada indica a distribuição da espécie de acordo com a Birdlife International e NatureServe (2014). Em cinza a área de abrangência do Cerrado de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2004).

As áreas que apresentam maior probabilidade de estabilidade durante o Quaternário são mostradas na Figura 3.5. Estas áreas estáveis são distribuídas principalmente no Planalto dos Guimarães (I), do Planalto da Caiapônia e Planalto Central da Bacia do Paraná (II) e da Serra Geral de Goiás e Planalto Central Brasileiro (III) (Fig. 3.5). Em relação aos pontos de amostragem, PGSV, AGCV, EEAE, PNEM e PNCG estão localizadas ao longo das áreas estáveis, enquanto MACA, URUC, PATO e PNSC estão localizadas em áreas sem adequabilidade climática em, pelo menos, um dos períodos avaliados.

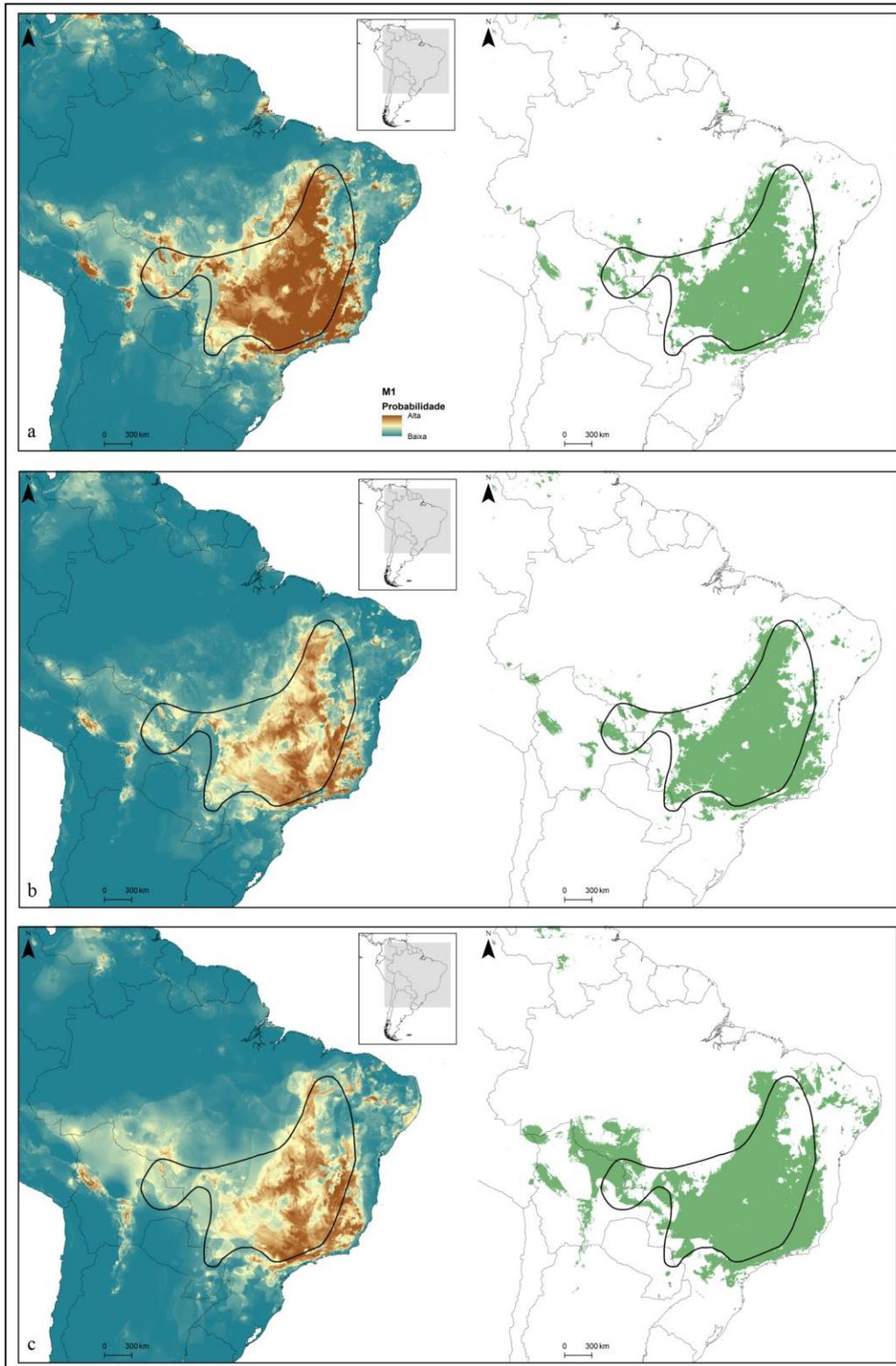


Figura 3.3. Distribuição potencial de *Neothraupis fasciata* com base em modelagem de nicho ecológico para o período atual. A linha tracejada indica a distribuição conhecida da espécie de acordo com a BirdLife International e NatureServe (2014). Áreas de maior adequabilidade climática são representadas pela cor laranja (mapa da esquerda) e em verde (mapa da direita após aplicar o limiar). a) M1 - modelo completo; b) M2 - modelo excluindo variáveis colineares utilizando o critério menos restritivo; e c) M3 - modelo excluindo variáveis colineares utilizando o critério mais restritivo.

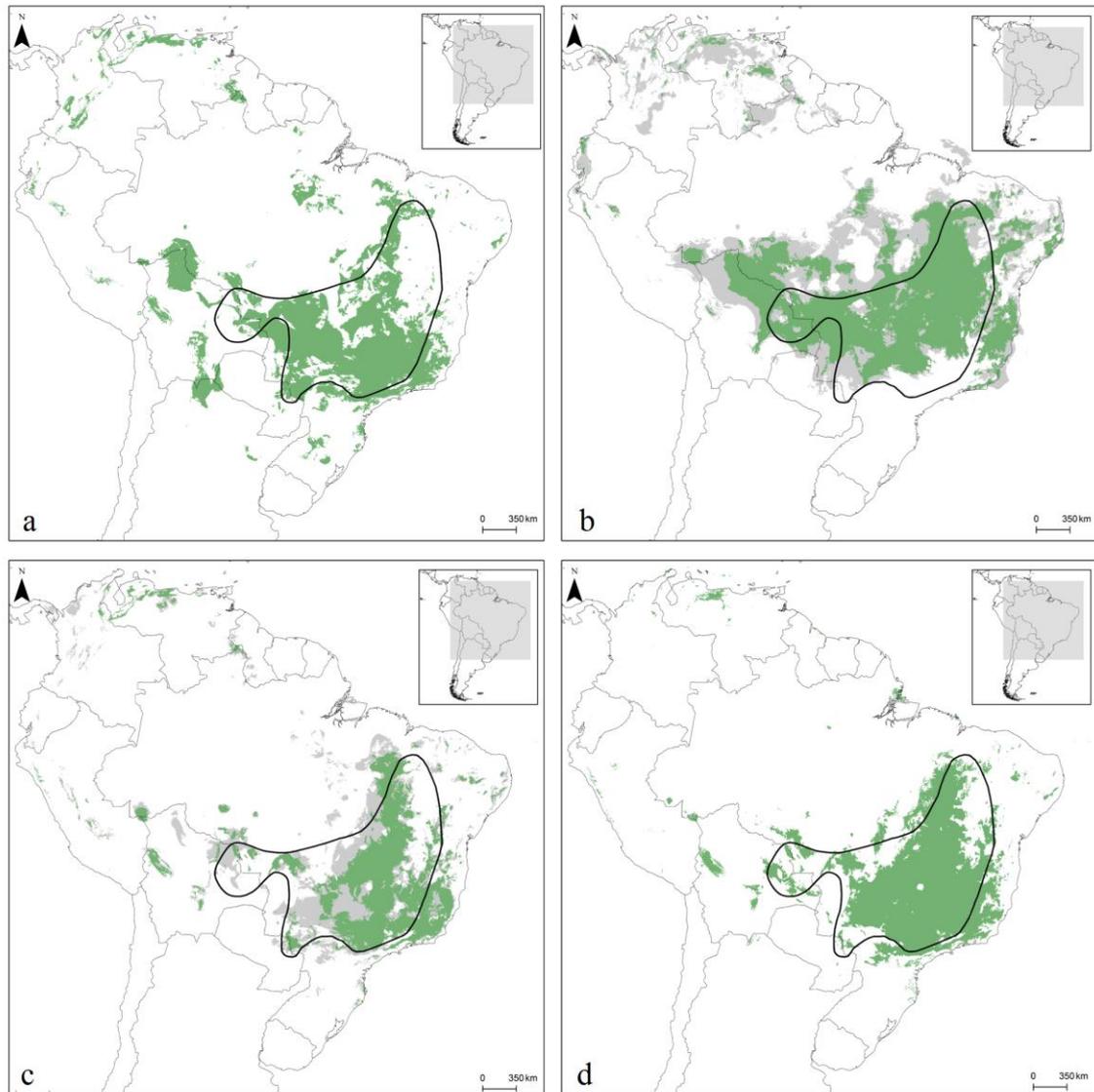


Figura 3.4. Projeção da adequabilidade climática para a espécie *Neothraupis fasciata* para três períodos do Quaternário - (a) Último Interglacial (LIG ~120 – 140 ka), (b) Último Máximo Glacial (LGM 21 ka) e (c) Holoceno médio (6 mil anos atrás - ka) - além do período atual (d). Em verde a área adequada aplicando o limiar *equal training sensitivity and specificity*. Para os períodos LGM e Holoceno a cor verde representa a área consenso entre as duas bases de dados utilizadas (MIROC ou CCSM4), enquanto a cor cinza indica adequabilidade climática para apenas uma base de dados. A linha preta delimita a distribuição conhecida da espécie de acordo com a BirdLife International e NatureServe (2014).

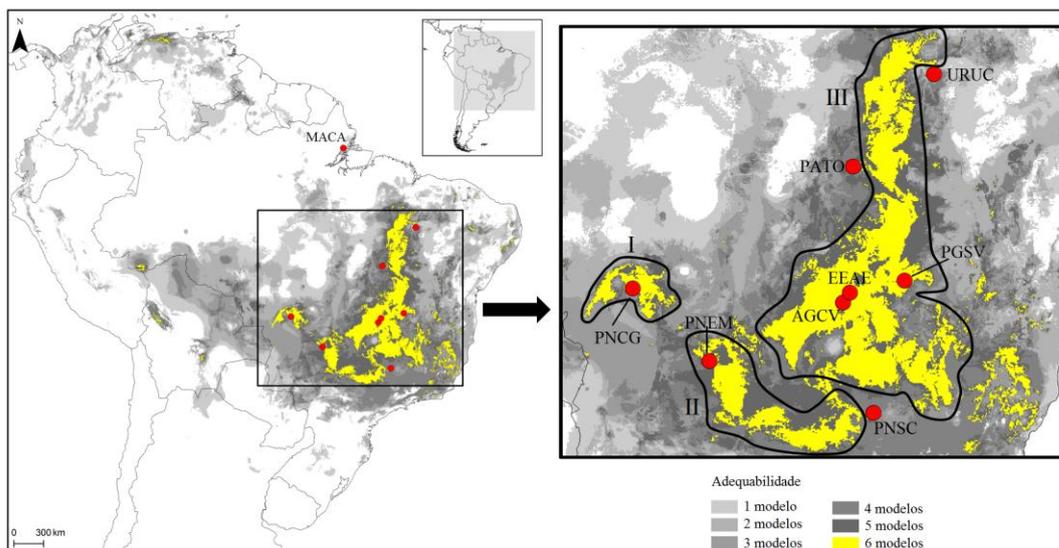


Figura 3.5. Áreas de estabilidade climática para *Neothraupis fasciata*. As áreas estáveis estão distribuídas principalmente no Planalto dos Guimarães (I), do Planalto da Caiapônia e Planalto Central da Bacia do Paraná (II) e da Serra Geral de Goiás e Planalto Central Brasileiro (III). Os pontos vermelhos indicam as localidades amostradas. Para o nome das localidades ver Figura 3.1.

Caracterização da diversidade genética

NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2). – No total foram avaliados 94 indivíduos para este marcador, sendo que a matriz de dados completa constituiu em um alinhamento de 866 pb desconsiderando as posições com dados faltantes. A partir desta matriz foram identificados 48 sítios polimórficos, correspondendo à aproximadamente 5% dos sítios analisados. Como esperado, não foram encontrados *gaps* no conjunto de dados mitocondrial, assim como não foram encontrados códons de parada. Com base na matriz de dados, foram observados 32 haplótipos, variando entre 1 e 8 haplótipos por localidade amostrada (Tabela 3.1). A proporção de haplótipos únicos corrigida pelo total de haplótipos amostrados por localidade foi maior em PNEM (75% de haplótipos únicos), enquanto o menor valor foi observado em MACA e URUC (nenhum haplótipo único amostrado). A diversidade haplotípica foi maior nas localidades EEAE ($Hd = 0,952$) e PATO ($Hd = 0,909$) enquanto a diversidade nucleotídica foi maior em PGSV ($\% \pi = 0,69$) e PNSC ($\% \pi = 0,48$). O valor de diferenciação par-a-par (Φ_{ST}) variou entre -0,04 e 0,37 (Tabela 3.2). Dentre todas as comparações apenas duas foram estatisticamente significativas após a correção de Bonferroni: MACA e AGCV ($\Phi_{ST} = 0,23$; $p = 0,0006$) e PNSC e AGCV ($\Phi_{ST} = 0,21$; $p = 0,0000$).

Tabela 3.1. Esforço amostral (N) e índices de diversidade genética por localidade e marcador. Tamanho do fragmento (pb), número de sítios segregantes (*S*), haplótipos (*H*) e haplótipos únicos (*Uh*), diversidade haplotípica (*Hd*) e diversidade nucleotídica expressa em porcentagem ($\% \pi$). Para o nome das localidades ver Figura 3.1.

Localidade	ND2							FIB-5 matriz completa							FIB-5 matriz reduzida						
	N	pb	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>Uh</i>	<i>Hd</i>	$\% \pi$	N	pb	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>Uh</i>	<i>Hd</i>	$\% \pi$	N	pb	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>Uh</i>	<i>Hd</i>	$\% \pi$
AGCV	13	885	9	8	5	0,897	0,310	35	473	10	8	2	0,752	0,280	13	487	4	5	1	0,702	0,222
BRMI	1	942		1	0			2	487	1	2	0	0,667	0,137	1	487	1	2	0	1,000	0,205
EEAE	7	915	7	6	2	0,952	0,260	7	487	4	5	0	0,824	0,269	7	487	4	5	1	0,824	0,269
MACA	8	895	1	2	0	0,536	0,060	8	487	2	4	0	0,692	0,217	8	487	2	4	0	0,692	0,217
NXAV	2	942	3	2	1	1,000	0,318	2	487	2	3	0	0,833	0,240	2	487	2	3	0	0,833	0,240
PATO	11	932	8	7	4	0,909	0,203	18	473	11	12	4	0,824	0,509	11	473	8	7	0	0,714	0,520
PGSV	21	905	17	8	5	0,848	0,687	28	473	10	10	3	0,816	0,537	21	473	7	7	1	0,812	0,590
PNCG	6	896	7	6	4	1,000	0,260	10	487	5	6	1	0,674	0,235	6	487	2	3	0	0,621	0,171
PNEM	9	915	12	4	3	0,583	0,291	11	473	9	7	2	0,714	0,464	9	473	9	7	1	0,739	0,513
PNSC	9	942	11	3	2	0,722	0,478	9	473	7	6	0	0,725	0,492	9	473	7	6	1	0,725	0,492
URUC	7	942	1	2	0	0,476	0,051	7	473	7	5	1	0,758	0,358	7	473	7	5	1	0,758	0,358
<i>Total</i>	94	866	48	32		0,858	0,483	137	473	17	25		0,776	0,397	94	473	12	16		0,762	0,423

Tabela 3.2. Diferenciação genética com base no marcador mitocondrial (diagonal inferior) e distância geográfica euclidiana em quilômetros (diagonal superior) entre as localidades amostradas. Para o nome das localidades ver Figura 3.1.

	AGCV	EEAE	MACA	PATO	PNCG	PNEM	PGSV	PNSC	URUC
AGCV		54	1794	560	858	596	267	521	991
EEAE	-0,005		1770	525	900	650	218	546	943
MACA	0,231	0,286		1265	1795	2046	1790	2315	1147
PATO	0,118	0,088	0,113		1046	1017	526	1068	501
PNCG	0,367	0,309	0,338	0,335		456	1115	1114	1538
PNEM	0,059	0,037	0,243	0,039	0,207		860	682	1510
PGSV	0,109	0,054	0,169	0,044	0,252	-0,041		598	840
PNSC	0,218	0,125	0,210	0,160	0,260	0,044	-0,020		1437
URUC	0,038	0,102	0,458	-0,001	0,285	0,039	0,007	0,104	

Íntron 5 do gene β -fibrinogênio (FIB-5). – De forma geral, o alinhamento das sequências nucleares mostrou a presença de dois blocos de *indel*, sendo o primeiro com 10 pb de comprimento e o segundo com 4 pb de comprimento, separados entre si por 37 pb (Fig. 3.6). O grupo externo (*Diuca diuca*) apresentou o mesmo padrão das sequências de menor comprimento, sugerindo que esta variação pode ser uma condição ancestral para a espécie.

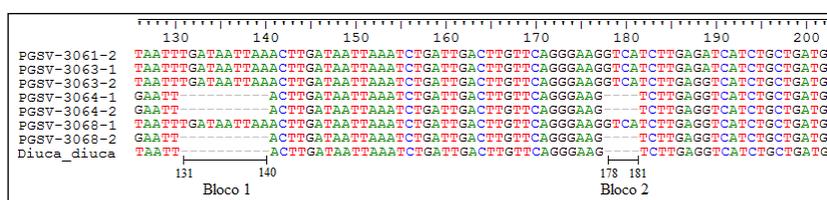


Figura 3.6. Representação do *indel* observado no alinhamento das fases haplotípicas do FIB-5 para indivíduos de *Neothraupis fasciata* e do grupo externo *Diuca diuca*.

A matriz de dados completa do fragmento nuclear foi composta de 137 indivíduos (274 haplótipos após reconstruir a fase haplotípica) com 487 pb após a exclusão dos sítios com dados faltantes. Ao todo foram obtidos 17 sítios polimórficos e 25 haplótipos, variando entre 2 e 12 haplótipos por localidade amostrada (Tabela 3.1). A proporção de haplótipos únicos foi maior em PATO (0,33), enquanto nenhum haplótipo único foi observado em BRMI, EEAE, MACA, NXAV e PNSC. O maior valor de diversidade haplotípica foi obtido em EEAE e PATO ($Hd = 0,824$) e o menor em PNCG ($Hd = 0,674$). A diversidade nucleotídica foi menor em MACA ($\% \pi = 0,217$), enquanto o maior valor foi observado em PGSV ($\% \pi = 0,537$). As comparações de Φ_{ST} par-a-par variaram entre -0,036 e 0,137, sendo que nenhuma das comparações foi significativa após aplicação de correção de Bonferroni (Tabela 3.3).

A matriz de dados reduzida consistiu em 94 indivíduos (188 sequências) com 487pb após a exclusão das posições com dados faltantes. Com base nesta matriz foram observados 12 sítios polimórficos e 16 haplótipos, entre 2 e 7 haplótipos por localidade. O número de haplótipos únicos corrigido pelo esforço amostral foi maior em PNEM (0,43), enquanto nenhum haplótipo único foi observado em BRMI, MACA, NXAV, PATO e PNCG. A diversidade haplotípica foi maior em EEAE ($Hd = 0,82$) e menor em PNCG ($Hd = 0,62$), enquanto diversidade nucleotídica foi maior em PGSV e menor em PNCG ($Hd = 0,59$ e $0,17$, respectivamente). As comparações de Φ_{ST} par-a-par variaram entre -0,04 e 0,15 e não foram significativas após aplicação de correção de Bonferroni (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Diferenciação genética entre as localidades amostradas considerando a matriz de dados nuclear completa (diagonal inferior) e reduzida (diagonal superior). Para o nome das localidades ver Figura 3.1.

	AGCV	EEAE	MACA	PATO	PNCG	PNEM	PGSV	PNSC	URUC
AGCV		-0,039	0,006	0,089	0,093	0,131	0,090	0,034	-0,003
EEAE	-0,036		0,027	0,074	0,077	0,148	0,083	0,025	-0,013
MACA	0,012	0,027		0,059	0,081	0,089	0,027	0,012	0,052
PATO	0,031	0,012	0,017		0,014	0,019	-0,033	-0,010	0,000
PNCG	0,057	0,038	0,043	-0,010		0,131	0,035	-0,021	0,020
PNEM	0,116	0,137	0,073	0,046	0,099		-0,002	0,093	0,080
PGSV	0,078	0,068	0,009	-0,010	0,016	0,002		-0,005	0,023
PNSC	0,039	0,025	0,012	-0,026	-0,030	0,106	-0,006		-0,020
URUC	0,003	-0,013	0,052	-0,027	-0,010	0,093	0,019	-0,020	

Rede de haplótipos. – A rede dos haplótipos mitocondriais indica a existência de três grupos: haplogrupo 1 (*mt1*) - representado por haplótipos amostrados em PGSV e BRMI; haplogrupo 2 (*mt2*) - composto por indivíduos amostrados em PNSC e PNEM; e haplogrupo 3 (*mt3*) - composto por um haplótipo central com alta frequência e compartilhado pela maioria das localidades, com 1 a 3 nucleotídeos de diferença dos demais haplótipos, sugerindo um evento de expansão demográfica (Fig. 3.7). Conectando o *mit3* aos demais haplogrupos podemos observar haplótipos amostrados em PNCG (Fig. 3.7, *mt HAP_25* e *26*). A rede de haplótipos do FIB-5 foi similar entre o conjunto de dados completo e reduzido (Fig. 3.7), sendo caracterizada por três haplótipos amplamente distribuídos entre as localidades, dos quais derivam haplótipos com até duas bases de diferença.

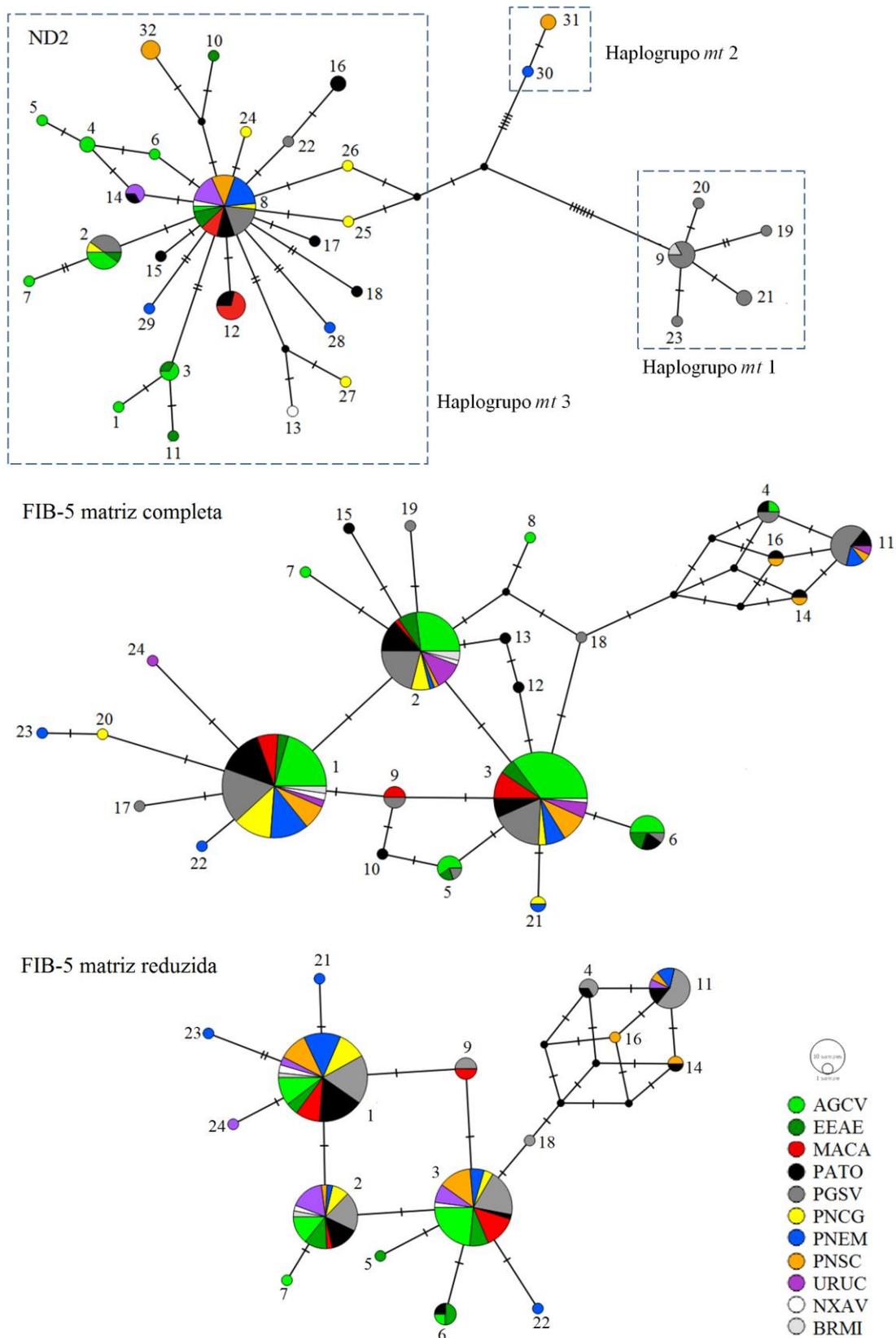


Figura 3.7. Rede de haplótipos para o fragmento mitocondrial (ND2) e para o nuclear (FIB-5). Os resultados do FIB-5 são mostrados tanto para a matriz de dados completa quando reduzida. Os haplogrupos identificados estão delimitados pela linha tracejada. Para o nome das localidades ver Figura 3.1.

Estrutura genética

De acordo com o resultado obtido pelo teste SAMOVA o menor valor positivo de Φ_{SC} para o marcador mitocondrial foi obtido considerando $K = 4$ (Fig. 3.8). Desta forma, as localidades amostradas podem ser subdividas em quatro grupos genéticos, dos quais três são compostos por uma única população MACA (grupo *mitA*), PGSV (grupo *mitB*) e PNSC (grupo *mitC*) e o terceiro grupo formado pelas demais localidades (grupo *mitD* - EEAE, AGCV, PNCG, PNEM, PATO, URUC) (Tabela 3.4). Para o arranjo obtido, aproximadamente 31% da variação genética está distribuída entre grupos, menos de 1% entre populações dentro dos grupos e cerca de 69% dentro dos grupos (Tabela 3.4). O valor de Φ_{CT} para este arranjo foi de 0,31 ($p = 0,016$), o Φ_{ST} foi de 0,31 ($p = 0,000$) e o Φ_{SC} foi de 0,001 ($p = 0,002$).

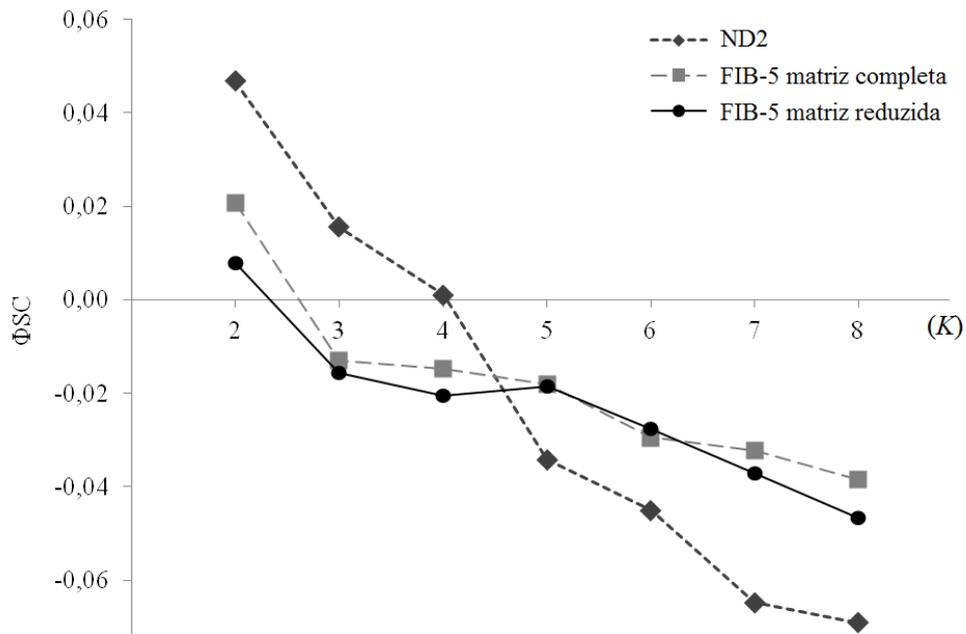


Figura 3.8. Valor de diferenciação entre populações dentro do grupo (Φ_{SC}) em relação ao número de grupos testados (K) pelo teste SAMOVA para cada marcador utilizado.

Para o marcador FIB-5 o teste SAMOVA apresentou suporte para dois grupos genéticos para as duas matrizes de dados analisadas (Fig. 3.8). Contudo, a composição dos grupos obtidos foi diferente entre as duas matrizes de dados utilizadas: para o conjunto de dados completo o primeiro grupo foi constituído apenas por PNCG (grupo *nucCA*) e o segundo pelas demais localidades amostradas (grupo *nucCB*). Já para a matriz de dados reduzida o primeiro grupo foi composto por PATO, PGSV, PNEM e PNSC (grupo *nucRA*) e o segundo grupo por AGCV, EEAE, MACA, PNCG e URUC

(grupo *nucRB*) (Tabela 3.4). O arranjo decorrente do conjunto de dados completo resultou em aproximadamente 5% da variação genética distribuída entre grupos, menos de 2% entre populações dentro dos grupos e cerca de 93% dentro dos grupos (Tabela 3.4). O valor observado de Φ_{CT} foi de 0,052 ($p = 0,109$), $\Phi_{ST} = 0,072$ ($p = 0,005$) e $\Phi_{SC} = 0,021$ ($p = 0,048$). Para o arranjo baseado na matriz de dados reduzida foi observado aproximadamente 6% de variação genética entre grupos, menos de 1% entre populações dentro dos grupos e cerca de 93% dentro dos grupos (Tabela 3.4). O valor observado de Φ_{CT} foi de 0,06 ($p = 0,009$), de $\Phi_{ST} = 0,068$ ($p = 0,016$) e $\Phi_{SC} = 0,007$ ($p = 0,219$).

Estimativa de tempo do ancestral comum mais recente

A topologia recuperada pelo consenso de maioria para cada marcador está representada na Figura 3.9. Para o marcador mitocondrial (ND2) foram encontrados três cladogramas principais: o primeiro clado é composto pelos haplótipos do haplogrupo *mt1*, apresentando posição basal em relação aos demais cladogramas; o segundo clado constitui o grupo irmão do clado basal e corresponde ao haplogrupo *mt2*; e o terceiro clado representa o haplogrupo *mt3*, com haplótipos distribuídos ao longo de todas as localidades amostradas e posição mais derivada em relação aos demais cladogramas e diversas politomias representando os ramos terminais. Em geral, para o FIB-5 foram encontrados dois cladogramas principais que refletem a divergência entre as sequências (*e.g.* presença de *indel*), sendo observados indivíduos de diversas localidades em ambos os cladogramas. Assim, não existe uma clara correspondência geográfica entre os cladogramas e localidades amostradas para o FIB-5. De forma geral, a maioria dos nós apresentaram baixo suporte estatístico e se concentraram nos últimos 100 mil anos para ambos os marcadores (Fig. 3.9 área destacada em cinza).

O TMRCA com base no conjunto de dados mitocondrial foi estimado em 0,69 milhão de anos (ma) (95% HPD = 1,03 – 0,39 ma), indicando a diversidade genética amostrada vem sendo acumulada no Quaternário. Para o marcador nuclear, o TMRCA foi de 1,82 ma (95% HPD = 3,84 – 0,47 ma) para a matriz de dados completa e de 1,92 ma (95% HPD = 4,57 – 0,41 ma) para a matriz reduzida. Em ambas estimativas, o TMRCA estimado remete ao Quaternário. Considerando o intervalo de confiança, a datação do FIB-5 compreende ao intervalo entre o Plioceno e Pleistoceno.

Tabela 3.4. Análise de Variância Molecular dos grupos genéticos de *Neothraupis fasciata* obtidos pelo teste SAMOVA. As localidades que fazem parte de cada grupo identificado estão indicadas entre colchetes. As estatísticas correspondem à soma dos quadrados (SS), porcentagem de variação (Var %) e valor de significância (*p*). Para o nome das localidades ver Figura 3.1.

Estrutura Populacional	Fonte da variação	SS	Var %	<i>p</i>
ND2				
[PGSV] [PNSC] [MACA] [EEAE, AGCV, PNCG, PNEM, PATO, URUC]	Entre grupos	44,02	30,82	0,01662
	Entre localidades dentro dos grupos	8,23	0,07	0,00293
	Dentro da localidade	133,79	69,11	0,00000
FIB-5 matriz completa				
[PNCG] [AGCV, EEAE, MACA, PATO, PGSV, PNEM, PNSC, URUC]	Entre grupos	3,37	5,27	0,10948
	Entre localidades dentro dos grupos	10,68	1,96	0,04888
	Dentro da localidade	243,64	92,77	0,00587
FIB-5 matriz reduzida				
[PATO, PGSV, PNEM, PNSC] [AGCV, EEAE, MACA, PNCG, URUC]	Entre grupos	7,04	6,07	0,00880
	Entre localidades dentro dos grupos	8,07	0,74	0,21994
	Dentro da localidade	173,04	93,19	0,01662

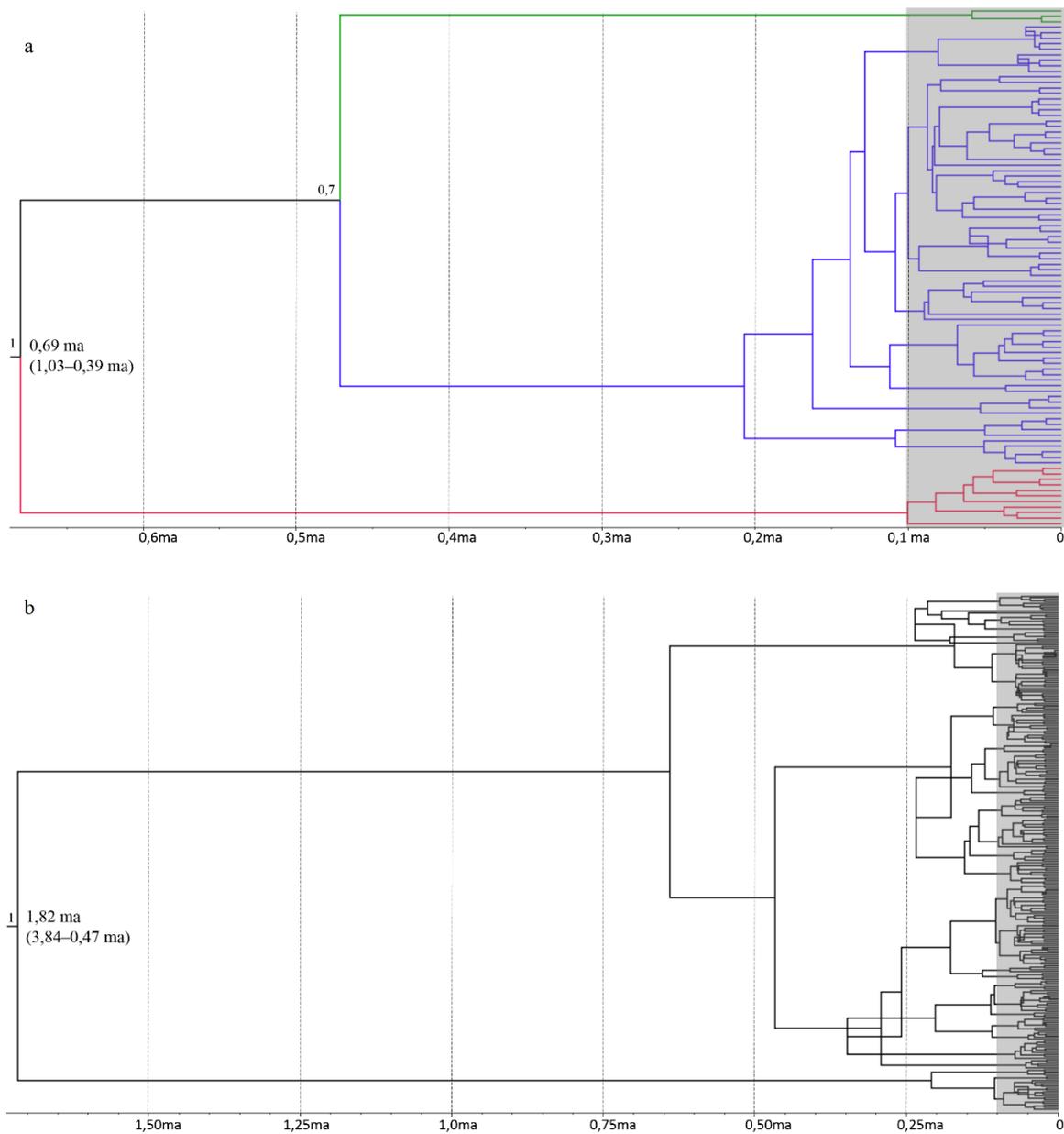


Figura 3.9. Árvores de coalescência para os marcadores mitocondrial (a) e nuclear (b). Para o marcador mitocondrial (a) as cores dos clados principais representam os haplogrupos *mt1* (vermelho), *mt2* (verde) e *mt3* (azul) identificados na Figura 3.7. O tempo para o ancestral comum mais recente (TMRCA) está indicado na parte interna do nó. Na parte externa do nó o valor de probabilidade posterior. Entre parênteses o intervalo de confiança (95%HPD). Destacado em cinza o intervalo de entre 0 e 0,1 milhão de anos atrás (ma).

Padrões geográficos de distribuição da diversidade genética

A hipótese nula de ausência na correlação entre a distância geográfica e distância genética não foi rejeitada no teste de Mantel para nenhum dos marcadores analisados (ND2 $r = 0,139$; $p = 0,191$; FIB-5 matriz completa $r = 0,061$; $p = 0,39$; FIB-5 matriz reduzida $r = 0,090$; $p = 0,342$). Assim, distância geográfica não parece exercer influência significativa no nível de diferenciação genética observada entre as localidades amostradas.

De forma geral, considerando os dados mitocondriais foi observada uma correlação negativa entre diversidade genética e a latitude, indicando uma redução na diversidade em direção à latitude 0° (Tabela 3.5 e Anexo 3.6). Para este gradiente norte sul, o resultado foi estatisticamente significativo considerando a diversidade nucleotídica. Para o marcador nuclear foi encontrada uma tendência positiva entre o gradiente longitudinal e os índices de diversidade, sendo esta variação caracterizada pela redução da diversidade haplotípica no sentido leste para oeste (Tabela 3.5 e Anexo 3.6). Os resultados significativos, ou mariginalmente significativos, foram encontrados para as correlações entre os índices de diversidade e o gradiente longitudinal tanto para a matriz completa quanto reduzida do marcador FIB-5.

Tabela 3.5. Testes de correlação de Spearman para os gradientes geográficos e diversidade genética para a espécie *Neothraupis fasciata*. Os resultados indicam o coeficiente de correlação (r_s) e o valor de significância (p) para as diversidades nucleotídica ($\% \pi$) e diversidade haplotípica (H_d) em função da latitude e longitude.

Correlação	ND2		FIB-5 matriz completa		FIB-5 matriz reduzida	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
latitude e $\% \pi$	-0,711	0,037	-0,216	0,551	-0,066	0,868
latitude e H_d	-0,250	0,521	0,108	0,783	-0,133	0,708
longitude e $\% \pi$	0,050	0,903	0,616	0,076	0,577	0,109
longitude e H_d	-0,350	0,358	0,706	0,033	0,617	0,076

Influência das Áreas Estáveis na Diversidade Genética

De forma geral, a diversidade genética de *N. fasciata* não apresentou relação significativa com a posição geográfica das localidades amostradas em relação às áreas estáveis e não estáveis tanto para o marcador mitocondrial ($\% \pi$: $H = 2,16$; $p = 0,11$ e H_d : $H = 2,16$; $p = 0,141$) quanto nuclear (matriz completa $\% \pi$: $H = 0,06$; $p = 0,806$ e H_d : $H = 0,015$; $p =$

0,902; matriz reduzida $\% \pi$: $H = 0,135$; $p = 0,712$ e Hd : $H = 0,24$; $p = 0,624$). Assim, a hipótese de maior diversidade genética nas áreas estáveis foi rejeitada em todos os testes empregados.

História demográfica

De forma geral, os testes de neutralidade empregados indicam um evento de expansão demográfica recente para espécie (Tabela 3.6). O conjunto de dados mitocondrial analisado na forma de uma única população apresentou suporte estatístico para expansão demográfica para todos os testes empregados. Dentre os grupos identificados no SAMOVA, apenas o *mitD* apresentou valores significativos para os testes D , F_s e R_2 . Considerando a matriz completa do marcador nuclear foi encontrado suporte estatístico para expansão demográfica recente com base no teste F_s para todas as localidades analisadas conjuntamente e para o grupo *nucCB*, enquanto nenhum dos demais testes empregados foram significativos. Pela análise da matriz reduzida não se obteve resultado significativo para expansão populacional em nenhum dos testes realizados.

Tabela 3.6. Testes de neutralidade D de Tajima, F_s de Fu e R_2 de Ramos Onsins e Rozas, obtidos a partir conjunto de dados mitocondrial (ND2) e nuclear (FIB-5) considerando todas as localidades amostradas conjuntamente (Total) e para os grupos genéticos identificados para a espécie *Neothraupis fasciata*.

População	D	F_s	R_2
ND2			
<i>mitA</i>	1,16	0,86	0,26
<i>mitB</i>	1,16	1,68	0,17
<i>mitC</i>	0,52	4,09	0,20
<i>mitD</i>	-2,37*	-18,30*	0,03*
Total	-1,76*	-16,05*	0,04*
FIB-5 matriz completa			
<i>nucCA</i>	-0,58	-1,86	0,11
<i>nucCB</i>	-0,77	-10,30*	0,05
Total	-0,79	-11,52*	0,05
FIB-5 matriz reduzida			
<i>nucRA</i>	0,85	-1,58	0,12
<i>nucRB</i>	-1,03	-2,38	0,07
Total	-0,07	-3,93	0,08

* $p < 0,02$

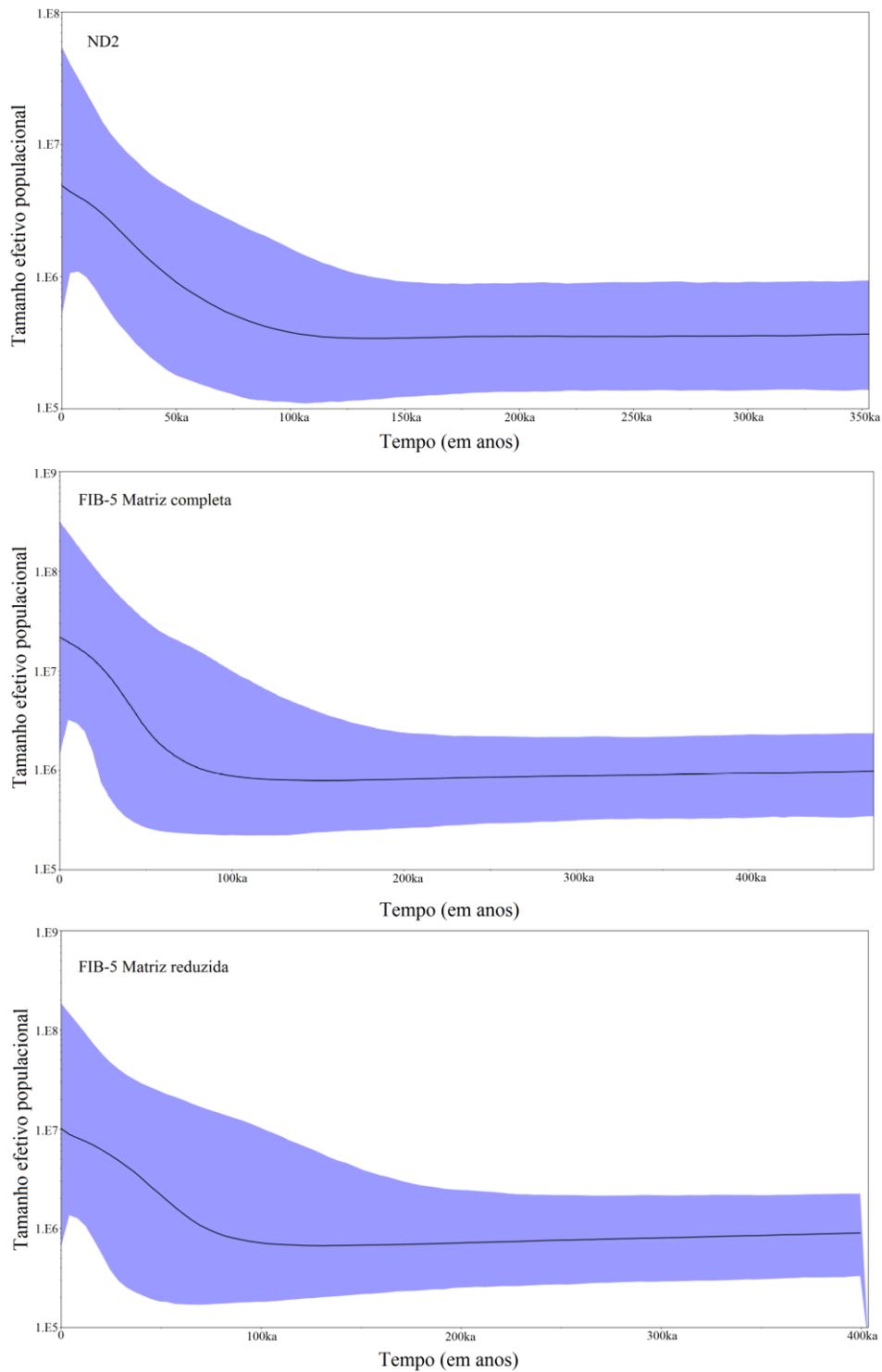


Figura 3.10. Análise da mudança no tamanho populacional efetivo em função do tempo (escala em mil anos atrás - ka) para *Neothraupis fasciata*. A linha contínua indica a mediana do tamanho populacional efetivo em escala logarítmica, enquanto o o intervalo de confiança é indicado em azul.

A reconstrução gráfica do *bayesian skyline plot* do fragmento do ND2 indicou um tamanho efetivo populacional constante durante o período entre 350 e 100 ka, seguido por um evento de expansão populacional com início há aproximadamente 90 ka, que se intensificou há cerca de 50 ka, persistindo até o presente (Fig. 3.10). Para o marcador nuclear observamos um padrão semelhante entre a matriz de dados completa e reduzida (Fig. 3.10). Em geral foi observado um aumento no tamanho efetivo populacional nos últimos 75 ka, sendo precedido por um período de aproximadamente 325 ka com tamanho efetivo populacional constante (Fig. 3.10).

Conexão entre o Cerrado e as savanas Amazônicas

Os resultados de diferenciação foram concordantes em ambos os marcadores utilizados, sendo o menor valor reportado entre MACA e PATO (ND2 $\Phi_{ST} = 0,113$; FIB-5 $\Phi_{ST} = 0,017$) e os maiores valores de diferenciação observados entre MACA e PNCG (ND2 $\Phi_{ST} = 0,338$; FIB-5 $\Phi_{ST} = 0,043$) e MACA e URUC (ND2 $\Phi_{ST} = 0,458$; FIB-5 $\Phi_{ST} = 0,052$). Quanto ao compartilhamento de haplótipos, MACA apresenta tanto haplótipos amplamente distribuídos quanto haplótipos compartilhados com apenas uma localidade, sendo PATO (ND2) ou PGSV (FIB-5) (Fig. 3.7 e Anexo 3.6).

DISCUSSÃO

O presente estudo traz uma avaliação da filogeografia e história demográfica de uma espécie de ave endêmica do Cerrado. Com base nos resultados obtidos foi discutido como a distribuição da variabilidade genética e dos haplótipos basais podem estar relacionados com a possível área de origem da espécie, a influência dos eventos climáticos do Quaternário na estrutura histórica da espécie bem como na expansão demográfica recente. Adicionalmente, discutimos como nossos resultados sugerem o corredor Central da Amazônia como rota de dispersão entre o Cerrado e as savanas do Amapá e como a diversidade genética nas localidades amostradas não parece estar associada à estabilidade climática durante o Quaternário. Por fim, foi discutido como os resultados apresentados podem auxiliar na conservação da espécie, com foco na população disjunta nas savanas do Amapá.

Distribuição da variabilidade genética e possível área de origem do tiê-do-cerrado

Neothraupis fasciata apresentou valores moderados de diversidade genética. Em escala geográfica, foi encontrada uma distribuição clinal da diversidade genética, diminuindo no sentido sul para norte. Este padrão foi observado para a diversidade nucleotídica estimada com ambos os marcadores empregados, sendo encontrado suporte estatístico para o marcador mitocondrial e, mesmo sem suporte estatístico, o marcador nuclear mostrou a mesma tendência, indicando uma congruência entre os marcadores. A redução clinal da diversidade é menos evidente para o conjunto nuclear, possivelmente em decorrência da menor variabilidade apresentada por este marcador devido às baixas taxas de evolução observadas em *loci* nucleares (Birky 1982, Moore 1995, Avise 2000).

Alguns estudos têm sugerido que o centro de origem de uma espécie está situado em uma área com maior diversidade genética (e.g. Hewitt 2000, Merila *et al.* 1997, Cheviron *et al.* 2005). Desta forma, a redução da diversidade no sentido sul para norte indica que o possível centro de origem de *N. fasciata* está localizado na parte sul da distribuição atual, estendendo por PNCG, PNEM, PNSC até PGSV (Fig. 3.11). A presença de haplótipos basais nas localidades amostradas no sul da distribuição (ND2) também reforça esta hipótese. Adicionalmente, de acordo com a filogenia da família Thraupidae (Burns *et al.* 2014), as cinco espécies que compõem a linhagem de *N. fasciata* (gêneros: *Lophospingus*, *Neothraupis*, *Gubernatrix* e *Diuca*) estão associadas a ambientes com vegetação aberta e ocorrem na porção centro-sul da América do Sul (Ridgely & Tudor 2009). Desta forma, o ancestral destas espécies possivelmente ocupava uma área mais austral na América do Sul, reforçando a hipótese do centro de origem de *N. fasciata* no sul da área atualmente coberta pelo Cerrado. A porção sul do Cerrado já foi reportada como o possível centro de origem para espécies de lagartos (Santos *et al.* 2014) e sapos (Prado *et al.* 2012). Por exemplo, para *Micrablepharus atticolus*, espécie de lagarto endêmico do Cerrado, o clado basal foi atribuído à porção sul da distribuição atual, estendendo do sudoeste (localizada na região do PNCG) até o sudeste da distribuição (abrangendo a área próxima ao PNSC e PGSV) (Santos *et al.* 2014). Já para a espécie de sapo *Hypsiboas albopunctatus* a população de PNCG foi apontada como o clado basal (Prado *et al.* 2012).

A diferenciação genética entre as localidades amostradas não parece estar relacionada com a hipótese de isolamento por distância. Resultado concordante foi

encontrado para esta espécie empregando marcadores microssatélites (Capítulo II). Considerando o baixo potencial de dispersão desta espécie, aproximadamente 200 metros da área natal (Duca & Marini 2014), a rejeição da hipótese de isolamento por distância seria um resultado inesperado. Contudo, o isolamento por distância apresenta seu valor máximo quando o equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico é atingido, o que pode levar um considerável intervalo de tempo (Crispo & Hendry 2005). Desta forma, a história demográfica da espécie não pode ser negligenciada, sendo que o isolamento por distância é encontrado com maior frequência em populações mais antigas e pode ser ausente em populações que se estabeleceram em um intervalo de tempo recente (Castric & Bernatchez 2003). Considerando que nossos resultados indicam uma expansão demográfica recente do tiê-do-cerrado, é possível que o equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico ainda não tenha sido atingido, resultando a rejeição da hipótese de isolamento por distância.

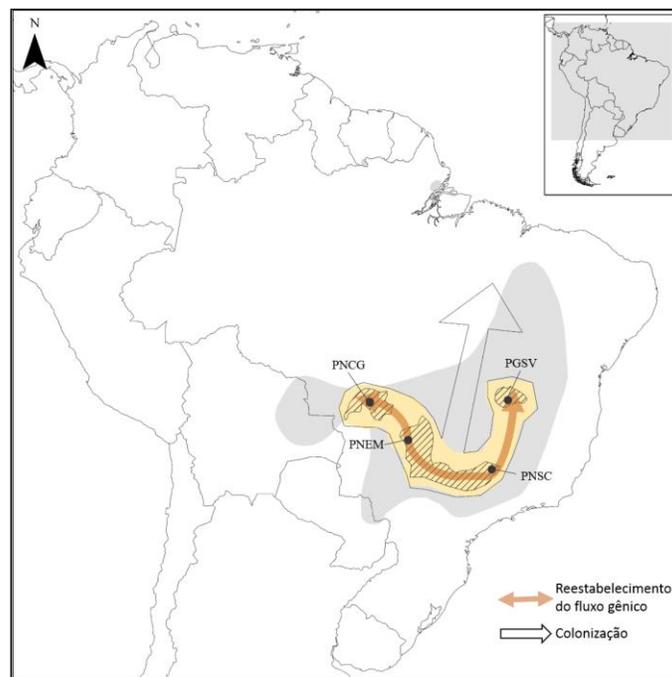


Figura 3.11. Possível área de origem, estrutura populacional histórica e expansão recente em *Neothraupis fasciata*. Os polígonos hachurados indicam os grupos genéticos observados na possível área de origem da espécie, indicada pela cor amarela. A seta em laranja indica a hipótese de reestabelecimento do fluxo gênico entre as populações da porção sul, enquanto a seta partindo da área de origem em direção ao norte indica a rota expansão na distribuição da espécie. Em cinza a distribuição atual da espécie. Siglas: PNCG - Parque Nacional da Chapada dos Guimarães; PNEM - Parque Nacional das Emas; PNSC - Parque Nacional da Serra da Canastra; e PGSV - Parque Nacional Chapada dos Guimarães.

Flutuações climáticas do quaternário e a filogeografia do tiê-do-cerrado

Estrutura populacional histórica. – Tanto a estrutura populacional quanto a estimativa do TMRCA para o tiê-do-cerrado apresentaram divergências entre os marcadores utilizados. Para o marcador mitocondrial foi encontrado suporte para quatro populações, com divergência inicial estimada em 700 mil anos atrás. Para o marcador nuclear foi encontrado suporte para duas populações e tempo de divergência inicial há 1,82 ma considerando a matriz completa e 1,92ma considerando a matriz reduzida. A diferença na taxa de mutação entre marcadores mitocondriais e nucleares pode afetar a resolução das relações observadas entre as populações (Zink & Barrowclough 2003), podendo explicar a discordância na estrutura encontrada entre os marcadores utilizados no presente trabalho. A discordância observada na estimativa do TMRCA entre os marcadores pode ser decorrente das diferenças no tempo de coalescência entre os tipos de marcadores empregados, sendo que em função do menor tamanho efetivo populacional o marcador mitocondrial apresenta tempo de coalescência menor do que marcadores nucleares (revisado por Zink & Barrowclough 2008).

Para acomodar a diferença nas estimativas do TMRCA entre os dois marcadores, o TMRCA da espécie será discutido com base no intervalo entre os valores médios obtidos: 1,92 – 0,7 milhão de anos. Este intervalo está compreendido no período Quaternário de acordo com a última versão da tabela cronoestratigráfica disponibilizada pela *International Commission on Stratigraphy* (ICS 2016). Este resultado parece concordante com a literatura que remete grande parte da diversificação da avifauna a América do Sul ao Quaternário (Miyaki 2009, Turchetto-Zollet *et al.* 2013)

Considerando os resultados obtidos com base no SAMOVA, na rede de haplótipos e na reconstrução de coalescência, três grupos genéticos identificados parecem estar associados à área de origem da espécie na porção sul do Cerrado (PNCG; PNSC+PNEM; PGSV). De forma concordante, a análise da estrutura genética do tiê-do-cerrado utilizando marcadores microssatélites indica um padrão similar de agrupamento das populações localizadas no sul da distribuição (Capítulo II). A delimitação geográfica dos grupos genéticos identificados parece corresponder às áreas isoladas devido à perda de adequabilidade climática em alguns dos períodos utilizados na modelagem de nicho ecológico (Figs. 3.5 e 3.11). Considerando que as mudanças climáticas ocorreram em

diversos momentos na América do Sul (Haffer 1997, Haffer & Prance 2002), sendo reportados eventos mais intensos no intervalo entre o Plioceno e Pleistoceno, o isolamento entre as populações situadas na área de origem da espécie durante o início do Pleistoceno pode ter ocorrido devido às oscilações climáticas que determinaram a dinâmica da vegetação da América do Sul (Haffer & Prance 2002). Assim, o estabelecimento das áreas de refúgio identificados para esta espécie pode ter sido recorrente durante todo o Quaternário, moldando a estrutura populacional histórica desta espécie.

Expansão demográfica no Pleistoceno tardio. – A influência das flutuações climáticas do Quaternário sobre as formações vegetais da América do Sul é tida como um importante aspecto biogeográfico recente tanto para áreas abertas quanto florestais (*e.g.* Haffer 1969, Bigarella *et al.* 1975, Silva 1995, Burnham & Granham 1999, Silva & Bates 2002, Mayle & Beerling 2004, Carnaval & Moritz 2008, Werneck *et al.* 2012a, Leite *et al.* 2016). Os resultados da modelagem de nicho do tiê-do-cerrado para o Quaternário mostraram uma maior conexão das áreas adequadas entre o LIG e LGM, seguido por uma redução e fragmentação entre o LGM e o Holoceno e subsequente expansão até atingir a distribuição atual. Assumindo a dependência de *N. fasciata* por determinadas fitofisionomias do Cerrado (Sick 2001), é esperado que a paleodistribuição da espécie tenha acompanhado mudanças ambientais que foram favoráveis para o estabelecimento das fitofisionomias abertas do Cerrado.

Nossos resultados apontam um processo de expansão populacional recente, como evidenciado pelos testes de neutralidade, a baixa resolução das construções filogenéticas e as configurações das redes de haplótipos. A análise de reconstrução do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo (*bayesian skyline plot*) indicou um aumento do tamanho efetivo há aproximadamente 75 mil anos atrás. Diante destes resultados, sugerimos que a expansão demográfica do tiê-do-cerrado deve ter ocorrido favorecida por uma maior conexão e possível expansão das áreas adequadas no LGM. Embora o aumento da conexão entre as áreas adequadas tenha sido identificado durante o LGM com base nos dados projeções para 21 mil anos atrás, é possível que esse processo de conexão das áreas adequadas tenha iniciado há mais tempo. Esta hipótese é reforçada pelo fato que o período entre 75 e 12 mil anos atrás (*marine isotope stages 4 – 2*) foi marcado por oscilações

climáticas tendendo ao esfriamento da temperatura, caracterizada por ciclos glaciais menores (Van Andel 1985, ICS 2010), os quais podem ter contribuído para o início do aumento da conexão das áreas adequadas para *N. fasciata*.

Diante do exposto, nossos resultados estão de acordo com as predições de que durante os períodos secos e frios as formações abertas expandiram na América do Sul, enquanto nos períodos mais quentes e úmidos estas áreas possivelmente retraíram (exemplos Bigarella *et al.* 1975, Silva 1995, Burnham & Granham 1999, Haffer & Prance 1992, Mayle & Beerling 2004, Carnaval & Moritz 2008). De forma concordante, registros palinológicos sugerem que o Cerrado expandiu para porção sul da Amazônia durante o LGM (Burnham & Granham 1999). Adicionalmente, uma parte significativa dos estudos filogeográficos realizados com aves florestais na América do Sul mostram sinal de fragmentação das populações durante os ciclos glaciais e/ou expansão durante o período interglacial (revisado por Turchetto-Zollet *et al.* 2013). Contudo, trabalhos que fizeram a modelagem da distribuição potencial do Cerrado (Werneck *et al.* 2012a) e de espécies arbóreas típicas do Cerrado (Bueno *et al.* 2016) encontram um aumento das áreas adequadas durante o LIG e redução no LGM. Vale ressaltar que, embora o trabalho de modelagem de espécies de árvores típicas do Cerrado tenha encontrado evidência de retração das áreas adequadas durante o LGM, a conexão entre as áreas adequadas foi maior no LGM se comparado ao LIG, o que está de acordo com os nossos resultados.

Diferentes resultados tem sido reportados para as espécies de vertebrados de áreas abertas, com tendências à expansão (mamíferos), manutenção (mamíferos e lagartos) ou mesmo retração (mamíferos e aves) da distribuição durante o LGM (Turchetto-Zollet *et al.* 2013). Embora ainda não exista um padrão claro sobre a dinâmica populacional das espécies que ocupam as áreas abertas da América do Sul, 68% dos estudos filogeográficos revisados por Turchetto-Zollet e colaboradores (2013) indicam expansão populacional durante o LGM e fragmentação no LIG. Adicionalmente, sinais de expansão populacional durante o Pleistoceno foram encontrados pela espécie de mosca cactofílica *Drosophila gouveai* (Moraes *et al.* 2009) e para a espécie de sapo *Hypsiboas albopunctatus* (Prado *et al.* 2012).

Em termos genéticos, no processo de expansão de uma espécie podemos destacar pelo menos dois padrões esperados: o primeiro associado ao reestabelecimento do fluxo

gênico entre as populações parcialmente ou mesmo totalmente isoladas e o segundo associado ao processo de colonização (ou recolonização) de novas áreas. Para o primeiro padrão são esperadas assinaturas genéticas de aumento da diversidade genética no sentido em que a expansão se deu em maior intensidade em função dos alelos novos que podem ser inseridos pelos migrantes (Gillespie & Roderick 2014). O segundo padrão está relacionado com as consequências negativas do efeito fundador, sendo que sucessivos eventos fundadores ao longo da rota de colonização resultam em populações com diversidade genética cada vez menor (Merila *et al.* 1997, Gillespie & Roderick 2014). Diante do exposto, sugerimos que os dois padrões acima descritos possam ter ocorrido durante o processo de expansão de *N. fasciata*:

- O primeiro padrão teria resultado no reestabelecimento do fluxo gênico na parte sul da distribuição atual da espécie principalmente no sentido oeste para leste, reconectando os grupos genéticos compostos por PNCG, PNSC (+PNEM) e PGSV (Figura 3.11). Assim, historicamente *N. fasciata* ocupava a porção sul da sua distribuição atual, estruturada em pelo menos três populações. Como suporte para esta hipótese podemos ressaltar que tanto PGSV quanto PNSC (+PNEM) apresentam haplótipos basais, indicando uma diferenciação genética prévia ao evento de expansão, e que os haplótipos mais antigos que conectam o haplogrupo da expansão (*mit3*) com os demais haplogrupos (*mit1* e *mit2*) são oriundos de PNCG. Além disto, a diversidade genética parece aumentar no sentido oeste para leste de acordo com o marcador nuclear. Assim, o evento de expansão recente pode ter atuado reduzindo a estrutura histórica apresentada pela espécie à medida que diversidade genética local foi redistribuída como consequência do processo de expansão populacional.
- O segundo padrão seria caracterizado pela colonização, ou recolonização, da porção setentrional da distribuição da espécie (Fig. 3.11). Este evento tem suporte na redução da diversidade no sentido sul para norte da distribuição, possivelmente devido à sucessivos eventos fundador. Durante o processo de expansão os grupos genéticos do sul foram responsáveis pela colonização (ou recolonização) da parte norte da distribuição, processo que pode ter ocorrido de forma heterogênea, sendo

que os diferentes grupos genéticos podem ter contribuído em intensidade diferente, assim como em diferentes momentos.

Considerações sobre a conexão entre as savanas Amazônicas e o Cerrado

De acordo com a literatura, três possíveis rotas foram propostas para explicar a conexão entre as savanas Amazônicas e o Cerrado, sendo essas através do corredor Andino, do corredor Central Amazônico e do corredor Costeiro Atlântico (Silva 1995). Contudo, de acordo com Silva (1995) e Silva e Bates (2002) o padrão de distribuição de espécies de aves de savana suportam a existência dos corredores Andino e Costeiro Atlântico e rejeitam o corredor Central Amazônico. Considerando os baixos valores de diferenciação entre MACA e PATO e o padrão de compartilhamento de haplótipos mitocondriais entre estas localidades, sugerimos que a possível rota de conexão entre as savanas do Amapá e o Cerrado tenha ocorrido pelo corredor Central Amazônico. Adicionalmente, foi observada uma adequabilidade climática na região descrita como área de baixa precipitação da Amazônia durante alguns períodos do Quaternário.

A existência de um corredor na porção central da Amazônia tem sido alvo de intenso debate desde a proposição da teoria dos refúgios por Haffer (1969). Embora nossos resultados não permitam descartar completamente nenhuma das rotas, as evidências indicam o corredor Central Amazônico como a rota de dispersão mais provável para esta espécie. Como suporte adicional para nossos resultados podemos citar os trabalhos de Werneck e colaboradores (2012) e Bueno e colaboradores (2016) que também indicam a presença de áreas adequadas para a vegetação do Cerrado próximo ao corredor de baixa precipitação da Amazônia durante o LIG. Destacamos que estudos que busquem elucidar as conexões entre as áreas de savana ao norte e sul da Amazônia ainda são necessários, principalmente no que diz respeito à validade do corredor Central Amazônico, que têm sido sistematicamente alvo de grande debate.

Considerando os resultados obtidos no Capítulo II, os valores de diferenciação foram relativamente menores entre MACA e as localidades amostradas na borda do bioma, como URUC e PNCG, do que entre as localidades na porção central do Cerrado. Este resultado pode ser um indicativo de fluxo gênico recente entre estas populações, possivelmente pelos corredores Costeiro Atlântico ou o Andino que podem ter conectado o

Cerrado e as savanas Amazônicas (Silva 1995) Contudo, este resultado é discordante dos valores de diferenciação obtidos com os dados de sequências, que apontam para uma possível conexão via corredor Central Amazônico. De acordo com Zink e Barrowclough (2008), resultados de análises com base em *loci* microssatélites não devem ser utilizadas isoladamente para identificar relações históricas, uma vez que a relação entre alelos pode ser enviesada por homoplasias no número de repetições devido ao mecanismo de mutação típico para este marcador. Assim, a estrutura recuperada com base na frequência alélica não remete necessariamente à uma assinatura de vicariância ou isolamento de longo tempo entre populações, sendo esta uma possível explicação para a discordância observada (revisado por Zink & Barrowclough 2008).

Áreas estáveis e diversidade genética

Ao todo, entre o LIG e o período atual três áreas principais permaneceram estáveis para *N. fasciata*: (I) o Planalto dos Guimarães; (II) o Planalto da Caiapônia e Planalto Central da Bacia do Paraná; e (III) a Serra Geral de Goiás e Planalto Central Brasileiro (Fig. 3.5). Estas áreas estáveis representam regiões de altitude elevada e estão, em grande parte, de acordo com as áreas estáveis anteriormente descritas (Ab' Sábber 1983, Werneck *et al.* 2012a, Santos *et al.* 2014, contudo ver Bueno *et al.* 2016). De forma mais específica, Ab' Sábber (1983) classifica os planaltos no sul do Cerrado como áreas de estabilidade climática durante o Quaternário, possivelmente constituindo um único refúgio contínuo. A existência de um único refúgio ao sul do Cerrado tem sido rejeitada (Werneck *et al.* 2012a, Santos *et al.* 2014), sendo encontrado na maior parte das vezes refúgios menores isolados em regiões de planalto.

Embora seja postulada uma maior diversidade genética associada às áreas estáveis (Hewitt 2004, Carnaval *et al.* 2009), esta hipótese foi rejeitada por nosso trabalho. De forma similar, Santos e colaboradores (2014) também não encontraram suporte para esta hipótese investigando uma espécie de lagarto com áreas estáveis preditas em regiões similares às de *N. fasciata*. Uma das possíveis explicações seria a capacidade de persistência ou adaptação das populações frente a mudanças ambientais, evitando eventos sucessivos de extinção e recolonização e até mesmo resultando na estabilidade demográfica, que por sua vez resultariam na manutenção da variabilidade genética

apresentada nas localidades amostradas. Adicionalmente, não podemos descartar o fato de que as localidades amostradas nas áreas não estáveis se encontram na borda das áreas estáveis, com exceção de MACA. Assim, tanto a capacidade adaptativa e de persistência das populações quanto a proximidade das áreas estáveis podem ter atenuado os efeitos da perda da variabilidade genética esperados para as áreas não estáveis.

Implicações para a conservação

Localizada em um fragmento de savana Amazônica, MACA representa um grupo genético com base no conjunto de dados mitocondrial, além de apresentar alguns dos menores valores de diversidade genética dentre as localidades amostradas. Esses dados também são concordantes com os obtidos no Capítulo II, reforçando o cenário atual de possível diferenciação e baixa diversidade genética na população de MACA. A variação genética existente em uma população pode ser determinante na sua capacidade adaptativa às mudanças no ambiente, sendo populações com baixa diversidade genética mais susceptíveis à extinção (Frankham 2005). Acompanhando a tendência de desmatamento observada no Cerrado, as savanas do Amapá tem sido rapidamente modificadas pela atividade antrópica desde a década de 1970 (Melém-Júnior *et al.* 2003, Oliveira 2009), contribuindo para a redução de áreas naturais e possivelmente impactando as populações animais que ocorrem nesta formação. O forte impacto antrópico sobre o habitat natural de *N. fasciata* levou esta espécie ao *status* de quase-ameaçada devido à uma tendência de redução do tamanho das populações em decorrência da perda de habitat (IUCN 2013). Desta forma, a baixa diversidade genética observada em MACA, somada ao atual isolamento desta população e aos níveis de perda de habitat das savanas do Amapá podem aumentar as chances de extinção desta população. Assim, de acordo com os resultados obtidos no Capítulo II e seguindo os mesmos critérios apresentados sugerimos MACA seja considerada uma Unidade de Manejo (Moritz 1994), merecendo atenção especial do ponto de vista conservacionista para preservar o potencial evolutivo das populações *de N. fasciata* isoladas nas savanas Amazônicas, aqui representadas apenas por MACA.

CONCLUSÃO

Com base na distribuição geográfica da diversidade genética e dos haplótipos basais a porção sul da distribuição atual de *N. fasciata* foi identificada como provável área de origem da espécie. Ainda, a estrutura genética encontrada indica uma estruturação histórica na possível área de origem da espécie, com as populações sendo isoladas possivelmente por eventos recorrentes de perda de adequabilidade climática desde o início do Pleistoceno. Os testes demográficos indicam um processo recente de expansão populacional durante o Pleistoceno tardio, que teria contribuído tanto para o reestabelecimento do fluxo gênico entre as populações ao sul da distribuição atual quanto para a colonização (ou recolonização) da porção norte do Cerrado. Não foi encontrado suporte para o teste de isolamento por distância, possivelmente em decorrência do processo expansão populacional recente. Considerando os resultados dos testes de diferenciação e o padrão de compartilhamento de haplótipos foram encontradas fortes evidências da conexão entre a população disjunta do Amapá e as demais localidades amostradas via corredor Central da Amazônia. Embora seja postulada maior diversidade genética em áreas climaticamente estáveis, não foi encontrado suporte estatístico para esta hipótese. Por fim, a população disjunta nas savanas do Amapá representa um grupo genético com base no conjunto de dados mitocondrial, além de apresentar alguns dos menores valores de diversidade genética dentre as localidades amostradas. Desta forma, sugerimos que esta população seja considerada como uma Unidade de Manejo e que mais esforços de conservação sejam direcionados para esta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Sáber, A.N. 1983. O domínio dos cerrados: introdução ao conhecimento. *Revista do Serviço Público*, 111: 41–55.
- Alves, M.A.S. 1990. Social system and helping behavior in the White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*). *The Condor*, 92(2): 470–474.
- Alves, M.A.S. 1991. Dieta e táticas de forrageamento de *Neothraupis fasciata* em cerrado no Distrito Federal, Brasil (Passeriformes: Emberizidae). *Ararajuba*, 2: 25–29.
- Alves, M.A.S., & Cavalcanti, R. B. 1990. Ninhos, ovos e crescimento de filhotes de *Neothraupis fasciata*. *Ararajuba*, 1: 91–94.

- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. p. 447. Cambridge: Harvard University Press.
- Axelsson, E., Smith, N.G.C., Sundstrom, H., Berlin, S., & Ellegren, H. 2004. Male-biased mutation rate and divergence in autosomal, Z-linked and W-linked introns of chicken and turkey. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 1538–1547.
- Bandelt, H.J., Forster, P., & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48.
- Behling, H., & Lichte, M. 1997. Evidence of dry and cold Climatic Conditions at Glacial Times in Tropical Southeastern Brazil. *Quaternary Research*, 48: 248–358.
- Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: A synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 177: 19–27.
- Bigarella, J.J., Andrade, D., & Riehs, P.J. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Simpósio Internacional sobre o Quaternário*, 47: 411–464.
- Birdlife International, & NatureServe. 2014. Bird species distribution maps of the world. *The IUCN Red List of Threatened Species Version 2015-3*.
- Birky, C.W., Maruyama, T., & Fuerst, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, 103(3): 513–527.
- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y., & Burke, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR (ed), *Molecular genetic analysis of populations*. IRL Press. pp. 225–269.
- Bueno, M.L., Pennington, R.T., Dexter, K.G., Kamino, L.H.Y., Pontara, V., Neves, D.M., Ratter, J.A., & Oliveira-Filho, A.T. 2016. Effects of Quaternary climatic fluctuations on the distribution of Neotropical savanna tree species. *Ecography*, 39: 001–012.
- Burnham, R.J., & Graham, A. 1999. The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86(2): 546–589.
- Burns, K.J., Shultz, A.J., Title, P.O., Mason, N.A., Barker, F.K., Klicka, J., Lanyon, S.M., & Lovette, I.J. 2014. Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75: 41–77.
- Carnaval, A.C., & Moritz, C. 2008. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, 35: 1187–1201.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., & Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, 323: 785–789.
- Carstens, B.C., Richards, C.L. 2007. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution*, 61(6): 1439–1454.
- Castric, V., & Bernatchez, L. 2003. The rise and fall of isolation by distance in the anadromous brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Genetics*, 163: 983–996.
- Cheviron, Z.A., Hackett, S.J., & Capparella, A.P. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(2): 338–357.
- Colli, G.R., 2005. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. In: Scariot, A., Sousa-Silva, J.C., Felfili, J.M. (Eds.), *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Distrito Federal.

- Crispo, E., & Hendry, A.P. 2005. Does time since colonization influence isolation by distance? A meta-analysis. *Conservation Genetics*, 6(5): 665–682.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9: 772.
- Dormann, C.F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., Marquéz, J.R.G., Gruber, B., Lafourcade, B., Leitão, P.J., Münkemüller, T., McClean, C., Osborne, P.E., Reineking, B., Schröder, B., Skidmore, A.K., Zurell, D., & Lautenbach, S. 2013. Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*, 35: 001–020.
- Drummond, A.J., & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O.G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (5): 1185–1192.
- Duca, C., & Marini, M.Â. 2014. Territorial system and adult dispersal in a cooperative-breeding tanager. *The Auk*, 131: 32–40.
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571–2581.
- Eiten, G. 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, 38(2): 201–340.
- Elith, J., Graham, C.H., Anderson, R.P., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, R.J., Huettmann, F., Leathwick, J.R., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, L.G., Loiselle, B.A., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, J.M.M., Peterson, A.T., Phillips, S.J., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Schapire, R.E., Soberón, J., Williams, S., Wisz, M.S.M & Zimmermann, N.E. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*, 29(2): 129–151.
- Excoffier, L., & Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126: 131–140.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Gillespie, R.G., & Roderick, G.K. 2014. Geology and climate drive diversification. *Nature*, 509: 297–298
- Giugliano, L.G., Collevatti, R.G., & Colli., G.R. 2007. Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45:168–179.
- Gottsberger, G., & Morawetz, W. 1986. Floristic, structural and hytogeographical analysis of the savannas of Humaitá (Amazonas). *Flora*, 178:41–71.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131–137.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: An overview. *Biodiversity and Conservation*, 6(3):451-476.
- Haffer, J., & Prance, G.T. 2002. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. *Estudos Avançados*, 16(46):175–206.
- Hammer, Ø., Harper D.A.T., & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4–9.

- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 45(405): 907–913.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 359: 183–195.
- Ho, S.Y.W., & Duchêne, S. 2014. Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Molecular Ecology*, 23(24): 5947–5965
- IBGE. 2004. Mapas de biomas do Brasil. Disponível em: ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas_interativos/
- ICS 2016. International Chronostratigraphic Chart v2016/4. Disponível em: <http://www.stratigraphy.org/ICSchart/ChronostratChart2016-04.pdf>
- ICS. 2010. Global chronostratigraphical correlation table for the last 2.7 million years. Disponível em: <http://www.stratigraphy.org/upload/QuaternaryChart1.JPG>
- IUCN. 2013. IUCN 2013. In IUCN 2013 (Ed.), *IUCN Red List of Threatened Species*. (2013.1 ed.). <www.iucnredlist.org>.
- Jenkins, D.G., Carey, M., Czerniewska, J., Fletcher, J., Hether, T., Jones, A., Knight, S., Knox, J., Long, T., Mannino, M., McGuire, M., Riffle, A., Segelsky, S., Shapell, L., Sterner, A., Strickler, T., & Tursi, R. 2010. A meta-analysis of isolation by distance: Relic or reference standard for landscape genetics? *Ecography*, 33: 315–320.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., & Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, 6: 13. <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Knowles, L.L., Carstens, B.C., & Keat, M.L. 2007. Coupling genetic and ecological-niche models to examine how past population distributions contribute to divergence. *Current Biology*, 17: 940–946.
- Ledru, M.P. 2002. Late Quaternary history and evolution of the Cerrados as revealed by palynological records. In: Oliveira, P.S., Marquis, R.J. (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, New York, pp. 33–50.
- Leigh, J.W., & Bryant, D. 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110–1116.
- Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Lossa, A.C., Rocha, R.G., Batalha-Filho, H., Bastos, A.C., Quaresma, V.S., Fagundes, V., Paresque, R., Passamani, M., & Pardini, R. 2016. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(4): 1008–1013.
- Lewin, B. 1997. *Genes VI*. Oxford University Press, Oxford and New York.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Machado, R.B., Neto, M.B.R., Pereira, P.G.P., Caldas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N. S., Tabor, K., & Steininger, M. 2004. *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro*. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.
- Maciel, N.M., Collevatti, R.G., Colli, G.R., & Schwartz, E.F. 2010. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 787–797.
- Manica, L.T., Telles, M., & Dias, M.M. 2010. Bird richness and composition in a Cerrado fragment in the State of São Paulo. *Brazilian Journal of Biology*, 70(2): 243–254.
- Marchese, C. 2015. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation*, 3: 297–309.

- Marini, M.Â., & Garcia, F.I. 2005. Conservação de aves no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1): 95–102.
- Mardulyn, P. 2012. Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Molecular Ecology*, 21: 3385–3390.
- Marini, M., & Hackett, S. 2002. A multifaceted approach to the characterization of an intergeneric hybrid manakin (*Pipridae*) from Brazil. *The Auk*, 119(4): 1114–1120.
- Marini, M.Â. 2001. Effects of forest fragmentation on birds of the cerrado region, Brazil. *Bird Conservation International*, 11: 13–25.
- Marini, M.Â., Borges, F.J.A., Lopes, L.E., Sousa, N.O.M., Gressler, D.T., Santos, L.R., Paiva, L.V. Duca, C., Manica, L.T, Rodrigues, S.S., França, L.F., Costa, P.M., França, L. C., Heming, N. M., Silveira, M.B., Pereira, Z.P., Lobo, Y., Medeiros, R.C.S., & Roper, J.J. 2012. Breeding biology of birds in the Cerrado of central Brazil. *Ornitologia Neotropical*, 23: 385–405.
- Marini, M.Â., Lobo, Y., Lopes, L.E., França, L.F., & Paiva, L.V. 2009. Biologia reprodutiva de *Tyrannus savana* (Aves, Tyrannidae) em cerrado do Brasil Central. *Biota Neotropica*, 9(1): 55–62.
- Mayle, F.E., & Beerling, D.J. 2004 Late Quaternary changes in Amazonian ecosystems and their implications for global carbon cycling. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 214: 11–25.
- Medeiros, R.D.C.S., & Marini, M.Â. 2007. Biologia reprodutiva de *Elaenia chiriquensis* (Lawrence) (Aves, Tyrannidae) em Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(1): 12–20.
- Melém-Júnior, N.J., Neto, J.T.F., & Yokomizo, G.K.I. 2003. Caracterização dos Cerrados do Amapá. *Comun. Técnico Embrapa Amapá*, 105: 105–108.
- Merila, J., Bjorklund, M., & Baker, A.J. 1997 Historical demography and present day population structure of the greenfinch, *Carduelis chloris* - An analysis of mtDNA control region sequence. *Evolution*, 51: 946–956.
- Mittermeier, J.C., Zyskowski, K., Stowe, E.S., & Lai, J.E. 2010. Avifauna of the Sipaliwini Savanna (Suriname) with insights into its biogeographic affinities. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 51: 97–122.
- Mittermeier, R.A. Turner, W.R., Larsen, F.W., Brooks, T.M., & Gascon, C. 2011. Global biodiversity conservation: The critical role of hotspots. In: In: Zachos, F.E., Habel, J.C. (Eds.), *Biodiversity hotspots: Distribution and protection of priority conservation areas*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3–22. pp. 3–22.
- Miyaki, C.Y. 2009. Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. *Megadiversidade*, 5:96-100.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49:718–726.
- Moraes, E.M., Yotoko, K.S.C., Manfrin, M.H., Solferini, V.N., & Sene, F.M. 2009. Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *Journal of Biogeography*, 36: 2136–2147.
- Moritz, C. 1994. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9: 373–375.
- Motta-Júnior, J.C., Granzinoli, M.A.M., & Develey, P.F. 2008. Aves da Estação Ecológica de Itirapina, estado de São Paulo , Brasil. *Biota Neotropica*, 8(3): 207–227.

- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A., & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853–858.
- Oliveira, C.P. 2009. *O método de avaliação por múltiplos critérios como apoio ao planejamento ambiental: Aplicação experimental no Cerrado central do Amapá, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Amapá.
- Pacheco, M.A., Battistuzzi, F.U., Lentino, M., Aguilar, R.F., Kumar, S., & Scalante, A.A. 2011. Evolution of modern birds revealed by mitogenomics: Timing the radiation and origin of major orders. *Molecular Biology and Evolution*, 28(6): 1927–1942.
- Peterson, A.T. 2001. Predicting species' geographic distributions based on ecological niche modeling. *The Condor*, 103(3): 599–605.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., & Schapire, R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190: 231–259.
- Pichorim, M., Silva, M., França, B.R.A., Oliveira-Júnior, T.M., Rodrigues, M.C. 2014. A cerrado bird community in the northernmost portion of northeastern Brazil - recommendations for conservation. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 22(4): 347–362.
- Pinheiro, M.H.O., & Monteiro, R. 2010. Contribution to the discussions on the origin of the cerrado biome: Brazilian savanna. *Brazilian Journal of Biology*, 70(1): 95–102.
- Prado, C.P.A., Haddad, C.F.B., & Zamudio, K.R. 2012. Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Molecular Ecology*, 21: 921–941.
- Rambaut, A., Drummond, A.J. 2003 Tracer version 1.4 [computer program].
- Ramos, A.C.S., Lemos-Filho, J.P., Ribeiro, R.A., Santos, F.R., & Lovato, M.B. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany*, 100: 1219–1228.
- Ramos-Onsins, S.E., & Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19 (12): 2092–2100.
- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F., & Bridgewater, S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, 80: 223–230.
- 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*, 32(8): 1409–1427.
- Ridgely, R.S., & Tudor, G. 1989. *The Birds of South America. Vol 1, The Oscine Passerines*. Austin: University of Texas Press.
- Rodríguez-Robles, J.A., Jezkova, T., & Leal, M. 2010. Climatic stability and genetic divergence in the tropical insular lizard *Anolis krugi*, the Puerto Rican 'Lagartijo Jardinero de la Montaña'. *Molecular Ecology*, 19: 1860–1876.
- Santos, M.G., Nogueira, C., Giugliano, L.G., & Colli, G.R. 2014. Landscape evolution and phylogeography of *Micrablepharus atticolus* (Squamata, Gymnophthalmidae), an endemic lizard of the Brazilian Cerrado. *Journal of Biogeography*, 41: 1506–1519.
- Sick, H. 2001. *Ornitologia Brasileira* (Edição rev., p. 862). Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira.
- Silva, J. 1995. Biogeographic analysis of the South American Cerrado avifauna. *Steenstrupia*, 21: 49–67.
- Silva, J.M.C., & Bates, J.M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna hotspot. *BioScience*, 52(3): 225 – 233.

- Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E., Yuri, T., & Mindell, D.P. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(2): 105–14.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tubelis, D.P., & Cavalcanti, R.B. 2000. A comparison of bird communities in natural and disturbed non-wetland open habitats in the Cerrado's central region, Brazil. *Bird Conservation International*, 10: 331–350.
- Turchetto-Zollet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22: 1193–1213.
- Van Andel, T.H. 1985. New views on an old planet: A history of global change. London: Cambridge University Press.
- Van der Hammen, T., & Absy, M.L. 1994. Amazonia during the last glacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 109: 247 – 261.
- Werneck ,F.P., Nogueira, C., Colli, G.R., Sites Jr, J.W., & Costa, G.C. 2012a. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography*, 39: 1695–1706.
- Werneck, F.P. 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30: 1630–1648.
- Werneck, F.P., Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., & Sites Jr, J.W. 2012b. Deep diversification and long-term persistence in the South American 'Dry Diagonal': Integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of Geckos. *Evolution*, 66(10): 3014–3034.
- Werneck, F.P., Giugliano, L.G., Collevatti, R.G., & Colli, G.R. 2009. Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Molecular Ecology*, 18: 262–278.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114–138.
- Zink, R.M., & Barrowclough, G.F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17: 2107–2121.

Anexo 3.1. Variáveis bioclimáticas disponibilizadas pelo *WorldClim*. Porcentagem de contribuição (% cont) e importância na permutação (PI) das variáveis utilizadas nas simulações de distribuição potencial atual. M1- modelo contendo todas as variáveis; M2 - modelo contendo as variáveis não correlacionadas utilizando o critério menos restritivo; M3 - modelo contendo as variáveis não correlacionadas utilizando o critério mais restritivo.

Variável	Descrição	M1		M2		M3	
		% cont	PI	% cont	PI	% cont	PI
Altitude		23,10	15,10	27,90	23,90		
BIO1	Temperatura média anual	0,00	0,00				
BIO2	Intervalo médio diurno (Média mensal (max temp - min temp))	1,00	0,90	2,00	2,70	5,0	5,4
BIO3	Isotermalidade (BIO2/BIO7)(*100)	8,90	10,90	8,70	8,10	10,0	15,7
BIO4	Sazonalidade de temperatura (desvio padrão * 100)	0,20	3,40	0,20	4,50	12,7	10,0
BIO5	Temperatura máxima do mês mais quente	4,00	0,40				
BIO6	Temperatura mínima do mês mais frio	9,60	8,10				
BIO7	Intervalo da temperatura anual (BIO5-BIO6)	0,30	6,10	7,10	4,90		
BIO8	Média do quarto de ano mais úmido	0,00	0,70			24,3	24,4
BIO9	Média do quarto de ano mais seco	0,60	10,20	11,30	12,10		
BIO10	Média do quarto de ano mais quente	3,60	4,50				
BIO11	Média do quarto de ano mais frio	8,90	5,70				
BIO12	Precipitação anual	14,50	11,50	22,40	20,00		
BIO13	Precipitação do mês mais frio	0,10	2,70	5,70	1,90	20,0	20,9
BIO14	Precipitação do mês mais seco	0,30	1,60	0,80	10,50		
BIO15	Sazonalidade de precipitação (coeficiente de variação)	6,30	4,10	6,70	6,70	13,2	11,2
BIO16	Precipitação do quadrimestre mais úmido	10,30	0,40				
BIO17	Precipitação do quadrimestre mais seco	0,70	12,20				
BIO18	Precipitação do quadrimestre mais quente	0,10	0,00	1,20	2,20	1,3	5,6
BIO19	Precipitação do quadrimestre mais frio	7,50	1,40	6,00	2,50	13,5	6,9

Anexo 3.2 – Método de obtenção de sequências consenso para indivíduos heterozigotos para inserção/deleção.

Durante o processo de obtenção das sequências do íntron 5 do gene beta-fibrinogênio nos deparamos com dificuldades na interpretação dos eletroferogramas gerados para alguns indivíduos. Para estes indivíduos foi observado uma sobreposição de picos em parte do sequenciamento, como representado na Figura A1. Adicionalmente, a sobreposição de picos era observada sempre à partir da mesma posição tanto para o resultado do sequenciamento utilizando o iniciador FIB5 quanto para o iniciador FIB 6 (Fig. A1). Segundo experiências anteriores com sequenciamento de fragmentos nucleares, este é um padrão condizente para indivíduos heterozigotos para eventos de inserção/deleção (*indel*). Desta forma, para avaliar se o problema era decorrente da presença de *indel* no íntron analisado, foi realizado um alinhamento de sequências consenso obtidas para indivíduos aparentemente homozigotos para a presença de *indel* mais a sequência do grupo externo *Diuca diuca* (Burns *et al.* 2014).

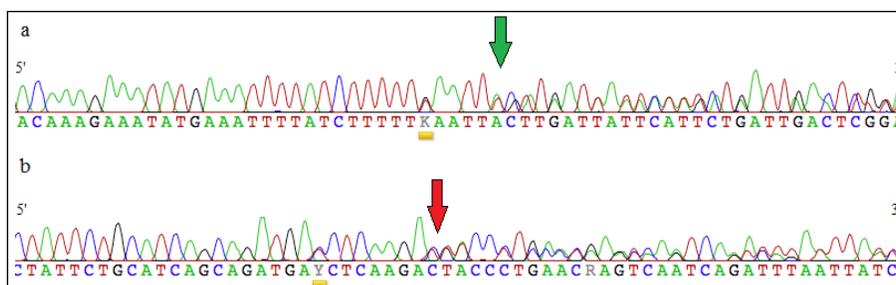


Figura A1. Eletroferogramas mostrando a sobreposição de picos no sequenciamento utilizando (a) o iniciador FIB5 e (b) o iniciador FIB6. A seta verde indica o início do bloco primeiro bloco de indel, enquanto a seta vermelha indica o final do segundo bloco de indel. Para mais detalhes ver a a Figura A2.

Com base neste alinhamento foi observada uma variação no comprimento total da sequência do FIB-5, sendo que parte dos indivíduos e o grupo externo apresentavam sequências mais curtas para o fragmento completo, com 558 pares de base, enquanto os demais apresentavam sequências maiores, com 572 pares de bases. De forma geral, o alinhamento das sequências mostrou a presença de dois blocos de *indel*, sendo o primeiro com 10 pb de comprimento e o segundo com 4 pb de comprimento, separados entre si por

37 pb (Fig. A2). Desta forma, a presença de picos duplos no sequenciamento estava associada à indivíduos heterozigotos para o *indel*, caracterizados por herdarem cópias de tamanhos diferentes para o segmento analisado. Assim, o próximo passo foi construir manualmente a sequência consenso destes indivíduos através das partes sequenciadas para cada iniciador, ou seja: primeiro foi inserido o fragmento recuperado pelo sequenciamento utilizando o marcador FIB5, seguido pelo sequência complementar e reversa do fragmento recuperado pelo sequenciamento utilizando o marcador FIB6. Por fim, esse fragmento gerado foi alinhado com as demais sequências geradas, e a fase haplotípica posteriormente determinada utilizando o DnaSPHase implementado pelo programa DNASP 5.10 (Librado & Rozas 2009).

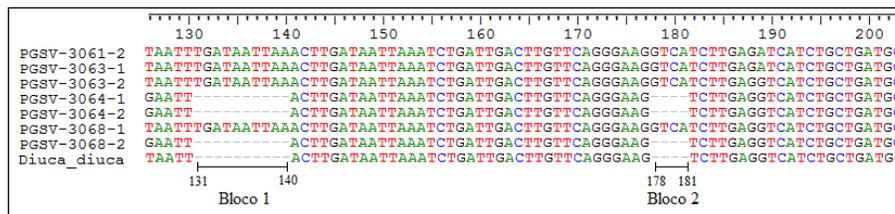


Figura A2. Representação dos blocos de *indel* observado no alinhamento das fases haplotípicas do íntron 5 do gene beta-fibrinogênio para indivíduos de *Neothraupis fasciata* e do grupo externo *Diuca diuca*.

Anexo 3.3. Relação dos indivíduos de *Neothraupis fasciata* sequenciados para cada um dos marcadores utilizados. Localidade onde a amostra foi coletada, número de tombo no Laboratório de Genética de Biodiversidade da Universidade de Brasília e haplótipo (Hap) identificado para cada marcador genético.

Localidade	Tombo LabGenBio/UnB	ND2	FIB5 matriz completa	FIB5 matriz reduzida	
AGCV					
	0005		Hap01	Hap02	
	2396		Hap03	Hap03	
	2418	Hap01	Hap02	Hap03	Hap02 Hap03
	2420	Hap02	Hap03	Hap03	Hap03 Hap03
	2464	Hap02	Hap01	Hap03	Hap01 Hap03
	2471	Hap03	Hap01	Hap03	Hap01 Hap03
	2667	Hap02	Hap02	Hap03	Hap02 Hap03
	2721	Hap02	Hap01	Hap03	Hap01 Hap03
	2802		Hap01	Hap03	
	2804		Hap01	Hap03	
	2806		Hap02	Hap04	
	2807		Hap01	Hap03	
	2808		Hap02	Hap05	
	2809		Hap03	Hap03	
	2810	Hap04	Hap02	Hap03	Hap02 Hap03
	2811		Hap01	Hap02	
	2812	Hap04	Hap01	Hap03	Hap01 Hap03
	2818		Hap01	Hap03	
	2819	Hap05	Hap01	Hap03	Hap01 Hap03
	3198		Hap02	Hap05	
	3205		Hap02	Hap06	
	3206	Hap06	Hap01	Hap06	Hap01 Hap06
	3207		Hap01	Hap03	
	3208		Hap01	Hap06	
	3209	Hap03	Hap01	Hap07	Hap01 Hap07
	3210		Hap05	Hap06	
	3212		Hap03	Hap06	
	3214		Hap02	Hap08	
	3215	Hap07	Hap02	Hap03	Hap02 Hap03
	3219		Hap01	Hap03	
	3221		Hap03	Hap03	
	3398		Hap01	Hap01	
	3400		Hap01	Hap02	
	3421	Hap08	Hap02	Hap03	Hap02 Hap03

Localidade	Tombo LabGenBio/UnB	ND2	FIB5 matriz completa		FIB5 matriz reduzida		
BRMI [†]	3427		Hap02	Hap03			
	2801		Hap01	Hap02			
EEAE	3522	Hap09	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02	
	3689	Hap10	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03	
	3697	Hap03	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03	
	3701	Hap08	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02	
	3704	Hap02	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03	
	3710	Hap08	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03	
	3719	Hap08	Hap02	Hap05	Hap02	Hap05	
	A125	Hap11	Hap06	Hap06	Hap06	Hap06	
	MACA	4017	Hap12	Hap03	Hap09	Hap03	Hap09
		4018	Hap08	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
4019		Hap12	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03	
4020		Hap12	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01	
4024		Hap08	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03	
4025		Hap12	Hap03	Hap09	Hap03	Hap09	
4063		Hap12	Hap03	Hap03	Hap03	Hap03	
4103		Hap08	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03	
NXAV	2973	Hap13	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02	
	2974	Hap08	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03	
PATO	3261	Hap08	Hap03	Hap04	Hap03	Hap04	
	3284	Hap08	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02	
	3288	Hap12	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02	
	3292	Hap12	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01	
	3293	Hap14	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02	
	3294		Hap01	Hap10			
	3298	Hap15	Hap02	Hap11	Hap02	Hap11	
	3300		Hap03	Hap03			
	3301		Hap06	Hap12			
	3302	Hap8	Hap01	Hap06	Hap01	Hap06	
	3303		Hap01	Hap13			
	3304	Hap16	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01	
	3317		Hap03	Hap03			

Continua

Localidade	Tombo LabGenBio/UnB	ND2	FIB5 matriz completa		FIB5 matriz reduzida	
PGSV	3323	Hap17	Hap01	Hap14	Hap01	Hap14
	3325		Hap02	Hap15		
	3331	Hap16	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
	3333	Hap18	Hap02	Hap11	Hap02	Hap11
	3335		Hap02	Hap16		
	3049	Hap09	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
	3061	Hap02	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
	3063	Hap02	Hap01	Hap09	Hap01	Hap09
	3064	Hap08	Hap04	Hap04	Hap04	Hap04
	3068	Hap19	Hap09	Hap11	Hap09	Hap11
	3074	Hap08	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03
	3075		Hap02	Hap03		
	3076		Hap01	Hap02		
	3077		Hap01	Hap03		
	3085	Hap08	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
	3102		Hap02	Hap06		
	3126		Hap01	Hap03		
	3136		Hap02	Hap17		
	3147	Hap02	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	3149	Hap20	Hap11	Hap11	Hap11	Hap11
	3151	Hap21	Hap11	Hap11	Hap11	Hap11
	3156	Hap21	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	3159	Hap22	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03
	3160	Hap08	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	3163	Hap09	Hap03	Hap03	Hap03	Hap03
	3165	Hap09	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	3168	Hap09	Hap11	Hap18	Hap11	Hap18
	3170	Hap08	Hap03	Hap11	Hap03	Hap11
	3173		Hap01	Hap19		
	3177	Hap02	Hap02	Hap11	Hap02	Hap11
	3178	Hap09	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
	3180	Hap23	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
	3184	Hap08	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
PNCG	3608	Hap24	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	3610	Hap02	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
	3638		Hap01	Hap05		

Continua

Localidade	Tombo LabGenBio/UnB	ND2	FIB5 matriz completa		FIB5 matriz reduzida	
PNEM	3639	Hap25	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
	3640		Hap20	Hap21		
	3641		Hap01	Hap01		
	3648	Hap26	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
	3649	Hap08	Hap01	Hap02	Hap01	<i>Continua</i>
	3650		Hap01	Hap02		
	3651	Hap27	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03
	2620	Hap28	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
	2624	Hap29	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
	2626		Hap01	Hap01		
	2631	Hap30	Hap01	Hap11	Hap01	Hap11
	2636	Hap08	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	2637	Hap08	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	2638	Hap08	Hap21	Hap22	Hap21	Hap22
	2639	Hap08	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
	2640	Hap08	Hap11	Hap23	Hap11	Hap23
	2644	Hap08	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
	2645		Hap03	Hap03		
	PNSC	2742	Hap08	Hap01	Hap03	Hap01
2743		Hap08	Hap03	Hap11	Hap03	Hap11
2744		Hap31	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
2745		Hap08	Hap03	Hap03	Hap03	Hap03
2750		Hap08	Hap01	Hap01	Hap01	Hap01
2752		Hap32	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
2753		Hap32	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
2754		Hap31	Hap01	Hap03	Hap01	Hap03
2763		Hap32	Hap14	Hap16	Hap14	Hap16
URUC [†]		3514	Hap08	Hap02	Hap03	Hap02
	3515	Hap08	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02
	3516	Hap14	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03
	3517	Hap08	Hap11	Hap24	Hap11	Hap24
	3518	Hap08	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03
	3519	Hap14	Hap02	Hap03	Hap02	Hap03
	3520	Hap08	Hap01	Hap02	Hap01	Hap02

As siglas correspondem às seguintes localidades: Área de Proteção Ambiental das Bacias do Gama e Cabeça de Veado (AGCV), Brasilândia de Minas (BRMI), Estação Ecológica

de Águas Emendadas (EEAE), Fazenda Experimental da Embrapa Macapá (MACA), Nova Xavantina (NXAV), Parque Nacional Chapada dos Guimarães (PNCG), Parque Nacional Serra da Canastra (PNSC), Parque Nacional das Emas (PNEM), Parque Nacional Grande Sertão Veredas (PGSV), Ponte Alta do Tocantins (PATO) e Uruçuí (URUC). † Amostras emprestadas pelo Museu Paraense Emílio Goeldi.

Anexo 3.4. Pontos de ocorrência de *Neothraupis fasciata* utilizados para a modelagem de nicho ecológico no programa MaxEnt. Coordenadas são dadas em grau decimal.

Estado/Província (País)	Localidade	Latitude	Longitude
Amambay (Paraguai)	Amambay	-23,000	-56,000
Amapá (Brasil)	Campo Experimental da EMBRAPA Macapá	0,033	-51,050
Amapá (Brasil)	BR-156, norte do Macapá	0,483	-51,100
Bahia (Brasil)	Correntina	-13,750	-45,600
Bahia (Brasil)	Gerais do Mucugê	-13,100	-41,483
Bahia (Brasil)	Vilas do Sumidouro e Paulista	-13,040	-41,420
Bahia (Brasil)	Morro do Chapéu, Região do alto Rio Salitre	-11,409	-41,165
Bahia (Brasil)	Município de Umburanas, Região do médio Rio Salitre	-10,505	-41,331
Bahia (Brasil)	Município de Juazeiro, Baixo Rio Salitre	-9,692	-40,558
Caazapa (Paraguai)	5 km à leste de Caaguazu	-25,433	-56,033
Caazapa (Paraguai)	Alto Rio Iguasu, Paraguai	-25,033	-55,850
Distrito Federal (Brasil)	Fazenda Água Limpa	-15,950	-47,917
Distrito Federal (Brasil)	Reserva Ecológica do IBGE	-15,933	-47,883
Distrito Federal (Brasil)	Estação Ecológica do Jardim Botânico de Brasília	-15,917	-47,867
Distrito Federal (Brasil)	Brasília	-15,783	-47,917
Distrito Federal (Brasil)	Campus da Universidade de Brasília	-15,767	-47,917
Distrito Federal (Brasil)	Parque Nacional de Brasília	-15,717	-47,950
Distrito Federal (Brasil)	Planaltina	-15,617	-47,667
Distrito Federal (Brasil)	Estação Ecológica de Águas Emendadas	-15,533	-47,617
Goiás (Brasil)	Parque Nacional das Emas	-18,261	-52,888
Goiás (Brasil)	Fazenda Santa Adélia, Jataí	-17,883	-51,717
Goiás (Brasil)	Parque Estadual da Serra de Caldas Novas	-17,783	-48,700

Continua

Estado/Província (País)	Localidade	Latitude	Longitude
Goiás (Brasil)	Nerópolis	-16,417	-49,233
Goiás (Brasil)	Anápolis	-16,333	-48,967
Goiás (Brasil)	Fazenda Americana, Grão Mogol	-16,267	-42,917
Goiás (Brasil)	Fazenda Bandeirantes, Baliza	-16,250	-52,417
Goiás (Brasil)	Itaberaí	-16,017	-49,783
Goiás (Brasil)	Rio Araguaia, margem direita, Aragarças	-15,917	-52,250
Goiás (Brasil)	Fazenda Formiga, Rio da Almas	-15,533	-49,450
Goiás (Brasil)	Sao João da Aliança	-14,700	-47,533
Goiás (Brasil)	Rio São Miguel, próximo de Cavalcanti	-14,183	-47,800
Goiás (Brasil)	Chapada dos Veadeiros	-14,117	-47,517
Goiás (Brasil)	Formoso	-13,617	-48,900
Maranhão (Brasil)	Estiva, Alto Parnaíba	-9,583	-46,417
Maranhão (Brasil)	Alto Parnaíba	-9,100	-45,950
Maranhão (Brasil)	Fazenda Inhumá, Alto Rio Parnaíba	-8,750	-45,967
Maranhão (Brasil)	Serra do Gado Bravo, Balsas	-7,767	-46,233
Maranhão (Brasil)	Parque Estadual do Mirador	-6,417	-45,167
Maranhão (Brasil)	Barra do Corda	-5,500	-45,250
Maranhão/Tocantins (Brasil)	Cerrados da Serra Geral na divisa MA/TO	-9,470	-46,598
Mato Grosso (Brasil)	Parque Nacional Chapada dos Guimarães	-15,641	-56,612
Mato Grosso (Brasil)	Lagoinha	-15,467	-55,550
Mato Grosso (Brasil)	Parque Nacional Chapada dos Guimarães	-15,458	-55,765
Mato Grosso (Brasil)	Parque Nacional Chapada dos Guimarães	-15,454	-55,767
Mato Grosso (Brasil)	Chapada dos Guimarães	-15,417	-55,800
Mato Grosso (Brasil)	Escola Buriti, Chapada dos Guimarães	-15,417	-55,800
Mato Grosso (Brasil)	Estrada Água Fria	-15,387	-55,788

Continua

Estado/Província (País)	Localidade	Latitude	Longitude
Mato Grosso (Brasil)	Cerrado próximo à Cuiabá	-15,319	-56,006
Mato Grosso (Brasil)	Cidade de Pedra, Parque Nacional Chapada dos Guimarães	-15,300	-55,833
Mato Grosso (Brasil)	Rio das Mortes, margem esquerda, Bandeira Anhanguera	-13,383	-51,367
Mato Grosso (Brasil)	Rio Buriti	-12,833	-58,467
Mato Grosso (Brasil)	Aldeia do Ponto	-6,117	-45,150
Mato Grosso do Sul (Brasil)	Três Lagoas	-20,783	-51,700
Mato Grosso do Sul (Brasil)	Campo Grande	-20,450	-54,617
Mato Grosso do Sul (Brasil)	Fazenda Santa Emília, Aquidauana	-19,505	-55,612
Mato Grosso do Sul (Brasil)	Porto Faia	-18,467	-57,367
Mato Grosso do Sul (Brasil)	Parque Estadual das Nascentes do Rio Taquari, Alcinópolis e Costa Rica	-18,100	-53,300
Mato Grosso do Sul (Brasil)	Estação Ecológica Serra das Araras	-15,650	-57,217
Minas Gerais (Brasil)	Parque Nacional Serra da Canastra	-20,334	-46,775
Minas Gerais (Brasil)	Parque Nacional Serra da Canastra	-20,251	-46,496
Minas Gerais (Brasil)	Parque Nacional Serra da Canastra	-20,250	-46,617
Minas Gerais (Brasil)	Retiro das Pedras, Brumadinho	-20,100	-43,983
Minas Gerais (Brasil)	APA Especial de Mananciais pertencentes à COPASA	-20,017	-43,983
Minas Gerais (Brasil)	Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte	-19,933	-43,883
Minas Gerais (Brasil)	Lagoa Santa	-19,633	-43,883
Minas Gerais (Brasil)	Rio das Velhas, Matozinhos	-19,583	-43,900
Minas Gerais (Brasil)	Estrada Belo Horizonte-Serra do Cipó, km 80	-19,367	-43,700
Minas Gerais (Brasil)	Serra do Cipó	-19,350	-43,617
Minas Gerais (Brasil)	Reserva Ecológica Panga, Uberlândia	-19,183	-48,350
Minas Gerais (Brasil)	Ronivo's route	-19,166	-48,582
Minas Gerais (Brasil)	Reserva Legal do Clube Caça e Pesca Itororo, Uberlândia	-18,950	-48,200
Minas Gerais (Brasil)	Fazenda Monte Carmelo	-18,917	-47,667

Continua

Estado/Província (País)	Localidade	Latitude	Longitude
Minas Gerais (Brasil)	Romaria	-18,883	-47,633
Minas Gerais (Brasil)	Diamantina	-18,250	-43,600
Minas Gerais (Brasil)	Fazenda Pedrões, Três Marias	-18,183	-45,417
Minas Gerais (Brasil)	Fazenda Buriti, Diamantina	-17,641	-43,501
Minas Gerais (Brasil)	Fazenda do Senhor Onofre Sandinha, Leme do Prado	-17,117	-42,767
Minas Gerais (Brasil)	Fazenda Brejão, Brasilândia de Minas	-17,067	-45,900
Minas Gerais (Brasil)	Botumirim	-16,867	-43,017
Minas Gerais (Brasil)	Rio de Peixe, Botumirim	-16,867	-42,983
Minas Gerais (Brasil)	Boa Vista do Bananal, Cristalia	-16,733	-42,967
Minas Gerais (Brasil)	Rio Congonhas, Grão Mogol e Itacambira	-16,683	-43,317
Minas Gerais (Brasil)	Trindade	-16,667	-49,500
Minas Gerais (Brasil)	Santa Marta, Grão Mogol	-16,617	-43,300
Minas Gerais (Brasil)	Rio Itacambiruçu, Grão Mogol e Cristália	-16,583	-42,883
Minas Gerais (Brasil)	Grão Mogol	-16,567	-42,900
Minas Gerais (Brasil)	Sítio Recanto, Grão Mogol	-16,550	-43,400
Minas Gerais (Brasil)	Parque Estadual de Grão Mogol	-16,500	-42,900
Minas Gerais (Brasil)	Chapada do Catuni, Francisco Sá e Grão Mogol	-16,450	-43,400
Minas Gerais (Brasil)	São Romão	-16,367	-45,067
Minas Gerais (Brasil)	Município de São Francisco	-15,933	-44,867
Minas Gerais (Brasil)	Fazenda São Miguel	-15,833	-46,500
Minas Gerais (Brasil)	Refúgio da Vida Silvestre Rio Pandeiros	-15,667	-44,633
Minas Gerais (Brasil)	Fazenda Três Irmãs, Bacia do Rio Pandeiros	-15,666	-44,633
Minas Gerais (Brasil)	Januária	-15,417	-44,433
Minas Gerais (Brasil)	Parque Nacional Grande Sertão Veredas	-15,350	-45,833
Minas Gerais (Brasil)	Formoso	-14,933	-46,217

Continua

Estado/Província (País)	Localidade	Latitude	Longitude
Minas Gerais (Brasil)	Boqueirão da Onça, Baixo Rio São Francisco	-9,900	-41,510
Pará (Brasil)	Fazenda Fartura, Santana do Araguaia	-9,667	-50,383
Parana (Brasil)	Rio Tibagi	-24,500	-50,333
Parana (Brasil)	Fazenda Chapada de Santo Antônio e Rio das Perdizes	-24,250	-49,800
Piauí (Brasil)	Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba	-10,000	-45,800
Piauí (Brasil)	Santo Antônio de Gilboez	-9,833	-45,350
Piauí (Brasil)	Santa Maria	-9,633	-45,450
Piauí (Brasil)	Uruçuí, Fazenda União	-8,867	-44,967
Piauí (Brasil)	Fazenda Emaflor, Bom Jesus	-8,700	-45,017
Piauí (Brasil)	Rio Parnaíba	-8,200	-45,617
Piauí (Brasil)	Cerrado dos Indianos	-6,783	-43,833
San Pedro (Paraguai)	Establecimiento Laguna Blanca	-23,817	-56,300
San Pedro (Paraguai)	Estancia Laguna Blanca, Departamento San Pedro	-23,813	-56,295
Santa Cruz (Bolivia)	Ipias, Chiquitos	-18,033	-60,183
Santa Cruz (Bolivia)	Chiquitos	-18,000	-60,000
Santa Cruz (Bolivia)	Estância Zapacoz, 1.5 km N Concepcion	-16,250	-62,067
Santa Cruz (Bolivia)	Huanchaca II	-14,525	-60,740
Santa Cruz (Bolivia)	Huanchaca II, Parque Nacional Noel Kempff Mercado	-14,517	-60,383
Santa Cruz (Bolivia)	Huanchaca I, Parque Nacional Noel Kempff Mercado	-13,967	-60,833
Santa Cruz (Bolívia)	Concepcion	-16,113	-61,983
São Paulo (Brasil)	Itararé	-24,117	-49,333
São Paulo (Brasil)	Fazenda Barro Branco, Itapetininga	-23,717	-47,983
São Paulo (Brasil)	Fazenda Campo Grande, Itapetininga	-23,633	-47,967
São Paulo (Brasil)	Cemitério do Lambari	-23,567	-47,900
São Paulo (Brasil)	Sorocaba	-23,535	-47,516

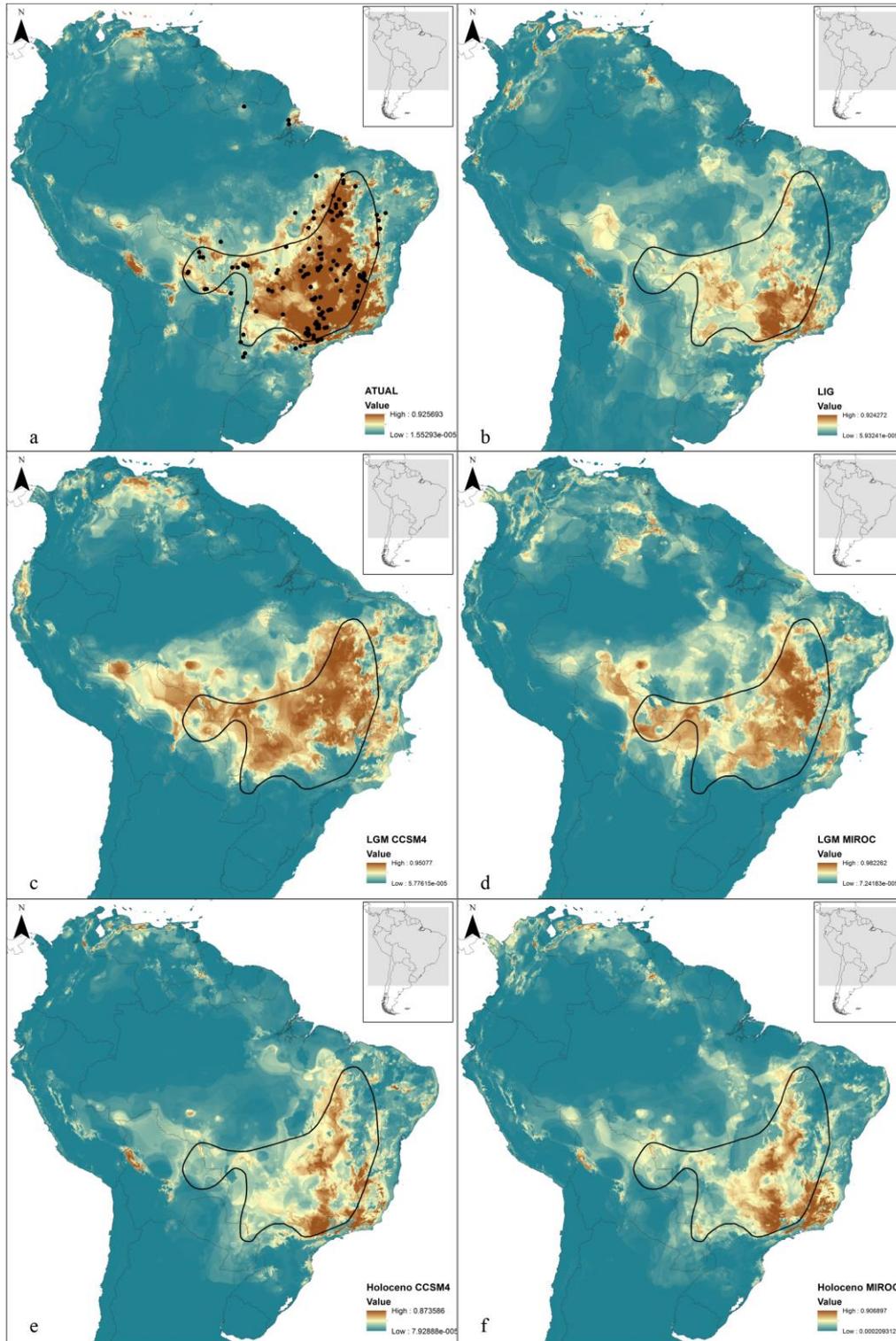
Continua

Estado/Província (País)	Localidade	Latitude	Longitude
São Paulo (Brasil)	Angatuba	-23,400	-48,367
São Paulo (Brasil)	Fazenda Santa Tereza, Avaré	-23,117	-48,983
São Paulo (Brasil)	Pardinho	-23,083	-48,383
São Paulo (Brasil)	Fazenda Pedras, Avaré	-22,967	-48,867
São Paulo (Brasil)	Fazenda Experimental Santa Barbara do Rio Pardo	-22,883	-49,250
São Paulo (Brasil)	Água Branca	-22,850	-48,933
São Paulo (Brasil)	Estação Ecológica de Santa Bárbara	-22,800	-49,217
São Paulo (Brasil)	Fazenda Rio Claro, Lançóis Paulista	-22,450	-48,950
São Paulo (Brasil)	Bauru	-22,317	-49,067
São Paulo (Brasil)	Itirapina	-22,300	-47,850
São Paulo (Brasil)	Retiro	-22,300	-48,017
São Paulo (Brasil)	Itirapina	-22,283	-47,800
São Paulo (Brasil)	Brotas	-22,283	-48,000
São Paulo (Brasil)	Estação Ecológica de Itirapina	-22,270	-47,834
São Paulo (Brasil)	Fazenda Campininha, Mogi Guaçu	-22,267	-47,167
São Paulo (Brasil)	Rio Itaqueri, São Carlos	-22,250	-47,867
São Paulo (Brasil)	Orissanga	-22,200	-46,950
São Paulo (Brasil)	Broa - cerrado junto a vila, São Carlos	-22,167	-47,867
São Paulo (Brasil)	Fazenda Santa Maria da Fábrica, São Carlos	-22,167	-47,917
São Paulo (Brasil)	Estação Conde do Pinhal, São Carlos	-22,100	-47,850
São Paulo (Brasil)	Cerrado norte, São Carlos	-21,917	-47,817
São Paulo (Brasil)	Campus da Universidade Estadual Paulista	-21,817	-48,200
São Paulo (Brasil)	Rincão	-21,583	-48,067
São Paulo (Brasil)	Córrego Lajes, Cajuru	-21,217	-47,283
São Paulo (Brasil)	Fazenda Desengano, Batatais	-20,850	-47,583

Continua

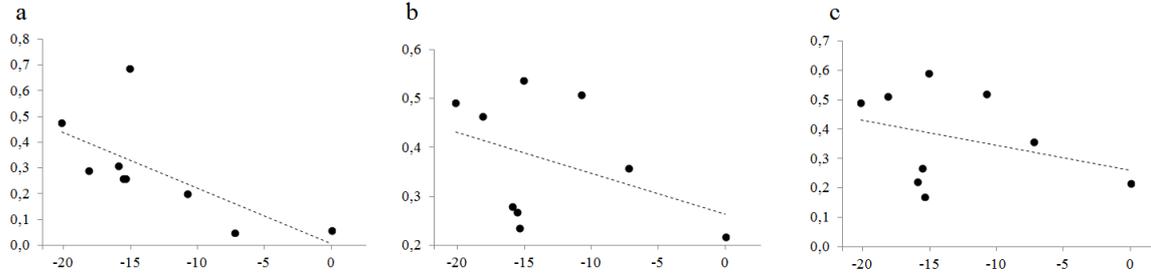
Estado/Província (País)	Localidade	Latitude	Longitude
São Paulo (Brasil)	Batatais	-20,800	-47,733
São Paulo (Brasil)	Franca	-20,533	-47,400
São Paulo (Brasil)	São José do Pinhal	-20,117	-47,833
Sipaliwini (Suriname)	Mamia Pakoro, Vier Gebroeders airstrip	1,963	-55,928
Sipaliwini (Suriname)	6 km à sudeste de Vier Gebroeders hills	2,000	-55,962
Tocantins (Brasil)	Serra Contenda, interflúvio Tocantins-Paraná	-13,396	-47,706
Tocantins (Brasil)	Serra Contenda, interflúvio Tocantins-Paraná	-12,400	-47,683
Tocantins (Brasil)	Aliança do Tocantins	-11,300	-48,933
Tocantins (Brasil)	Parque Estadual do Jalapão	-10,467	-46,317
Tocantins (Brasil)	Parque Estadual do Lajeado	-10,267	-48,367
Tocantins (Brasil)	Tocantínia	-9,550	-48,367
Tocantins (Brasil)	Fazenda Maravilha, Pedro Afonso	-8,950	-47,333
Tocantins (Brasil)	Araguatins	-5,650	-48,117
Tocantins (Brasil)	Araguatins	-5,633	-48,117

Anexo 3.5. Projeção da adequabilidade climática para a espécie *Neothraupis fasciata* para: (a) o período Atual (b) Último Máximo Interglacial (LIG), Último Máximo Glacial (LGM) com a base de dados (c) CCSM4 e (d) MIROC e Holoceno usando a base de dados (e) CCSM4 e (f) MIROC. A linha preta delimita a distribuição conhecida da espécie de acordo com a BirdLife International e NatureServe (2014). Os pontos indicados na projeção para o período atual representam os registros de ocorrência utilizados na simulação.

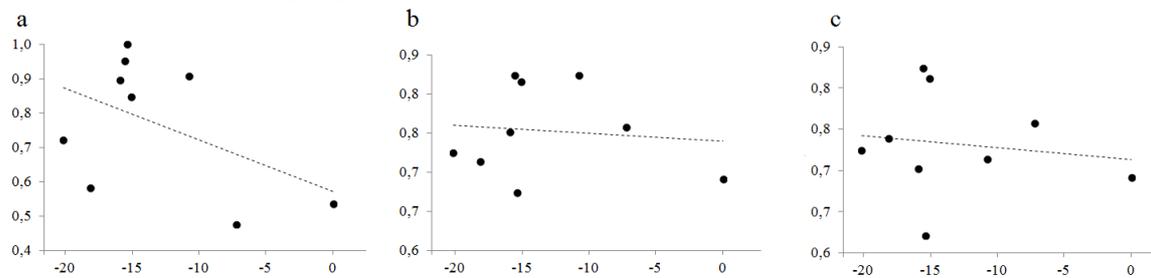


Anexo 3.6. Correlação entre a diversidade genética por localidade amostrada e os gradientes geográficos para *Neothraupis fasciata*. Cada teste foi realizado por marcador, sendo: a) ND2; b) FIB-5 matriz completa; c) FIB-5 matriz reduzida.

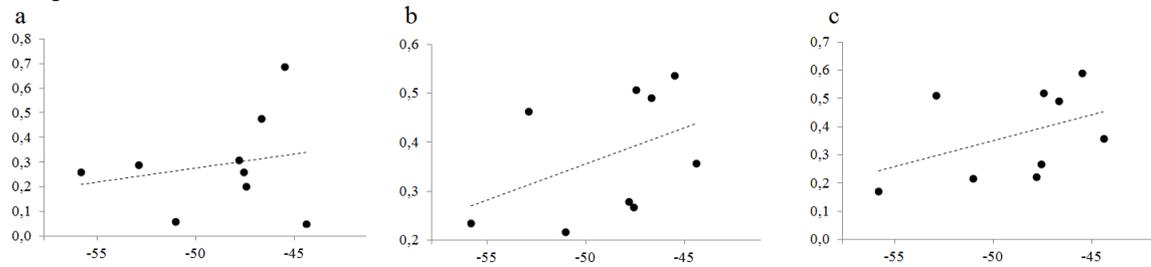
Latitude vs Diversidade nucleotídica



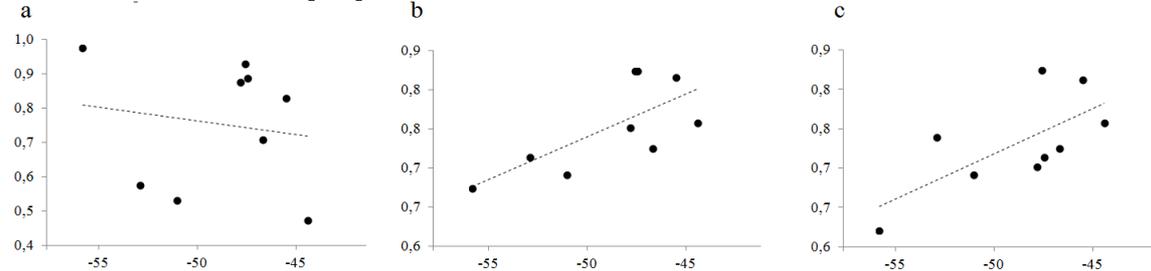
Latitude vs Diversidade haplotípica



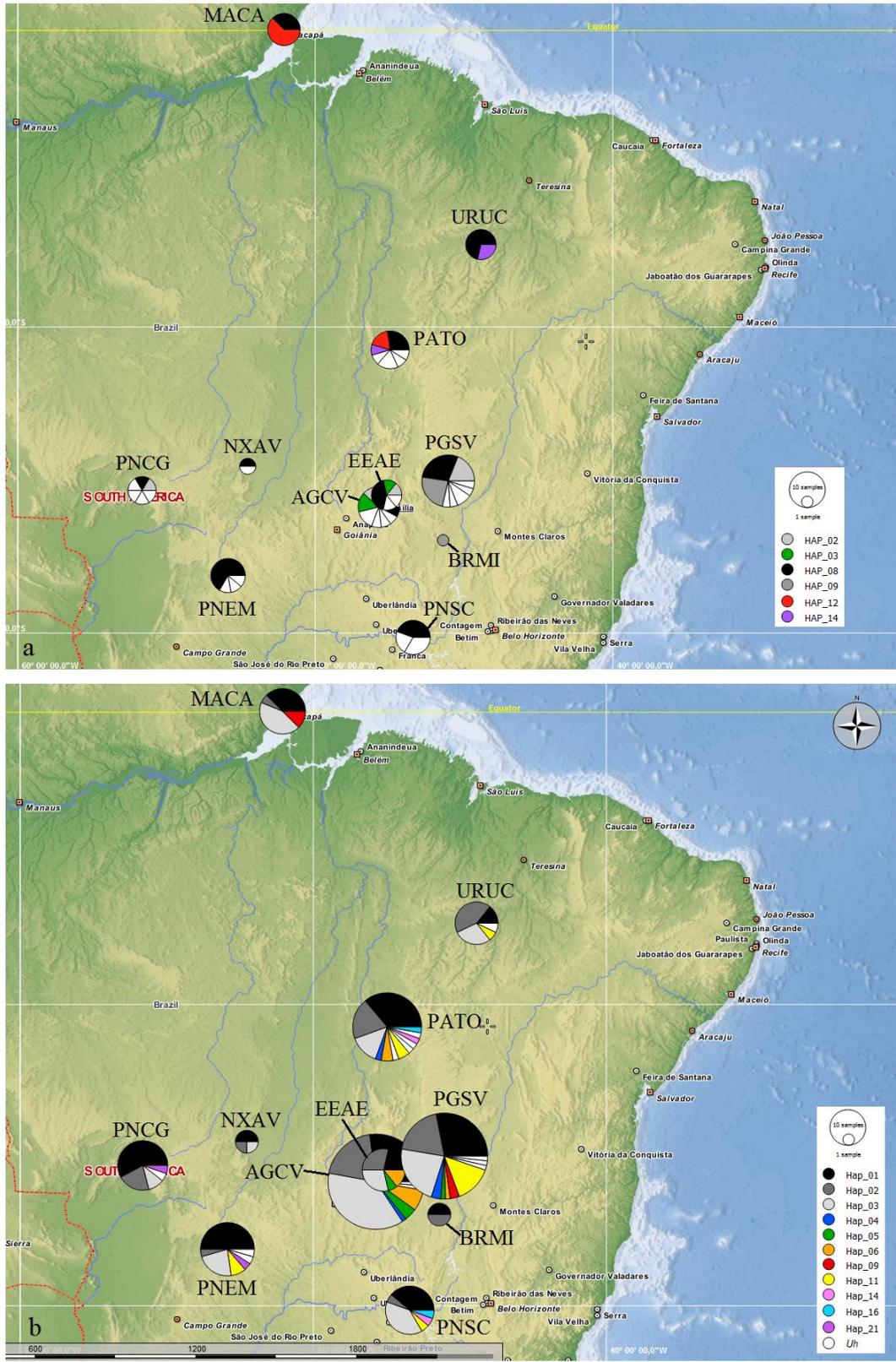
Longitude vs Diversidade nucleotídica



Longitude vs Diversidade haplotípica



Anexo 3.7. Distribuição espacial dos haplótipos identificados para *Neothraupis fasciata* ao longo das localidades amostradas para o marcador ND2 (a) e a matriz completa do FIB-5 (b). Cada cor corresponde à um haplótipo compartilhado por pelo menos duas localidades amostradas, com exceção da cor branca, que indica haplótipos exclusivos para a localidade. Os números dos haplótipos correspondem à Figura 3.7.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



Jalapão, Tocantins.
Foto: Cássia Alves Lima

O presente estudo é o primeiro trabalho a discutir os eventos históricos e recentes relacionados com o padrão filogeográfico e estrutura genética de uma espécie de ave característica do Cerrado, trazendo novas considerações sobre a complexa história biogeográfica de sua avifauna. *Neothraupis fasciata* apresenta variabilidade genética moderada e, com base na distribuição geográfica da diversidade genética e dos haplótipos basais, a porção sul da sua distribuição atual foi identificada como provável área de origem da espécie (Capítulo III). Ainda, a estrutura genética encontrada com base nos dados de sequências indica uma estruturação histórica na possível área de origem da espécie, sendo a delimitação dos grupos possivelmente associada a eventos recorrentes de perda de adequabilidade climática entre estas populações desde o início do Pleistoceno. De forma concordante, os resultados de estrutura populacional utilizando marcadores microssatélites indicam a mesma estrutura no sul da distribuição.

Os testes demográficos indicaram um processo recente de expansão populacional durante o Pleistoceno tardio, que teria contribuído tanto para o reestabelecimento do fluxo gênico entre as populações ao sul da distribuição atual quanto para a colonização (ou recolonização) da porção norte do Cerrado (Capítulo III). Considerando os resultados dos testes de diferenciação e o padrão de compartilhamento de haplótipos, indicamos que a conexão entre a população disjunta do Amapá e as demais localidades possa ter ocorrido via corredor Central da Amazônia (Capítulo III). De forma geral, não foi encontrado suporte para o teste de isolamento por distância, possivelmente em decorrência do processo expansão populacional recente. Diferentes hipóteses relacionadas com os níveis de diversidade genética de uma espécie, como a heterogeneidade do habitat, distribuição centro-periferia e fragmentação do habitat (Capítulo II) além das áreas estáveis ao longo das mudanças climáticas do Quaternário (Capítulo III) também não foram corroboradas com base no conjunto de dados apresentado.

Merece destaque que a população disjunta de *N. fasciata* localizada nas savanas no Amapá constitui um grupo genético distinto, apresentando níveis moderados de diferenciação genética em relação às demais localidades. Adicionalmente, os valores de diversidade genética apresentados por MACA estão entre os mais baixos dentre as localidades amostradas. Desta forma, sugerimos que esta população seja considerada como uma Unidade de Manejo e que mais esforços de conservação sejam direcionados para esta área. Tendo em vista a alarmante taxa de supressão da vegetação natural reportadas para este bioma destacamos a importância de estudos que avaliem os efeitos da fragmentação do habitat à médio e longo

prazo sobre a diversidade genética de diferentes grupos taxonômicos com ocorrência no Cerrado.

Como perspectiva futura, nosso trabalho levanta a relevância de melhor investigar as possíveis rotas de conexão entre as savanas ao norte e sul da Amazônia. Para isso sugerimos estudos comparativos que permitam avaliar qual, ou quais, corredores foram utilizados como rota de conexão entre as savanas da América do Sul. Para contribuir com esta discussão, um estudo envolvendo diferentes espécies com distribuição ao longo das savanas Amazônicas e do Cerrado já vem sendo conduzido pelo Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília utilizando marcadores multilocus obtidos via sequenciamento de nova geração.

PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

SEXUAL DIMORPHISM IN A COOPERATIVE BREEDING TANAGER (*Neothraupis fasciata*, Aves: Thraupidae) SEEMS MORE COMPLEX THAN LITERATURE HAVE SHOWN: THE RELEVANCE OF THE BLACK MASK

Cássia Alves Lima^{1,2} and Renato Caparroz¹

¹ Departamento de Genética e Morfologia, Laboratório de Genética e Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, Brazil, CEP 70910-900.

²Corresponding author; e-mail: cassia.biologia@gmail.com

SEXUAL DIMORPHISM IN *N. FASCIATA*

Abstract.— Sexual dimorphism is widely distributed among birds. However, the lack of consensus and comprehensive descriptions of the dimorphism in some Neotropical species make the sex identification in the field a difficult task. Furthermore, characterization of sexual dimorphism of a species is essential to propose and test hypotheses about the mechanisms responsible for its origin and maintenance. In this context, we examined the sexual size and plumage dimorphism in the White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*) based on wild individuals sexed using DNA-based techniques. Based on eight morphometric traits, in all sampled localities males were on average larger than females, but only in Ponte Alta do Tocantins was found significant size dimorphism. The plumage characterization showed that sexual dimorphism in this species was related to the extension of the black mask, which extended to the lores in males and was restricted to the auriculars in females. Thus, our results showed that *N. fasciata* exhibits dimorphism in size (only one locality) and plumage, indicating that sexual dimorphism in this species seems more complex than have been described in literature. We also emphasize that the extension of the black mask is the best trait for sexing this species, including because it can be applied in immatures. Finally, we pointed out some aspects that should be investigated to better understand the evolution and maintenance of the sexual dimorphism in *N. fasciata*.

Key words: Cerrado; molecular sexing; Neotropical; plumage dichromatism; sexual size dimorphism; SSD; Thraupidae.

Resumo.— **Dimorfismo sexual em um traupídeo com reprodução cooperativa (*Neothraupis fasciata*, Aves: Thraupidae) é mais complexo do que a literatura tem mostrado: a relevância da máscara preta.**— O dimorfismo sexual é amplamente distribuído entre as aves. No entanto, a falta de consenso e descrições detalhadas do dimorfismo em algumas espécies neotropicais faz a identificação do sexo dos indivíduos no campo uma tarefa difícil. Além disso, a caracterização do dimorfismo sexual de uma espécie é essencial para propor e testar hipóteses relacionadas aos mecanismos responsáveis pela sua origem e manutenção. Neste contexto, examinamos o dimorfismo sexual de tamanho e plumagem no tiê-do-cerrado (*Neothraupis fasciata*) com base em indivíduos com sexo confirmado por técnica molecular. Com base nas oito medidas morfométricas avaliadas, em todas as localidades amostradas os machos foram em média maiores do que as fêmeas, mas apenas em Ponte Alta do Tocantins foi encontrado dimorfismo de tamanho significativo. A caracterização da plumagem mostrou que o dimorfismo sexual nessa espécie está relacionado com a extensão da máscara preta, que se estende até o loro nos machos e está restrita à região auricular nas fêmeas. Os resultados mostram que *N. fasciata* apresenta tanto dimorfismo de tamanho (apenas uma localidade) quanto de plumagem, indicando que o dimorfismo sexual nessa espécie parece mais complexo do que tem sido descrito na literatura. Ressaltamos ainda que a extensão da máscara preta é a melhor característica para identificar o sexo dos indivíduos desta espécie, inclusive porque esta característica pode ser aplicada em imaturos. Finalmente, nós apontamos alguns aspectos que podem ser investigados para melhor entender a evolução e manutenção do dimorfismo sexual em *N. fasciata*.

INTRODUCTION

Sexual dimorphism of plumage and/or size is widely distributed among birds (Amadon 1959, Sick 1984, Ridgely & Tudor 1989, Shine 1989, Temeles 2000). Several hypotheses have been proposed to explain the origin and maintenance of the dimorphism, and since Darwin (1871) differences between the sexes are mainly ascribed to the sexual selection mechanism: male-male competition (intrasexual selection) and female choice (intersexual selection). In this context, social mating system and pattern of parental care can be considered important factors determining whether plumage coloration is conspicuous or drab (Darwin 1871, Butcher & Rohwer 1989, Wallace 1889, Andersson & Iwasa 1996). However, since the publication of Darwin's principle of sexual selection, the ability of the mechanisms proposed to explain the immense variation of sexual dimorphism found in nature, especially as considered plumage dimorphism in birds, has been the subject of intense debate (Dunn *et al.* 2015).

In addition, males and females may attain different body sizes, known as sexual size dimorphism (SSD; Amadon 1959, Selander 1966). Male is the largest sex in most bird species (Darwin 1871, Amadon 1959, Jehl-Jr. 1970), although in some cases females are larger than males (reversed SSD), such as some hummingbirds and raptors (Amadon 1959, Jehl-Jr. 1970, Andersson & Norberg 1981, Temeles 2000, Stiles *et al.* 2005). Different hypotheses have been used to explain SSD, but the main hypotheses in passerine birds are sex- (Darwin 1871, Hedrick & Temeles 1989, Andersson & Iwasa 1996, Blondel *et al.* 2002) and environment-related (Hedrick & Temeles 1989, Shine 1989, Blondel *et al.* 2002). On the other hand, in cooperative breeding species, the intrasexual competition (for breeding sites, food, social status, and others) among females can be even greater than in males (Hauber & Lacey 2005, Clutton-Brock 2009). According to these authors, females may acquire traits that improve reproductive success directly by intrasexual competition, resulting in a reduced degree of SSD and also in ornamental plumage. For instance, the influence of reproductive skew and selection on females is well-known for the African starlings (Sturnidae), in which the degree of sexual dimorphism is greater in non-cooperative breeding than in cooperative breeding species (Rubenstein & Lovette 2009). Thus, cooperative breeding species have been shown as important models to study the different forces shaping dimorphism in birds.

In Passeriformes order, sexual dimorphism has been reported for different bird families, such as Emberizidae, Thamnophilidae and Thraupidae (Sick 1984, Isler & Isler 1987, Ridgely & Tudor 1989, Sigrist 2013). In Thraupidae, about half of all species exhibit a marked plumage dimorphism with males being more conspicuously colored than females, such as observed in the genera *Sicalis*, *Dacnis*, *Tangara*, and *Tersina* (Sick 1984, Isler & Isler 1987, Ridgely & Tudor 1989,

Burns 1998, Burns *et al.* 2014). Instead, SSD has not been often reported for Thraupidae (Isler & Isler 1987), with few reports as for two species of the genus *Tangara* (*T. preciosa* and *T. peruviana*) (Firme *et al.* 2014). Besides the importance of correct identification of the individuals' sex in the field for studies of population structure, mating systems, and for making effective decisions for conservation (Hughes 1998), there is a lack of detailed description for either sex or no consensus on the plumage characterization for both sexes of some Neotropical bird species. In this context, we examined sexual dimorphism in the White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*, Thraupidae), a monotypic and cooperative breeding species endemic to the tropical savannas of South America (Cracraft 1985, Pichorim *et al.* 2014).

Based on the plumage color pattern, *N. fasciata* is characterized as sexually monomorphic and drab by some authors (Allen 1981, Isler & Isler 1987, Burns 1998), although others have described this species as dimorphic (Sick 1984, Alves 1988, Ridgely & Tudor 1989, Hilty & de Juana 2013, Sigrist 2013, Duca & Marini 2014a). In general, adult males of this species has a medium gray crown, nape and upperparts to uptails; a broad black mask extending from the forehead through the lores and eyes to the rear cheeks; black bend of wing and lesser and median upperwing coverts; and broadly white-tipped median coverts, which form a prominent white wing bar. Its throat and lower underparts are white, and its chest and upper breast are tinged light pearly gray. Considering the sexual dimorphism, adult females are described as similar to adult males, but duller or slightly duller (Sick 1984, Alves 1988, Ridgely & Tudor 1989, Sigrist 2013, Hilty & de Juana 2013, Duca & Marini 2014a). The immatures are much duller and browner than adults, do not present neither evident black mask nor black wing-coverts contrasting with the white wing-bar (Sick 1984, Alves 1988, Ridgely & Tudor 1989, Hilty & de Juana 2013, Sigrist 2013). This lack of consensus and comprehensive descriptions of the plumage of adult females make sex identification of this species in the field challenging. Therefore, it seems important review the sexual dimorphism in this species, avoiding the sex identification errors of individuals in the field, which cannot be subjected to another method of sex identification. Additionally, some features make this species an excellent model to explore different aspects that may influence sexual dimorphism in birds: *N. fasciata* is a resident and facultative cooperative breeder species that defends a territory year-round and displays hostile interactions between birds of different groups (Alves 1990, Alves & Cavalcanti 1990, Duca & Marini 2014b).

In this paper, we investigated the variation in size and plumage between wild males and females of the White-banded tanager using eight biometric measures and two aspects of plumage coloration of individuals sexed genetically using DNA-based techniques. Then, based on our

results, we point out some lines of study that can improve the understanding the processes involved in the evolution and maintenance of sexual dimorphism in birds, particularly in *N. fasciata*.

METHODS

DATA COLLECTION

White-banded tanagers were attracted by playback calls and caught using mist nets in seven different localities in Brazil: Environmental Protection Area (APA) Gama and Cabeça de Veado, Águas Emendadas Ecological Station, Serra da Canastra National Park, Emas National Park, Chapada dos Guimarães National Park, Grande Sertão Veredas National Park and Ponte Alta do Tocantins (Fig. 1 and TABLE 1). The Chico Mendes Institute for Conservation of Biodiversity provided the permits for the fieldwork (SISBIO n° 27682-1), and the methods were reviewed and authorized by the Comitê de Ética da Universidade de Brasília (UnBDoc n° 75111/2013). All captured birds were banded with numbered metal rings supplied by the National Center for Bird Conservation (CEMAVE) and afterwards released in the capture sites.

Field work was carried from March 2012 to May 2014. Considering that the reproductive period of this tanager starts in the end of dry season and lasts during part of the rainy season (Duca & Marini 2011), we considered birds caught between September and January as sampled during breeding season and those caught between February and August as sampled during non-breeding season. The skull ossification was used to classify individuals as immature or adult (CEMAVE 1994, Roos 2010). Skull ossification in Passeriformes is a process that takes four to twelve months depending on the species (Ralph *et al.* 1993). Thus, individuals with incomplete skull ossification were classified as immature (hatching year), while those with complete ossification were classified as adults.

A set of eight biometric measures were taken from all adult individuals as described by Baldwin *et al.* (1931): total length with feathers (TLF, from the tip of the bill to the rectrices' end), bill length (BL, straight line from the nostril to the tip of the maxilla), bill width at base (BW, measured at the base of the exposed culmen), bill height at base (BH, from the base of exposed culmen to the lower edge of the ramus of the mandible below), tarsus length (TA, from the joint between tibia and metatarsus to the internal base of hallux), tail length (TL, from posterior base of uropygial gland to tip of central rectrices), wing length (WL, from the carpal joint to the tip of the longest primary), and weight (WE). Measurements were done with a Mitutoyo® digital caliper (± 0.05 mm), with the exception of TLF, which was done with a ruler

(\pm 0.5 mm). Individuals weight were taken with a Pesola® dynamometer (precision 0.5 g). All measurements were made by the same observer (CAL).

Plumage characterization of immature and adults was based on general body coloration and black mask extension. Individuals were set into one of three categories of general body plumage coloration: dull brownish – yellowish gray underparts, brown back, lacks evident mask and also does not exhibit black wing-coverts contrasting with the white wing-bar (Fig. 2A); matte grayish – differs from previous category mainly by the black wing-coverts contrasting with the white wing-bar and more distinctive mask, back and breast more grayish, but still presenting scattered brown feathers (Fig. 2B); and bright grayish – gray back and breast, white belly and throat, black wing-coverts contrasting with the white wing-bar and evident black mask (Fig. 2C). We also evaluated the extension of the black mask considering two regions: auriculars (ear-coverts) – corresponding to the feathers that cover the ear opening; and lores – the lateral area of the head between the front of the eyes and the base of the bill. Thus, three categories were used: no black mask (Fig. 2A), black mask extending the auriculars (Fig. 2B) and black mask extending to the lores (Fig. 2C). Although we were aware of subjectivity that plumage categories were chosen, these ones were previously defined in a pilot study conducted in the field to allow the unequivocal categorization of each individual. All individuals were categorized by the same observer (CAL) during the fieldwork.

MOLECULAR SEXING

For each individual, a blood sample of 50-100 μ L was obtained from the brachial wing vein. The blood was drawn from the puncture site with a sterilized microcapillary tube, and the blood samples were stored in absolute ethanol at -20 °C. Total DNA was isolated using proteinase K digestion followed by phenol-chloroform extraction according to standard procedure (Bruford *et al.* 1992). We used the CHD-based sex identification, a sexing technique based on Polymerase Chain Reaction (PCR) using the P2/P8 primers as described by Griffiths *et al.* (1998), to distinguishing between males and females. The sex in this species was identified based on the analysis of the number of fragments (one for males and two for females) observed in 3% agarose gels (Griffiths *et al.* 1998). Positive and negative controls were used at each PCR procedure.

STATISTICAL ANALYSIS

Considering the low number of sampled individuals in some locations ($N < 7$), the SSD was only evaluated in four locations: APA Gama and Cabeça de Veado, Emas National Park, Grande Sertão Veredas National Park and Ponte Alta do Tocantins (see TABLE 1). All statistical

analyses listed below were performed using PAST 3 program (Hammer *et al.* 2001). To evaluate the SSD in these locations, we first conducted a Principal Component Analysis (PCA) to reduce the dimensionality of morphometric data. In PCA analysis, the linear combination of original measures reduces all morphometric data to only two principal components, allowing a better visualization of the differences between sexes. Considering that the variables were taken under two different units (millimeters and grams), we chose the correlation matrix (which normalizes the variables dividing them by their standard deviations, Hammer *et al.* (2015)), to explore the data. The location mean value of TLF was used in two females (one from APA Gama and Cabeça de Veado and one from Ponte Alta do Tocantins) for which it was not possible to obtain this measurement in the field (TABLE 2). Exclusively for Emas National Park, two morphological variables (BW and BH) were not considered due to high number of missing data. To test for significant difference between the sexes in each sampled location, we conducted the non-parametric multivariate method one-way ANOSIM based on Gower distance (Clarke 1993). The R-statistic value describes the extent of similarity between each pair in the ANOSIM analysis, with values close to one indicating that the two groups are entirely separate and a zero value indicating that there is no difference between the groups. The significance was accessed considering 10,000 permutations.

For the sampled locations with significant size differences between the sexes, we also performed a Discriminant Function Analysis (DFA) to evaluate the ability of morphological data to correct classify adult individuals into males and females. First, morphological variables were checked for normality and variance homogeneity. No transformations were necessary to meet parametric assumptions ($P > 0.05$ for all variables). Differences between sexes was tested for each measure using Student's *t*-tests, and only variables that were significant different between males and females were included in the DFA. To predict group membership, we used the minimal Mahalanobis distance from each point to each group multivariate mean. The leave-one-out cross validation using jackknifing procedure was used to check the efficiency of discriminant function in correctly assigning individuals to a group (male or female).

RESULTS

Based on molecular sexing, the morphometric analysis included 79 individuals: 45 males and 34 females (TABLE 1). Plumage color analysis was carried out with 80 individuals: nine immatures (five males and four females) and 71 adults (39 males and 32 females) (TABLE 1).

SIZE DIMORPHISM

Males were in average larger than females in most of the localities analyzed for all morphological traits, except in bill length which presented a reverse pattern in females (TABLE 2). In four localities were observed two distinct groups with low to medium overlapping areas in the PCA (Fig. 3). The first two principal components explained almost 50% of the variance in Grande Sertão Veredas National Park, 60% of the variance in both APA Gama and Cabeça de Veado and Ponte Alta do Tocantins, and 70% of the variance in Emas National Park (Fig. 3). However, the ANOSIM results showed significant size differences between sexes only in Ponte Alta do Tocantins ($R = 0.382$, $P = 0.002$; TABLE 2), indicating presence of SSD in *N. fasciata* from this locality in terms of morphometric measurements. Student's *t*-tests showed that four measures, TLF, TL, WL and BM, were different among the sexes in Ponte Alta do Tocantins (TABLE 2). Finally, the DFA was performed using these four selected measures and the jackknife cross-validation analysis showed that 88.24% of the individuals were correctly assigned to their sex, being more accurate at identifying females (89%) than males (85%) from this sample locality.

SEXUAL PLUMAGE DIMORPHISM

Immatures of both sexes presented dull brownish plumage, except one bright gray immature male, which showed a black mask extending to the lores (TABLE 3). All immature females ($N = 4$) and only one immature male exhibited dull brownish plumage with no black mask. The other three immature males with dull brownish plumage exhibited the black mask extending to the lores (TABLE 3). Ten adults also showed dull brownish plumage, but all males ($N = 3$) had a black mask to the lores, while all females ($N = 7$) showed no black mask (TABLE 3). Among the other adults, 35 males exhibited bright gray plumage with a black mask extending to the lores and only one exhibited matte gray plumage with a black mask to the lores (TABLE 3). All females ($N = 25$) showed a black mask at the auriculars (TABLE 3), however two patterns were observed: 20 females showed matte gray plumage (same pattern of Fig. 2B), whereas five showed bright gray plumage (same pattern of Fig. 2D).

In relation to the capture period, only individuals considered adults were caught during the breeding seasons. All males ($N = 3$) caught during this period showed bright gray plumage with a black mask to the lores (Fig. 4), while females showed two plumage patterns: 40% ($N = 2$) showed dull brownish plumage with no black mask, and 60% ($N = 3$) showed matte gray plumage with a black mask to the auriculars. During the non-breeding seasons, we caught both immature and adults of both sexes. One immature male showed dull brownish plumage with no black mask, three showed dull brownish plumage with a black mask to the lores and one showed bright gray plumage with a black mask to the lores (Fig. 4). All immature females showed dull

brownish plumage with no black mask. Among individuals with complete ossification caught in this period, most of the males (N = 32) showed bright gray plumage with a black mask to the lores (Fig. 4), while three showed dull brownish plumage with a black mask to the lores, and only one showed matte gray plumage with a black mask to the lores. Among the adult females caught during this period, we registered five with dull brownish plumage and no black mask, 17 with matte gray plumage with a black mask in the auriculars and five with bright gray plumage and a black mask in the auriculars (Fig. 4).

DISCUSSION

Our results indicated that sexual dimorphism exists in *N. fasciata* in both size (at least in one location) and plumage, and also emphasizes that dimorphism in this species seems more complex than presented in previous descriptions. The White-banded tanager is described by some authors as monomorphic (Allen 1981, Isler & Isler 1987, Burns 1998), and even the studies that described this species as dimorphic reported only slight plumage dimorphism, generally denoted as females duller or browner than males (Sick 1984, Alves 1988, Ridgely & Tudor 1989, Hilty & de Juana 2013, Sigrist 2013, Duca & Marini 2014a). However,

SIZE DIMORPHISM

Although SSD is not remarkable among tanagers (Isler & Isler 1987), we found SSD in the White-banded tanager. In general, males were larger than females, but only in Ponte Alta do Tocantins males were significantly larger in four traits: total length with feathers, wing length, tail length and weight. Allen (1981) had already pointed out the possibility of size dimorphism in this species considering birds sampled in Mato Grosso, located in the western part of Brazil. The differences in size found between sexes were consistent with previous studies that describe the male as the largest sex in birds (Darwin 1871, Amadon 1959, Jehl-Jr. 1970). In particular, a similar pattern was observed in two species of the genus *Tangara*, in which males have larger wings (*T. periviana* and *T. preciosa*) and tail (*T. preciosa*) (Firme *et al.* 2014). The Henna-capped foliage-gleaner (*Hylocryptus rectirostris*), a bird endemic to the gallery forests of the Cerrado, is another example of species in which males show larger wings than females (Faria *et al.* 2007). Furthermore, the spatial pattern of variation in SSD was also observed in the House finch (*Carpodacus mexicanus*), due to differences in local selection pressures for sexual dimorphism (Badyaev & Hill 2000, Badyaev *et al.* 2000). In this context, the geographic variation in the degree of sexual size dimorphism found for the White-banded tanager reinforces the importance of

considering the geographical scale in body size when measuring birds in the field as previously described by Blanckenhorn *et al.* (2006).

PLUMAGE DIMORPHISM

According to the literature, immatures of *N. fasciata* are much duller (or browner) than adults and lack both mask and black-and-white wing pattern (Sick 1984, Alves 1988, Ridgely & Tudor 1989, Hilty & de Juana 2013, Sigrist 2013). More specifically, according to Alves (1988), this plumage pattern occurs in individuals with less than six months old, after that, individuals gradually acquire the dark mask and black-and-white wing pattern. This plumage succession seems to occur in juveniles between 1 month old and one-year-old (Hilty & de Juana 2013, Duca & Marini 2014a). We found that the majority of immatures showed dull brownish plumage, reinforcing these previous descriptions. However, some individuals classified as adults (complete ossification) also showed dull brownish plumage. Among these individuals, only males showed black mask and were caught in May (non-breeding period), and probably were individuals from the previous breeding season, with about six months old. In contrast, all adult females with dull brownish have no black mask and were caught during breeding and non-breeding periods, likely representing individuals between six months and one-year-old. Thus, these findings suggest that the black mask appears earlier in males than females, contrasting with Alves' description, in which both sex begin to acquire the black mask with around six months.

We also found one adult male and 20 adult females with matte gray plumage. This plumage pattern has been found in individuals described as sub-adults (Alves 1988, Hilty & de Juana 2013, Duca & Marini 2014a) and seems to occur in individuals between 1 and 2 years old (Hilty & de Juana 2013, Duca & Marini 2014a). All these individuals also showed black mask, but in males it extends to the lores while in females was restricted to the auriculars. Considering that we caught almost the same number of adult males and females, this result may be interpreted as males retaining the sub-adult plumage during a shorter period than females, and acquiring the full adult plumage (bright gray pattern) faster than females.

On the other hand, the majority of adult males (90%) and only five adult females (16%) showed bright gray pattern. Furthermore, in bright gray individuals both sex showed the mask with almost the same black intensity (see Fig. 2E), but restricted to the auriculars in females and extending to the lores in males. These findings contrast with some previous description in which the plumage of adult females of *N. fasciata* is duller or browner (e.g. Sick 1984, Alves 1988, Duca & Marini 2014a) than adult males, with brown (Alves 1988) or dark gray mask (Duca & Marini 2014a). Thus, both the intensity of plumage brightness and mask color do not seem the best way

to classify individuals into each sex, as females may also exhibit bright gray plumage and black mask. Furthermore, the extension of the black mask seems to be more relevant to identify the sex in this species, since black mask extending to the lores was observed in all males with full adult plumage and in some immature males with dull brownish plumage, but was never observed in females. Based on that, we recommend to use the extension of the black mask instead the color intensity as a main diagnose character for sexing *N. fasciata*.

FUTURE PERSPECTIVES

Taking into account the characterization of sexual dimorphism of a species is essential to propose and test hypotheses about the mechanisms responsible for its origin and maintenance, our findings added to the previous descriptions provide a starting point for future work to understand the evolution of sexual dimorphism in this species. Geographical variations in the selection pressures in this species have yet to be investigated to better understand which principles or mechanisms may be driving the SSD in this species. Considering that large size in males may evolve due to the advantages of large size in intrasexual competition for breeding territories and mates, and sex differences in the provision of parental care (Selander 1972, Clutton-Brock *et al.* 1977, Shine 1989, Blondel *et al.* 2002), we can ask: is the observed pattern of larger body size in males related to advantages during territorial defense and /or male's competition for mating in *N. fasciata*? Is it locally associated with territories density and/or size?

In relation to plumage dimorphism, Rubenstein & Lovette (2009) showed that degree of dimorphism is lower in cooperative breeding than in non-cooperatively species in response to increased intrasexual competition among females. Moreover, changes in social status, particularly in the breeding status, may be signaled by individuals' capacity of increasing plumage brightness (e.g. Karubian 2008, Solís *et al.* 2008). Since *N. fasciata* is a cooperative breeding species, another important issue may be address: is the bright plumage of females a result of increased intrasexual selection on female's plumage traits? Or the expression of the black mask in females is correlated with the expression of this trait in their male relatives, as suggested by Lande (1980)? In this context, some field observations during our study may be seen as indicative of possible existence of plumage variation in relation to the social status of the adult females. We used playback calls to attract birds for the nets, as both males and females defend their territory (Duca & Marini 2014b) and respond agonistically to *playback* calls. In each sampled point, we usually captured from two to six individuals, which seems to correspond to a single territorial group. Group size in this species ranges from two to eight individuals per territory (Alves 1990, Duca & Marini 2014b). We never caught more than one bright-gray female per sampled point, and in some cases

we caught both bright and matte gray females in the same point. In contrast, more than one bright gray male was captured frequently in each sampled point. For instance, in one sampled point in AGCV, we caught six individuals: two bright gray males, two dull brownish males, one matte gray female and one bright gray female. Based on these observations, we suspect that bright gray females were the breeders in each group while matte gray females were non-reproductive and act as helpers in *N. fasciata* groups.

CONCLUSION

Our findings showed that *Neothraupis fasciata* exhibits dimorphism in size and agree partially with some authors that exhibits dimorphism in plumage, indicating that sexual dimorphism in this species seems more complex than have been described in literature. The SSD was observed in a single locality, which limits the application of the discriminant function only for sexing individuals in local scale. Similarly, even considering post-hatch year individuals (with complete skull ossification) the difference between the sexes was subtle to distinguish considering the bright grayish plumage, as the majority of adult males and few females shared this plumage pattern. Therefore we emphasize that the observation of the extension of the black mask (to the lores in males and restricted to the auricular in females) was the best trait of sexing this species, including because it can also be applied in young birds. Finally, the complex plumage pattern observed in *N. fasciata* can be seen as an interesting issue to be studied to understand the processes involved in the evolution of sexual dimorphism in birds, especially in cooperative bird species.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Renan S. Rezende for the help with statistical analysis, to the Laboratório de Genética e Biodiversidade/UnB group for help during field and laboratory works, specially to Renata Oliveira de Souza for helping with the molecular sexing. To Dr. Miguel A. Marini and Gabriela D. Correa for help with the acquisition of Águas Emendadas Ecological Station samples, and to the Directors and employees of Serra da Canastra National Park, Emas National Park, Chapada dos Guimarães National Park, Grande Sertão Veredas National Park, IBGE-DF Ecological Reserve, Jardim Botânico de Brasília Ecological Station, and the Fazenda Nova Aliança, in Ponte Alta do Tocantins, for assistance during field work. This study is part of the GENPAC – Geographical Genetics and Regional Planning for natural resources in Brazilian Cerrado (564036/2010-2) and PPBio (457444/2012-6) Projects supported by CNPq/MCT/CAPES. CAL received scholarship from CAPES and CNPq.

REFERENCES

- Allen, J. A. 1891. On a collection of birds from Chapada, Matto Grosso, Brazil, made by Mr. Herbert H. Smith. Part I - Oscines. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 3: 337–381.
- Alves, M. A. S. Organização social e biologia reprodutiva de *Neothraupis fasciata* (Passeriformes: Thraupidae). 1988. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.
- Alves, M. A. S. 1990. Social system and helping behavior in the White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*). *Condor* 92: 470–474.
- Alves, M. A. S. 1991. Dieta e táticas de forrageamento de *Neothraupis fasciata* em Cerrado no Distrito Federal, Brasil (Passeriformes: Emberizidae). *Ararajuba* 2: 25–29.
- Alves, M. A. S., & R. B. Cavalcanti. 1990. Ninhos, ovos e crescimento de filhotes de *Neothraupis fasciata*. *Ararajuba* 1: 91–94.
- Amadon, D. 1959. The significance of sexual differences in size among birds. *Proc. Am. Phil. Soc.* 103: 531–536.
- Andersson, M., & Y. Iwasa. 1996. Sexual selection. *Trends Ecol. Evol.* 11: 53–58.
- Andersson, M., & R. Å. Norberg. 1981. Evolution of reversed sexual size dimorphism and role partitioning among predatory birds, with a size scaling of flight performance. *Biol. J. Linn. Soc.* 15: 105–130.
- Badyaev, A. V., & G. E. Hill. 2000. The evolution of sexual dimorphism in the House finch. I. Population divergence in morphological covariance structure. *Evolution* 54: 784–1794.
- Badyaev, A. V., G. E. Hill, A. M. Stoehr, P. M. Nolan, & D. J. McGraw. 2000. The evolution of sexual size dimorphism in the House finch II. Population divergence in relation to local selection. *Evolution* 54: 2134–2144.
- Baldwin, S. P., H. C. Oberholser, & L. G. Worley. 1931. Measurements of birds. *Sci. Publ. Clevel. Mus. Nat. Hist.* 2: 1–165.
- Birdlife International, & NatureServe. 2014. Bird species distribution maps of the world. The IUCN Red List of Threatened Species Version 2015-3.
- Blanckenhorn, W. U., R. C. Stillwell, K. A. Young, C. W. Fox, & K. G. Ashton. 2006. When Rensch meets Bergmann: Does sexual size dimorphism change systematically with latitude? *Evolution* 60: 2004–2011.
- Blondel, J., P. Perret, M. C. Anstett, & C. Thébaud. 2002. Evolution of sexual size dimorphism in birds: Test of hypotheses using Blue tits in contrasted Mediterranean habitats. *J. Evol. Biol.* 15: 440–450.
- Bruford, M. W., O. Hanotte, J. F. Y. Brookfield, & T. Burke. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. Pp 225–269 *in* Hoelzel, A. R. (ed.). *Molecular genetic analysis of populations*. IRL Press, Oxford, England.

- Burns, K. J. 1998. A phylogenetic perspective on the evolution of sexual dichromatism in tanagers (Thraupidae): The role of females versus male plumage. *Evolution* 52: 1219–1224.
- Burns, K. J., J. S. Allison, O. T. Pascal, N. A. Mason, F. K. Barker, J. Klicka, S. M. Lanyon, & I. J. Lovette. 2014. Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Mol. Phyl. Evol.* 75: 41–77.
- Butcher, G. S., & S. Rohwer. 1989. The evolution of conspicuous and distinctive coloration for communication in birds. *Current Ornithology* 6: 51–108.
- CEMAVE. 1994. Manual de anilhamento de aves silvestres. 2nd ed, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- Clarke, K. R. 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18: 117–143.
- Clutton-Brock, T. H. 2009. Sexual selection in females. *Anim. Behav.* 77: 3–11.
- Clutton-Brock, T. H., P. H. Harvey, & B. Rudder. 1977. Sexual dimorphism, socionomic sex ratio and body weight in primates. *Nature* 269: 797–800.
- Cracraft, J. 1985. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: Areas of endemism. *Ornithol. Monogr.* 36: 49–84.
- Darwin, C. 1871. *The descent of the man, and selection in relation to sex*, John Murray, London.
- Duca, C. G., & M. A. Marini. 2011. Variation in breeding of the Shrike-like tanager in central Brazil. *Wilson J. Ornithol.* 123: 259–265.
- Duca, C. G., & M. A. Marini. 2014a. High survival and low fecundity of a Neotropical savanna tanager. *Emu* 114: 121–128.
- Duca, C. G., & M. A. Marini. 2014b. Territorial system and adult dispersal in a cooperative-breeding tanager. *Auk* 131: 32–40.
- Dunn, P. O., J. K. Armenta, & L. A. Whittingham. 2015. Natural and sexual selection act on different axes of variation in avian plumage color. *Sci. Adv.* 1: e1400155.
- Eisermann, K. 2011. Azure-rumped tanager *Tangara cabanisi*: From ornithological enigma to conservation flagship. *Neotrop. Birding* 9: 44–50.
- Faria, L. P., L. A. Carrara, & M. Rodrigues. 2007. Dimorfismo sexual de tamanho no fura-barreira *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). *Rev. Bras. Ornitol.* 24: 207–212.
- Firme, D. H., C. P. Assis, L. Seixas, I. G. Alpino, & M. A. Raposo. 2014. Taxonomia alfa de *Tangara peruviana* (Desmarest, 1805) e *Tangara preciosa* (Cabanis, 1851) (Aves, Passeriformes, Emberizidae). *Arq. Mus. Nac.* 65: 39–46.
- Gelis, R. A., H. F. Greeney, & C. Dingle. 2006. Cooperative breeding and first nest description for Golden tanager *Tangara arthus*. *Cotinga* 26: 79–81.

- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr, & R. J. G. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7: 1071–1075.
- Hammer, Ø, D. A. T. Harper, & P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4–9.
- Hammer, Ø, D. A. T. Harper, & P. D. Ryan. 2015. PAST: Reference Manual. Available via <http://folk.uio.no/ohammer/past/past3manual.pdf>
- Hauber, M. E., & E. A. Lacey. 2005. Bateman's principle in cooperatively breeding vertebrates: The effects of non-breeding alloparents on variability in female and male reproductive success. *Integr. Comp. Biol.* 45: 903–914.
- Hedrick, A. V., & E. J. Temeles. 1989. The evolution of sexual dimorphism in animals: Hypotheses and tests. *Trends. Ecol. Evol.* 4: 136–138.
- Hilty, S. 2011. Golden-hooded tanager (*Tangara larvata*). Handbook Birds World Alive. Available via <http://www.hbw.com/node/61710>.
- Hilty, S., & E. de Juana. 2013. White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*). Handbook Birds World Alive. Available via <http://www.hbw.com/node/61574>.
- Hughes, C. 1998. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: A revolution results. *Ecology* 79: 383–399.
- Isler, M. L., & P. R. Isler. 1987. The Tanagers. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Jehl-Jr, R. J. 1970. Sexual selection for size differences in two species of Sandpipers. *Evolution* 24: 311–319.
- Karubian, J. 2008. Changes in breeding status are associated with rapid bill darkening in male red-backed Fairy-wrens *Malurus melanocephalus*. *J. Avian Biol.* 39: 81–86.
- Lande, R. 1980. Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution* 34: 292–305.
- Las-Casas, F. M. G., & S. M. Azevedo-Júnior. 2009. Dimorfismo sexual de tamanho no beija-flor-de-costas-violetas *Thalurania watertonii* (Bourcier, 1847) (Aves: Trochilidae): implicações ecológicas. *Ornithol.* 3: 83–89.
- Ministério do Meio Ambiente. 2006. Mapa de Cobertura vegetal do Bioma Cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados; Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; Goiânia: Universidade Federal de Goiás (eds.). Available via <http://mapas.mma.gov.br/mapas/aplic/probio/datadownload.htm?/cerrado>
- Pichorim, M., M. Silva, B. R. A. França, T. M. Oliveira-Júnior, & M. C. Rodrigues. 2014. A Cerrado bird community in the northernmost portion of northeastern Brazil - Recommendations for conservation. *Rev. Bras. Ornitol.* 22: 347–362.
- Ralph, C. J., P. P. Geupel, T. E. Martin, & D. F. DeSante. 1993. Handbook of field methods for monitoring landbirds. Pacific Southwest Research Station, Albany, California.

- Ridgely, R. S., & G. Tudor. 1989. *The Birds of South America. The Oscine Passerines.* University of Texas Press, Austin.
- Roos, A. L. 2010. *Capturando Aves.* In: Matter, S. V., F. C. Straube, I. Accordi, V. Piacentin, & F. J. Cândido-Jr. (eds). *Ornitologia e conservação: Ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento.* Technical Books, Rio de Janeiro.
- Rubenstein, D. R., & I. J. Lovette. 2009. Reproductive skew and selection on female ornamentation in social species. *Nature* 462: 786–789.
- Selander, R. K. 1966. Sexual dimorphism and differential niche utilization in birds. *Condor* 68: 113–151.
- Selander, R. K. 1972. Sexual selection and dimorphism in birds. In Campbell, B. G. (ed). *Sexual selection and the descent of man,* Aldine Publ. Co., Chicago.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: A review of the evidence. *Q. Rev. Biol.* 64: 419–461.
- Sick, H. 1984. *Ornitologia Brasileira, uma introdução.* Editora Universidade de Brasília, Brasília.
- Sigrist, T. 2013. *Guia de campo Avis Brasilis - Avifauna Brasileira.* 3rd ed, Avis Brasilis, São Paulo.
- Solís, E., J. M. Avilés, C. La Cruz, J. Valencia, & G Sorci. 2008. Winter male plumage coloration correlates with breeding status in a cooperative breeding species. *Behav. Ecol.* 19: 391–397.
- Stiles, F. G., D. L. Altshuler, & R. Dudley. 2005. Wing morphology and flight behavior of some North American hummingbirds. *Auk* 122: 872–886.
- Temeles, E. J. 2000. Evidence for ecological causation of sexual dimorphism in a hummingbird. *Science* 289: 441–443.
- Wallace, A. R. 1889. *Darwinism - An exposition of the Theory of Natural Selection with some of its applications,* Macmillan, London. Available via <http://biodiversitylibrary.org/page/2482167>

TABLE 1. Sampled locations and sample size of the White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*) used in the size and plumage dimorphism analysis. Locations with asterisk mark were not considered for size dimorphism. F - females; M - males.

Location	Abbreviation	Coordinates	Size		Plumage	
			F	M	F	M
Environmental Protection Area Gama and Cabeça de Veado	AGCV	15°56'S, 47°51'W	7	8	8	8
Águas Emendadas Ecological Station*	EEAE	15°33'S, 47°36'W	0	0	4	1
Serra da Canastra National Park*	PNSC	20°20'S, 46°38'W	4	3	4	2
Emas National Park	PNEM	17°55'S, 52°58'W	4	6	2	1
Chapada dos Guimarães National Park*	PNCG	15°24'S, 55°49'W	2	1	5	5
Grande Sertão Veredas National Park	PGSV	15°18'S, 45°37'W	8	19	9	22
Ponte Alta do Tocantins	PATO	10°45'S, 47°30'W	9	8	4	5

TABLE 2. Sample size (n), mean, and minimum (Min) and maximum (Max) values of eight morphological traits for female and male White-banded tanagers (*Neothraupis fasciata*) in different locations in Brazilian Cerrado (for location abbreviations, see TABLE 1). Locations with more than seven individuals (females + males) had sexes compared with ANOSIM test (look ANOSIM's R value and its P-value). Student's *t*-tests was performed only for Ponte Alta do Tocantins (PATO) (look t value and its P-value). All units are in mm, except for BM in grams.

Sample locality	ANOSIM R (P)	Measure	Females			Males			t (P)
			n	Mean ± SD	Min–Max	n	Mean ± SD	Min–Max	
AGCV	-0.036 (0.583)	TLF	6	167.50 ± 7.58	155–175	8	167.5 ± 8.45	155 —175	
		BL	7	10.06 ± 0.44	9.45–10.71	8	10.32 ± 0.30	9.88 —	
		BW	7	8.82 ± 0.36	8.39–9.21	8	8.84 ± 0.44	8.30 —9.48	
		BH	7	8.05 ± 0.25	7.71–8.34	8	8.27 ± 0.23	8.02 —8.59	
		TA	7	23.92 ± 0.89	22.14–24.74	8	23.09 ± 3.24	15.38 —	
		TL	7	73.11 ± 2.58	69.10–75.25	8	71.90 ± 4.14	64.43–77.28	
		WL	7	73.22 ± 1.62	70.07–75.25	8	73.71 ± 2.29	71.41–77.22	
		WE	7	29.57 ± 1.62	28–32	8	27.50 ± 2.33	24–31	
PNEM	0.223 (0.095)	TLF	4	161.25 ± 4.79	155–165	6	164.17 ± 8.61	155–180	
		BL	4	10.20 ± 0.27	9.92–10.56	6	10.16 ± 0.16	9.98–10.42	
		TA	4	22.29 ± 1.03	20.92–23.33	6	23.43 ± 0.50	22.43–23.82	
		TL	4	68.02 ± 3.79	62.54–70.98	6	69.95 ± 3.17	64.61–74.2	
		WL	4	64.75 ± 1.63	63.62–67.17	6	70.93 ± 3.19	65.25–74.66	
		WE	4	26.75 ± 2.63	24.50–30.50	6	27.25 ± 1.57	25.5–30	
PGSV	0.082 (0.199)	TLF	8	165 ± 6.55	155–175	19	168.16 ± 6.06	155–180	
		BL	8	10.81 ± 0.51	10.11–11.56	19	10.71 ± 0.51	9.87–11.58	
		BW	8	8.87 ± 0.31	8.39–9.45	19	8.98 ± 0.25	8.42–9.37	
		BH	8	8.37 ± 0.26	7.93–8.85	19	8.43 ± 0.30	7.95–9.06	

Continua

Sample locality	ANOSIM R (P)	Measure	Females			Males			t (P)
			n	Mean ± SD	Min–Max	n	Mean ± SD	Min–Max	
PATO	0.382 (0.002)	TA	8	24.56 ± 0.94	22.79–25.93	19	24.23 ± 0.81	22.41–25.53	
		TL	8	72.31 ± 2.82	67.39–77.16	19	74.55 ± 3.01	70.11–81.39	
		WL	8	72.24 ± 1.65	69.30–74.57	19	75.32 ± 2.02	72.14–79.31	
		WE	8	29.75 ± 2.19	27–33	19	29.42 ± 1.61	27–32	
		TLF	8	161.88 ± 4.58	155–170	8	169.38 ± 4.17	165–175	-3.612 (0.003)
		BL	9	10.12 ± 0.52	9.41–10.87	8	10.28 ± 0.64	9.48–11.27	-0.569 (0.578)
		BW	9	8.50 ± 0.26	8.19–8.94	8	8.55 ± 0.31	7.88–8.88	-0.371 (0.716)
		BH	9	8.35 ± 0.43	7.75–9.18	8	8.17 ± 0.24	7.76–8.45	1.049 (0.311)
		TA	9	23.46 ± 0.87	22.24–25.32	8	23.50 ± 0.55	22.66–24.14	-0.124 (0.903)
		TL	9	68.13 ± 2.47	64.60–71.61	8	71.02 ± 2.39	67.91–75.24	-2.446 (0.027)
PNCG		WL	9	69.90 ± 1.36	68.41–72.60	8	73.97 ± 2.10	70.87–77.71	-4.796 (<0.001)
		WE	9	27.78 ± 1.20	26–30	8	29.63 ± 1.06	28–31	-3.340 (0.004)
		TLF	1	150	150	1	160	160	
		BL	2	10.50 ± 0.13	9.96–10.14	1	8.95	8.95	
		BW	2	8.72 ± 0.25	8.54–8.90	1	7.32	7.32	
		BH	2	7.66 ± 0.14	7.56–7.76	1	5.88	5.88	
		TA	2	23.33 ± 0.13	23.24–23.42	1	24	24	
		TL	1	61.74	61.74	1	64.38	64.38	
		WL	2	67.10 ± 0.93	66.44–67.76	1	71.08	71.08	
		PNSC		TLF	4	170.75 ± 3.38	165–178	3	168.33 ± 1.67
BL	4			10.67 ± 0.42	9.74–11.78	3	10.38 ± 0.16	10.06–10.56	
BW	4			8.49 ± 0.19	8.02–8.93	3	8.78 ± 0.31	8.42–9.39	

Continua

Sample locality	ANOSIM R (<i>P</i>)	Measure	Females			Males			t (<i>P</i>)
			n	Mean ± SD	Min–Max	n	Mean ± SD	Min–Max	
		BH	4	8.52 ± 0.26	7.93–9.14	3	8.9 ± 0.23	7.84–8.58	
		TA	4	23.99 ± 0.11	23.8–24.26	3	24.56 ± 0.13	24.30–24.73	
		TL	4	71.28 ± 0.79	69.89–73.05	3	72.70 ± 0.31	72.33–73.32	
		WL	4	73.27 ± 0.68	72.17–75.12	3	74.48 ± 0.36	74.10–75.19	
		WE	4	30 ± 0.41	29–30	3	32.17 ± 1.42	30.5–35	

TLF - Total length with feathers; BL - Bill length, BW - Bill width; BH - Bill height, TA - Tarsus length, TL - Tail length, WL- Wing length; WE - Weight.

TABLE 3. Plumage characterization of the White-banded Tanager, and the number individuals included in each plumage category.

Plumage category	Male		Female	
	Immature	Adult	Immature	Adult
Dull brownish				
No black mask	1	0	4	7
Black mask in the auriculars	0	0	0	0
Black mask until the lores	3	3	0	0
Matte gray				
No black mask	0	0	0	0
Black mask in the auriculars	0	0	0	20
Black mask until the lores	0	1	0	0
Bright gray				
No black mask	0	0	0	0
Black mask in the auriculars	0	0	0	5
Black mask until the lores	1	35	0	0
Total	5	39	4	32

Figure legends

FIG. 1 Geographical distribution of *Neothraupis fasciata* in Cerrado and sample sites. Species distribution is according to BirdLife International & NatureServe (2014), and Cerrado distribution is according to the Ministério do Meio Ambiente (2006). Abbreviations of the names of the sample locality according to TABLE 1.

FIG. 2 Plumage dimorphism in the White-banded tanager (*Neothraupis fasciata*). A) immature with drab brownish plumage and no mask; B) adult females with matte grayish plumage and black mask at the auriculars; C) adult male individual with bright grayish plumage and black mask extending to the lores; D) adult female with bright grayish plumage, black mask at the auriculars and dark gray coloration at the lores; and E) adult bright gray male (left) and bright gray female (right) exposed to the same light conditions.

FIG. 3 Principal components I and II of morphometric measurements of male and female *Neothraupis fasciata* over four different sample localities. Males are represented by blank squares and females fill circles. The variance (%) explained by each component is given in parenthesis. Abbreviations of the names of the sample locality according to TABLE 1.

FIG. 4 Percentage of each plumage category in relation to age, sex and capture period of *Neothraupis fasciata*. Plumage categories are: I) dull brownish with no black mask, II) dull brownish with black mask to the lores, III) matte gray with black mask in the auriculars, IV) matte gray with black mask to the lores, V) bright gray with black mask in the auriculars, and VI) bright gray with black mask to the lores.

FIG. 1

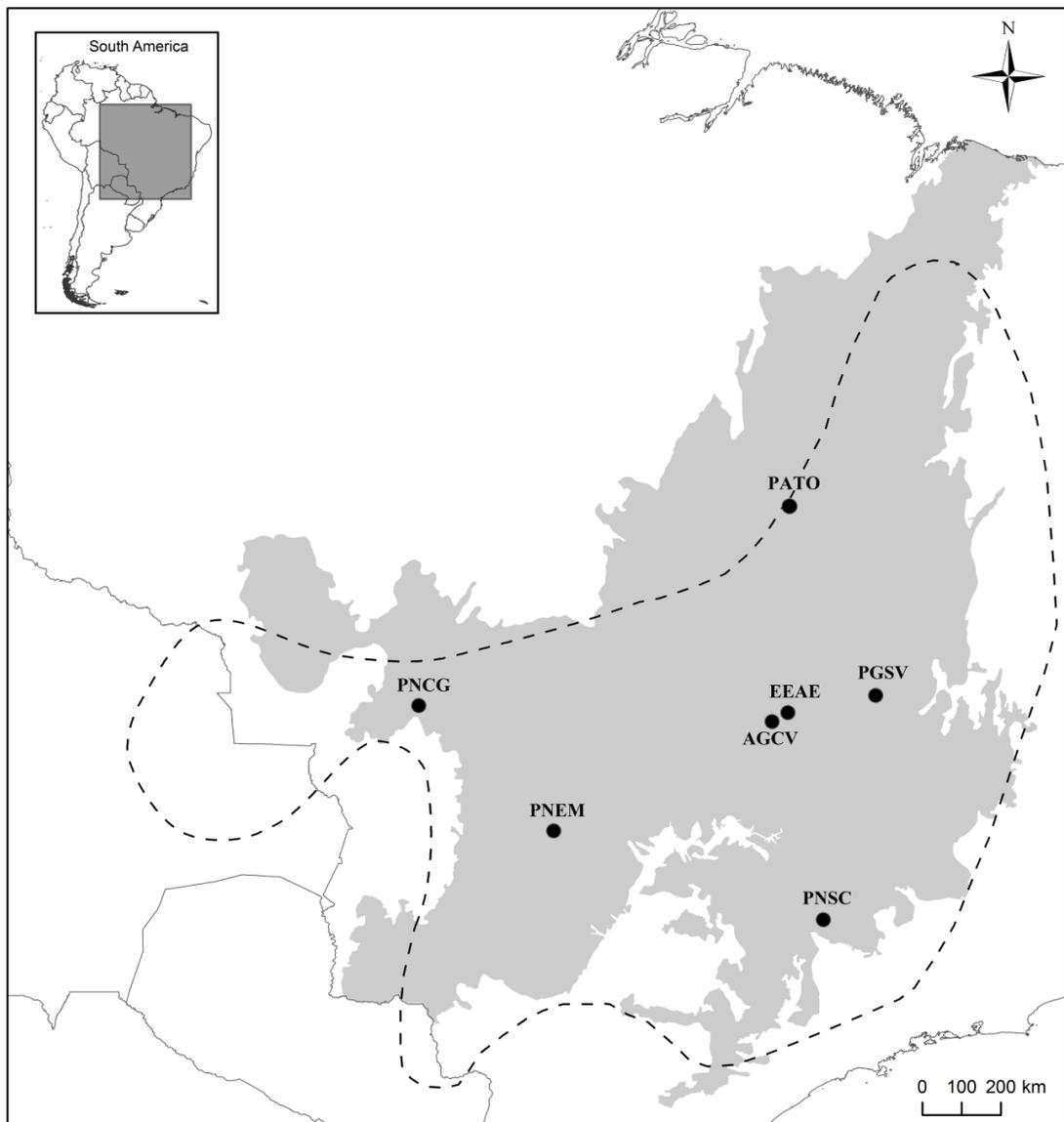
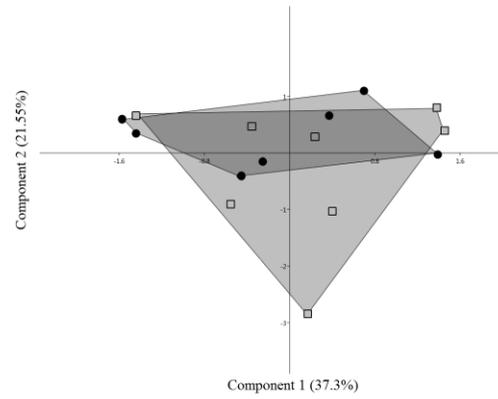


FIG. 2

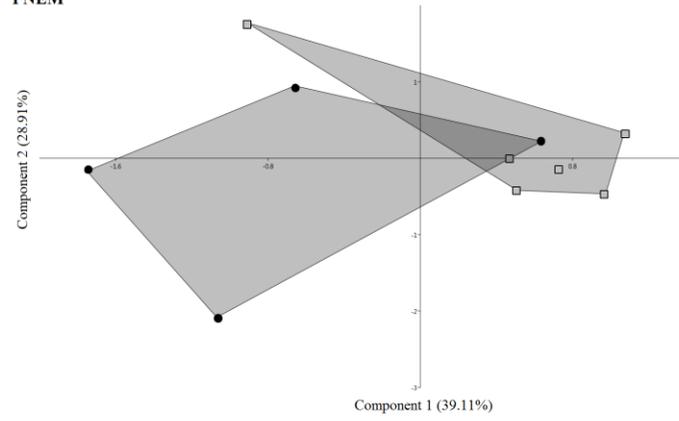


FIG. 3

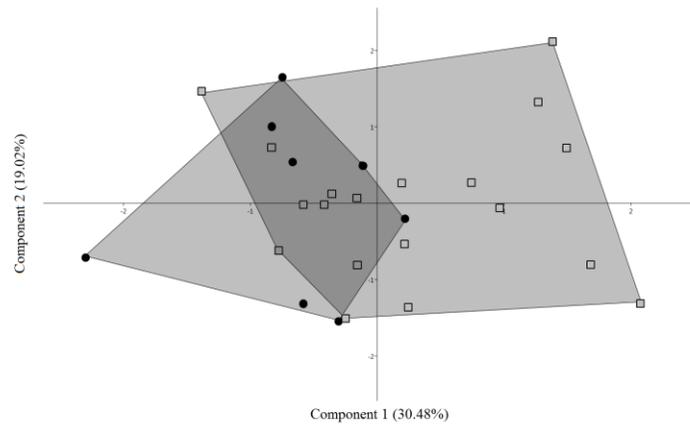
AGCV



PNEM



PGSV



PATO

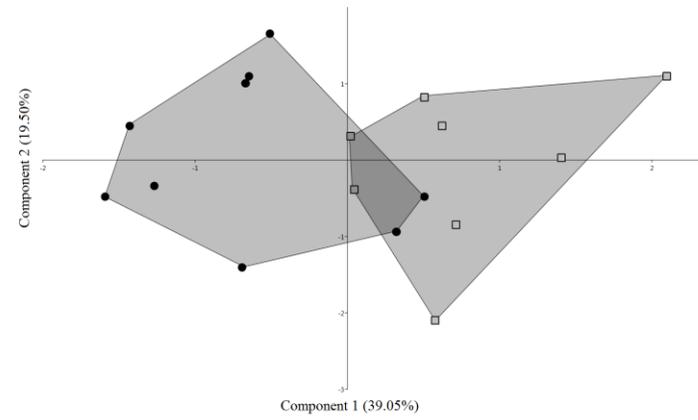


FIG. 4

