



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**FILOGENIA MOLECULAR DO GÊNERO *SICALIS*
(PASSERIFORMES, AVES): ENFOQUE NA FILOGEOGRAFIA DO
CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*)**

Rosana de Souza Rezende

**Brasília – DF
2015**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**FILOGENIA MOLECULAR DO GÊNERO *SICALIS*
(PASSERIFORMES, AVES): ENFOQUE NA FILOGEOGRAFIA DO
CANÁRIO-DA-TERRA (*Sicalis flaveola*)**

**Rosana de Souza Rezende
Orientador: Dr. Renato Caparroz
Co-orientador: Dr. Luis Fábio Silveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal como parte dos requisitos necessários para à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

**Brasília – DF
2015**

Dissertação de Mestrado

ROSANA DE SOUZA REZENDE


Título:

“Filogenia molecular do gênero *Sicalis* (Passeriformes, Aves): enfoque na filogeografia do canário-da-terra (*Sicalis flaveola*)”

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Renato Caparroz
Presidente / Orientador
UnB


Prof. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães
Titular Interna Vinculada ao Programa
UnB/IB


Prof. Dr. Carlos Abs da Cruz Bianchi
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UFG

Prof. Dra. Lilian Gimenes Giugliano
Membro Suplente
Interno Vinculado não vinculado ao Programa
UnB/IB

Brasília, 26 de fevereiro de 2015.

“Dedico aos meus pais, aos meus irmãos e aos canários”

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus pela força e principalmente proteção, que me ajudaram a superar e a sobreviver a todas as adversidades ao longo dessa caminhada. Ainda agradeço a Ele pela oportunidade de ter convivido com pessoas maravilhosas, sem as quais eu não teria a oportunidade de aprender e crescer como profissional e como pessoa, além da possibilidade de conhecer lugares maravilhosos.

Ao meu orientador Renato Caparroz, que mesmo sabendo das minhas limitações aceitou me orientar e por se mostrar justo, presente, atencioso e comprometido. Não tenho palavras para descrever minha imensa admiração pelo profissional que é. Quero também agradecer a sua família, Lu, Ana, João e Dona Marly pela acolhida e amizade ao longo desses “vários anos”.

A todos os professores que durante toda minha vida acadêmica contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Em especial ao professor Luis Fábio Silveira pela coorientação e envio de amostras cedidas pelos museus internacionais e pelo Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MUZUSP), do qual é curador.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Triagem de Animais Silvestres de Goiás, do Distrito Federal e da Amazônia (IBAMA) e a Polícia Federal por se prontificarem em avisar e fornecer acesso aos animais apreendidos ao longo desse estudo. Em especial ao Leo Caetano Fernandes da Silva (IBAMA-GO) por nos alertar sobre os problemas relacionados ao tráfico de aves, em especial o canário-da-terra, o que me levou a desenvolver este trabalho.

A Mark B. Robbins (Universidade do Kansas - NHMK), Jon Fjeldsa (Universidade de Copenhaga – ZMUC), Frederick H. Sheldon (Universidade de Louisiana – LSU-MZ), Alexandre Luis Padovan Aleixo (Museu Paraense Emílio Goeldi - MPEG), Hein Van Grouw (Museu Americano de História Natural – AMNH), Gustave Cabanne (Museu de Ciências Naturais Bernardino Rivadavia – MACN) pelo envio de parte das amostras utilizadas neste trabalho.

A Secretaria de Estado de Educação do Estado de Goiás pelo investimento na formação de um dos servidores de seu quadro. Aos meus colegas e amigos do Colégio Estadual Miriam Benchimol Ferreira e Colégio Municipal Professora Marília Carneiro Azevedo Dias pelo apoio incondicional à essa etapa profissional, sem a compreensão e companheirismo de vocês essa conquista também não seria possível. Em especial a Evania, minha compreensiva e incentivadora coordenadora.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília: Flávia, Iara, Niara, Priscila Vaz, Thaiz, Paty, Renatinha e Roger pela amizade, descontração e ajuda durante essa jornada. A Amanda e Cássia pela paciência e auxílio nas diversas atividades realizadas no laboratório e em campo. A Samira pela amizade e “pouso” cedidas durante esses dois anos.

A Nina, que se tornou amiga, companheira nas longas jornadas no laboratório, “nos bares da vida” e pelo qual quero que permaneça sempre em minha história.

Ao meu parceiro de estrada e motorista Diogo, sem sua amizade e incentivo, essa jornada teria sido mais árdua. Ganhei, além de um amigo, um irmão, muito obrigado mesmo, pela amizade, irmandade e divertimento.

Como esquecer também da irmãzinha caçula, de coração e incentivadora para a conclusão desse mestrado: Vivian Ribeiro, minha eterna gratidão pelo incentivo, amizade, broncas, conselhos, aulas e força para não desistir.

E não poderia deixar de agradecer a Gislaine por tudo, pelos vários fins de semana me fazendo companhia no laboratório, pela ajuda nos procedimentos laboratoriais, pelo “pouso” na “Pensão Pequi”, pela companhia nos “bares da vida” e pela amizade e companheirismo desde sempre. Sei que “meus” canários estarão em boas mãos.

Aos companheiros de atividades de campo Wallace, Lelei e Dario Henrique. A tia Lu e ao Dão pelo “pouso” e amor dedicados a nós goianos aí no Distrito Federal.

Aos tios Jorge e Ivani (Fazenda Samambaia, Aurilândia - GO) e tio Ronaldo (Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás - GO) por nos alertarem sobre a quantidade de canários em suas fazendas e por nos acolherem tão bem.

Não posso deixar de agradecer ao meu anjo da guarda, pois foram três anos, por praticamente todas as semanas, dirigindo pelo trecho Goiânia/Brasília. Metade desse tempo com o maninho motorista Diogo e a outra metade sozinha. Agradeço a ele também por ter voltado do Toca sem arranhões.

E por fim a minha “enorme” família Souza e Rezende, cunhado, cunhada, amigos, comadres, compadres e afilhados pela compreensão na ausência de “alguns vários” compromissos. Alguns membros da família merecem ser citados, pois sentiram na pele meus estresses, minhas alegrias, minhas ausências, meus maus súbitos, enfim, cuidaram e zelaram de mim: mamis Cléo, papis Sérgio, maninhos Sergim, Fê e Geo, comadre, mana e irmã Flávia, Amanda (minha afilhada tradutora oficial), Valentina (pelos filmes de animação que fui “obrigada” a arrumar tempo para assistir no cinema), Juliana, madrinha Clêusa, primos Vitim e Lila, amo vocês incondicionalmente, são meu suporte, meu porto seguro.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
Referencias Bibliográficas	11
CAPÍTULO I – Filogenia molecular reforça o polifiletismo do gênero <i>Sicalis</i> (Passeriformes, Aves) e revela polifiletismo em algumas linhagens infragenéricas	13
Resumo	14
Introdução	15
Materiais e Métodos	15
Amostragem	15
Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento	17
Análises Genéticas	18
Relógio Molecular	18
Resultados	19
Datação Molecular	22
Discussão	25
Diversificação e Eventos Históricos	26
Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO II – Padrão filogeográfico de <i>S. flaveola</i> evidencia discordâncias entre as subespécies descritas e as linhagens mitocondriais: impactos para a conservação	28
Resumo	29
Introdução	30
Materiais e Métodos	32
Amostragem	32
Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento	32
Alinhamento e Matriz de dados	34
Análises Genéticas	34
Resultados	35
Discussão	42
Biogeografia de <i>S. flaveola</i>	43
Contribuição para a conservação	44
Referências Bibliográficas	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
ANEXOS	47

RESUMO

Neste estudo, buscamos preencher lacunas de conhecimento que envolve as espécies de *Sicalis* em dois aspectos principais: (I) reconstruímos as relações filogenéticas de dez das doze espécies descritas para o gênero e (II) realizamos uma abordagem filogeográfica de *S. flaveola*, buscando identificar se as subespécies descritas correspondem a populações geneticamente diferenciadas, auxiliando assim na revisão taxonômica e na conservação desta espécie. A filogenia do gênero *Sicalis* foi realizada com um número mais abrangente de indivíduos e de locais de coleta por *taxa* do que estudo previamente publicado. Além disso, o processo temporal de diversificação das espécies deste gênero foi investigado por meio de datação molecular. No segundo capítulo, procurou-se identificar o padrão filogeográfico de *S. flaveola*, investigando a distribuição das linhagens genéticas das cinco subespécies descritas: *S. f. flaveola*, *S. f. valida*, *S. f. koenigi*, *S. f. brasiliensis* e *S. f. pelzelni*, além de identificar a presença de Unidades de Manejo (MUs) presentes nesta espécie. Ambos os estudos foram baseados na análise de dois marcadores moleculares: um mitocondrial (ND2; 1041 pb) e outro nuclear (FIB5; 569 pb). Conforme previamente observado, as reconstruções filogenéticas indicam que o gênero *Sicalis* é polifilético, uma vez que *S. citrina* agrupou em clado distinto das demais espécies do gênero. Além disso, com exceção de *S. citrina*, todas as espécies estudadas deste gênero também foram recuperadas como polifiléticas, possivelmente em decorrência de erros de identificação e eventuais eventos de hibridação. Com base na datação molecular, observa-se que o gênero *Sicalis* surgiu há aproximadamente 15 milhões de anos atrás, no Mioceno, enquanto que a maioria dos eventos de especiação dentro deste gênero ocorreram ainda no Plioceno. As análises filogeográficas indicam que as cinco subespécies de *S. flaveola* podem ser divididas em três haplogrupos: Grupo I: *S. f. brasiliensis* do norte e do sul; Grupo II: *S. f. pelzelni* do norte, *S. f. flaveola* e *S. f. valida* e Grupo III: *S. f. pelzelni* do sul e *S. f. koenigi*. *S. f. brasiliensis* parece ser o grupo mais antigo, do qual possivelmente partiram eventos de expansão em direções opostas (norte e sul) dando origem aos Grupos II e III, respectivamente. *S. f. brasiliensis* se mostrou um grupo monofilético, enquanto *S. f. pelzelni* se mostrou polifilético. *S. f. valida* e *S. f. flaveola* não são distinguíveis geneticamente. Desta forma, os dados obtidos ressaltam a necessidade de ampla revisão taxonômica das espécies deste gênero, inclusive ao nível de subespécies. E ainda, a ausência de concordância entre os dados genéticos e morfológicos sugere que medidas de manejo e conservação para *S. flaveola* devem ser adotadas com cautela, especialmente a soltura na natureza de animais apreendidos pelos órgãos de combate aos crimes contra a fauna.

Palavras-chave: Canário, DNA mitocondrial, DNA nuclear, conservação, tráfico de animais.

ABSTRACT

In this study, we sought to fill knowledge gaps surrounding the species of the genus *Sicalis* on two main aspects: (I) reconstructing the phylogenetic relationships of ten of the twelve species described for this genus and (II) realizing a phylogeographic analysis with *S. flaveola*, seeking to identify if the subspecies described correspond to genetically different populations, thereby assisting in the taxonomic revision and conservation of this species. The phylogeny of the genus *Sicalis* was performed with a larger number of individuals and more collection sites than study previously published. Furthermore, the temporal process of diversification of the species of this genus was investigated by molecular dating. In the second chapter, we seek to identify the phylogeographic pattern in *S. flaveola* investigating the distribution of genetic lineages of the five subspecies described: *S. f. flaveola*, *S. f. valida*, *S. f. koenigi*, *S. f. brasiliensis* and *S. f. pelzelni*, and identify management units (MUs) present in this species. Both studies were based on analysis of two molecular markers: a segment of mtDNA (ND2; 1041 bp) and a segment of nuclear genome (FIB5; 569 bp). As previously noted, the phylogenetic reconstructions indicate that *Sicalis* genus is polyphyletic, since *S. citrina* grouped in distinct clade from other species of the genus. Moreover, with the exception of *S. citrina*, all species of this genus were also recovered as polyphyletic, possibly due to misidentification or eventually hybridization events. Based on molecular dating, it is observed that the genus *Sicalis* had originated about 15 million years ago in the Miocene, while most speciation events within this genus yet occurred in Pliocene. The phylogeographical analyzes indicate that the five subspecies of *S. flaveola* can be divided into three haplogroups: Group I: *S. f. brasiliensis* from the north and south; Group II: *S. f. pelzelni* from the north, *S. f. flaveola* and *S. f. valida* and Group III: *S. f. pelzelni* from the south and *S. f. koenigi*). *S. f. brasiliensis* seems to be the oldest group, which possibly left expansion events in opposite directions (north and south) giving rise to Groups II and III, respectively. *S. f. brasiliensis* showed a monophyletic group, while *S. f. pelzelni* seems to be poliphyletic. *S. f. valida* and *S. f. flaveola* are not genetically distinguishable. Thus, our data highlight the need for comprehensive taxonomic revision of the species of this genus, including in subspecies levels. And yet, the absence of agreement between the genetic and morphological data suggests that management and conservation measures for *S. flaveola* should be taken with caution, especially the release back into the nature birds seized by the organization responsible to combat wildlife crimes.

Keywords: Saffron finch, Mitochondrial DNA , nuclear DNA , conservation, animal trafficking.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Sicalis* (Boie, 1828) é atualmente incluído na família Thraupidae, ordem Passeriformes (Clark, 1986; Clements et al., 2014; Renssen et al., 2014; Burns et al., 2014; CBRO, 2014). Estudos vêm mostrando que *Sicalis*, assim como alguns outros gêneros de Emberizidae neotropicais, como *Haplospiza*, *Diuca*, *Volatinia* e *Oryzoborus* (Clark, 1986), fazem parte do grupo dos “tanagers” (Bledsoe, 1988; Klicka et al., 2007; Campagna et al., 2011; Burns et al., 2014), que são um grupo monofilético segundo proposto por Barker et al. (2013). Contudo, não há consenso entre os sistematas quanto à posição taxonômica de *Sicalis*. Um dos fatores que gera essa falta de consenso é a grande disparidade morfológica, comportamental e ecológica entre os “tanagers”, e é essa disparidade que, ao mesmo tempo, os tornam um importante grupo para estudos filogenéticos (Burns et al., 2014). O gênero *Sicalis* já foi incluído na família Fringillidae (Sharpe, 1888; Sibley & Monroe, 1990), nas subfamílias Carduelinae (Hellmayr, 1938) e Emberizinae (Tordoff, 1954; Sick, 1997), na família Emberizidae (Ridgely & Tudor, 1989; Howard & Moore, 1994; Sick, 1997) e na família Thraupidae (Clark, 1986).

O número de espécies que compõe esse gênero também varia na literatura. Meyer de Schauensee (1970) considera 11 espécies, enquanto Howard e Moore (1994) e del Hoyo et al. (2014) consideram 12 espécies. Ridgely e Tudor (1989), Clements et al. (2014) e Renssen et al. (2014) consideram 13 espécies para o gênero. A divergência entre 12 e 13 espécies é devido ao fato de Renssen et al. (2014) considerarem *S. mendozae* como espécie válida, enquanto del Hoyo et al. (2014) consideram a espécie em questão como uma subespécie de *S. olivascens* (*S. o. mendozae*). Areta et al. (2012) com base em dados morfológicos, vocalização, ecologia e distribuição sugerem a elevação de *S. o. mendozae* a espécie plena. A Tabela 1 foi baseada em Clements et al. (2014) e Renssen et al. (2014) por esses autores serem mais abrangentes em suas descrições sobre as espécies e subespécies para o gênero *Sicalis*. A Figura 1 foi baseada em del Hoyo et al. (2014), pela presença de pranchas que contem ilustrações e descrições do gênero com mais detalhes.

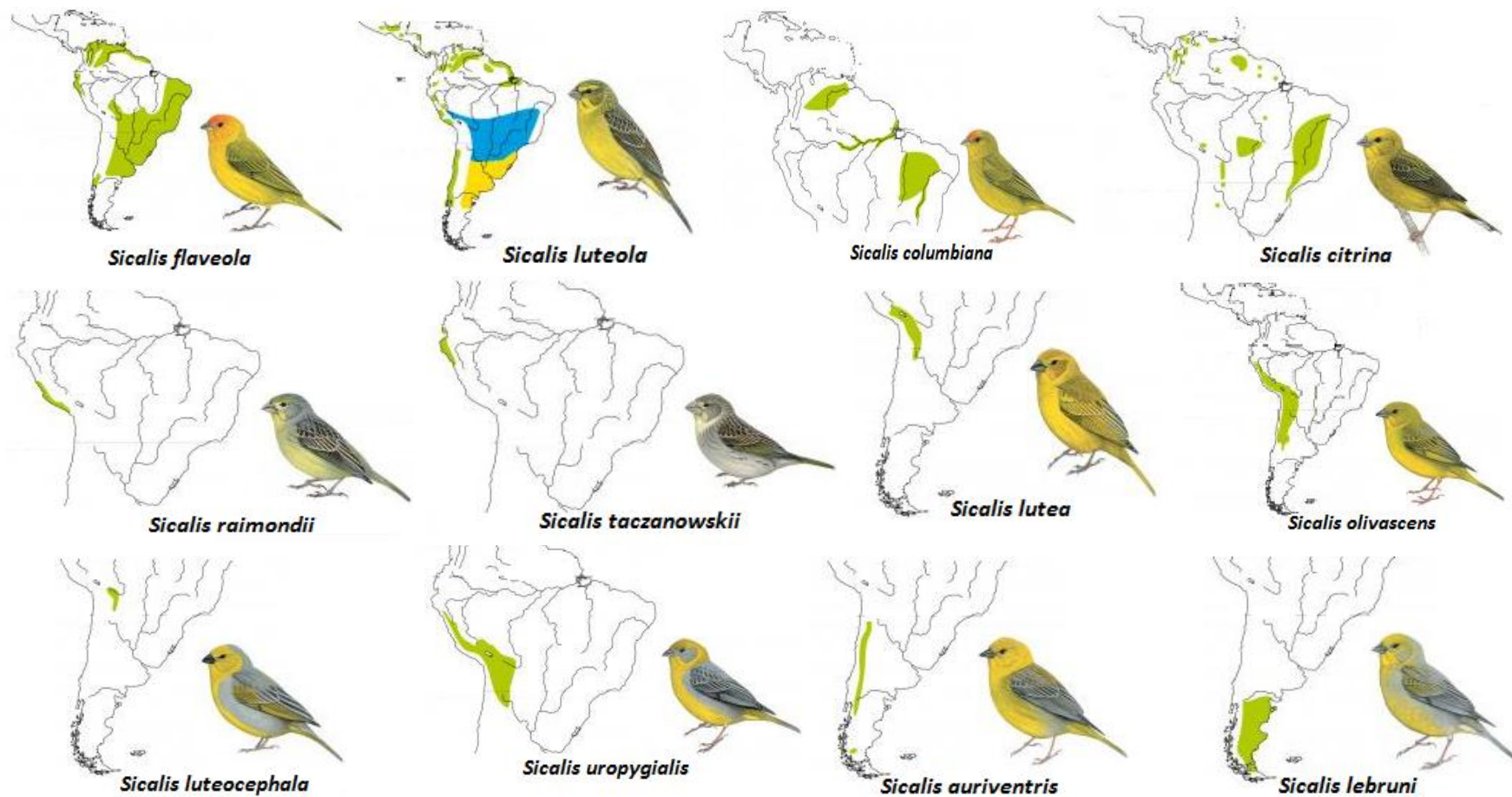


Figura 1. Espécies de *Sicalis* e suas respectivas distribuições geográficas. Fonte: *Handbook Birds of the World* (del Hoyo et al., 2014).
 Legenda de cores: verde = residente durante o ano todo; amarelo = visitante reprodutivo (Breeding visitor); azul = visitante sazonal – inverno (Winter visitor).

Tabela 1. Espécies e subespécies de *Sicalis* e suas respectivas distribuições geográficas segundo Clements et al. (2014) e Remsen et al. (2014).

Taxa	Distribuição
<i>Sicalis auriventris</i>	Norte e centro do Chile e adjacências da Argentina
<i>Sicalis citrina</i>	
<i>Sicalis citrina citrina</i>	Brasil: Pará, Goiás, Piauí, e Mato Grosso e Paraná
<i>Sicalis citrina browni</i>	Terras altas da Colômbia para a Venezuela, Guianas e nordeste do Brasil
<i>Sicalis citrina occidentalis</i>	Extremo sul do Peru (Puno) e norte da Argentina (Tucumán)
<i>Sicalis columbiana</i>	
<i>Sicalis columbiana columbiana</i>	Extremo leste da Colômbia para o leste Venezuela (bacia do Orinoco) e Trinidad
<i>Sicalis columbiana goeldii</i>	Brasil: Amazônia (oeste do Pará)
<i>Sicalis columbiana leopoldinae</i>	Brasil: Piauí para oeste da Bahia e Goiás
<i>Sicalis lebruni</i>	
<i>Sicalis lebruni</i>	Planícies do sul do Chile e da Argentina
<i>Sicalis flaveola</i>	
<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	Nordeste do Brasil (Maranhão, Minas Gerais e São Paulo)
<i>Sicalis flaveola flaveola</i>	Parte tropical da Colômbia para Venezuela e Guianas, Trinidad

<i>Sicalis flaveola koenigi</i>	Noroeste da Argentina
<i>Sicalis flaveola pelzelni</i>	Leste da Bolívia para o Paraguai, sudeste do Brasil, Uruguai e norte da Argentina
<i>Sicalis flaveola valida</i>	Planícies do Equador para noroeste do Peru (Ancash)
<i>Sicalis lutea</i>	Sul do Peru (Cuzco) para oeste da Bolívia e noroeste da Argentina
<i>Sicalis luteocephala</i>	Terras Altas do oeste da Bolívia noroeste da Argentina (Jujuy)
<i>Sicalis luteola</i>	
<i>Sicalis luteola bogoten</i>	Andes no leste da Colômbia para a Venezuela, Equador e sul Peru
<i>Sicalis luteola chrysops</i>	Sul do México (Veracruz e Chiapas) para Guatemala e nordeste de Honduras
<i>Sicalis luteola eisenmanni</i>	Noroeste da Costa Rica (Guanacaste) e Panamá (Coclé)
<i>Sicalis luteola flavíssima</i>	Ilhas na foz do rio Amazonas e adjacências do Pará
<i>Sicalis luteola luteiventris</i>	Terras altas do sul da América do Sul
<i>Sicalis luteola luteola</i>	Andes no oeste da Colômbia para Venezuela, Guianas e norte do Brasil
<i>Sicalis luteola mexicana</i>	Sul do México (Puebla e Morelos)

<i>Sicalis mendozae</i>	Oeste da Argentina (Rio Negro para Mendoza e San Luis)
<i>Sicalis olivascens</i>	
<i>Sicalis olivascens chloris</i>	Oeste do Peru (Ancash) para norte do Chile (Coquimbo)
<i>Sicalis olivascens olivascens</i>	Sudeste do Peru (Cuzco) para oeste da Bolívia noroeste da Argentina
<i>Sicalis olivascens salvini</i>	Norte do Peru (La Libertad para Huánuco, Junín e Ayacucho)
<i>Sicalis raimondii</i>	
<i>Sicalis uropygialis</i>	Oeste do Peru (Cajamarca para Arequipa e Moquegua)
<i>Sicalis uropygialis</i>	
<i>Sicalis uropygialis connectens</i>	Sul do Peru (acima do vale de Urubamba em Cuzco)
<i>Sicalis uropygialis sharpei</i>	Norte do Peru (Cajamarca para Junín)
<i>Sicalis uropygialis uropygialis</i>	Sul do Peru (Puno) para a Bolívia, norte do Chile e noroeste da Argentina
<i>Sicalis taczanowskii</i>	Litoral árido do sudoeste do Equador e noroeste do Peru

Os representantes deste gênero são conhecidos como canários e podem ser encontrados em quase toda América do Sul, sendo que apenas *S. luteola* pode ser encontrado na América central e *S. flaveola* foi introduzido no Havaí, Panamá, Porto Rico e Jamaica (Ridgely & Tudor, 1989). Apesar da maioria dos canários serem reconhecidos pela plumagem amarela, há grande variação de coloração entre os machos jovens e fêmeas adultas das diferentes espécies deste gênero (Ridgely & Tudor, 2009).

Dois trabalhos investigaram as relações filogenéticas do gênero *Sicalis*, um mais restrito que analisou apenas quatro espécies: *S. flaveola*, *S. luteola*, *S. luteocephala* e *S. olivascens* (Campagna et al., 2011) e outro mais abrangente (Burns et al., 2014) que engloba as doze espécies aceitas por del Hoyo et al. (2014), mais *S. luteiventris*, que hoje é considerada subespécie de *S. luteola*. Campagna et al. (2011) usaram *Sicalis* como grupo externo para tratar das relações filogenéticas do gênero *Phrygilus*. Burns et al. (2014) analisaram as relações filogenéticas entre os gêneros da família Thraupidae, incluindo o gênero *Sicalis*, usando dois genes mitocondriais para as doze espécies descritas para o gênero e quatro genes nucleares somente para duas espécies: *S. citrina* e *S. luteola*. Neste trabalho, o gênero *Sicalis* foi dado como polifilético, sendo que *S. citrina* aparece como espécie irmã de *Phrygilus gayi*, *Phrygilus patagonicus*, *Phrygilus punensis*, *Phrygilus atriceps*, *Nesospiza wiikinsi*, *Nesospiza acunhae*, *Rowettia goughensis*, *Melanodera xanthogramma* e *Melanodera melanodera*.

O termo filogeografia foi usado pela primeira vez, por Avise et al. (1987) para descrever os processos históricos que podem ser responsáveis pela distribuição geográfica contemporânea de linhagens mitocondriais. Portanto, a filogeografia é o campo da ciência que estuda os princípios e processos que comandam as distribuições geográficas das linhagens genealógicas (Avise, 2000). Segundo Moritz (1994; 2002), a filogeografia está associada diretamente a Biologia da conservação, pois populações de uma mesma espécie podem ser bastante diferentes, devendo assim ser mantidas como linhagens evolutivas independentes (Frankham et al., 2008). Avise et al. (1987) ainda identificaram cinco padrões filogeográficos: I - com tempo de separação longo, onde os clados foram separados por uma alta divergência genética; II- há um contato secundário entre as populações que estavam isoladas no passado, é possível encontrar linhagens divergentes ocupando a mesma área geográfica. III- com tempo de separação recente, onde os clados foram separados por uma baixa divergência genética; IV- quando não há barreiras para o fluxo gênico, possuindo um efeito homogeneizante que impede o surgimento de linhagens divergentes geograficamente estruturadas e V- em alguns casos

do padrão IV, existem linhagens que possuem ocorrência restrita e conseqüentemente de baixo fluxo gênico contemporâneo entre populações historicamente ligadas.

Estudos filogeográficos apresentam grande potencial para elucidar padrões de fluxo gênico, hibridação, especiação e expansão demográfica em diversas populações (Newton, 2003). E ainda, estes estudos podem proporcionar informações relevantes para melhor compreensão dos eventos históricos e recentes que contribuíram para a distribuição geográfica das variações fenotípicas e genéticas em diversas espécies de aves (Avisé, 2000; Newton, 2003), e para a conservação da avifauna.

Nas últimas décadas, a identificação de diferenciação genética entre populações tem sido indispensável para a elaboração de propostas de conservação. Em meados da década de 1980, foi proposto o conceito de Unidade Evolutivamente Significativa (*Evolutionary Significant Unit* – ESU; Ryder, 1986), definido como populações ou grupos de indivíduos isolados por um período de tempo suficiente para que estes apresentem alta diversidade genética entre si. Outra definição seria dada por populações nas quais as linhagens do DNA mitocondrial (DNAMt) são reciprocamente monofiléticas, ou seja, todas as linhagens dentro de uma subpopulação compartilham um ancestral comum mais recente do que o compartilhado por linhagens de grupos distintos (Moritz, 1994).

A diferenciação genética entre populações também serviu de base na proposta de um conceito menos específico que o de ESU. Moritz (1994) propôs o conceito de Unidade de Manejo (*Management Unit* - MU) baseado nas diferenças das frequências alélicas entre subpopulações. Para Moritz (2002), duas estratégias seriam úteis para a elaboração de áreas de preservação de espécies: (1) identificar as áreas que são importantes para representar espécies e diversidade genética e (2) maximizar dentro destas áreas a proteção dos gradientes ambientais através da qual a seleção e migração podem interagir mantendo a viabilidade populacional e diversidade genética.

Para os canários-da-terra (*S. flaveola*), atualmente são reconhecidas cinco subespécies (del Hoyo et al., 2014):

- *S. f. brasiliensis* (Gmelin, 1789), que ocorre nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (Silveira & Méndez, 1999);
- *S. f. pelzelni* Sclater, 1876, que ocorre nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além da região

nordeste e central da Argentina, Paraguai, Uruguai e leste da Bolívia (Hellmayr, 1938; Paynter, 1970; Ridgely & Tudor, 1989; Sibley & Monroe, 1990; Sick, 1997; Silveira & Méndez, 1999; Sigrist, 2006);

- *S. f. flaveola* (Linnaeus, 1766), que ocorre originalmente na Venezuela, Colômbia e região costeira de Guiana, Suriname e Guiana Francesa (del Hoyo et al., 2014);
- *S. f. valida* Bangs & Penard, 1921, que ocorre apenas a oeste dos Andes, no sudoeste do Equador e noroeste do Peru (del Hoyo et al., 2014) e
- *S. f. koenigi* Hoy, 1978, encontrado no noroeste da Argentina na região de Salta e Jujuy (del Hoyo et al., 2014).

Do ponto de vista morfológico, as subespécies de *S. flaveola* são muito semelhantes entre si. Na forma nominal e em *S. f. valida*, os machos e as fêmeas apresentam grande similaridade morfológica, enquanto que nas outras três subespécies é possível observar dimorfismo sexual. Em geral, os machos adultos apresentam o ventre amarelo e a asa, cauda e dorso amarelo esverdeado, enquanto que as fêmeas adultas são semelhantes aos machos, sendo que nas formas com dimorfismo, o dorso é mais escuro e estriado. Ainda, destaca-se nos machos a fronte alaranjada que pode ser restrita ao limite frontal (*S. f. pelzeni*) ou ultrapassando a região da órbita (*S. f. brasiliensis*). Os imaturos, em geral, apresentam a plumagem semelhante à das fêmeas adultas, adquirindo somente a plumagem típica, no caso dos machos, após a muda (Ridgely & Tudor, 1989; Sick, 1997; Silveira & Méndez, 1999, Restal et al., 2006; del Hoyo et al., 2014).

Centenas a milhares de canários são apreendidos pelos órgãos ambientais no Brasil todos os anos. A busca por canários-da-terra como aves domésticas e para realização de rinhas, dado o agressivo comportamento territorial dos machos durante o período reprodutivo, é umas das principais causas relacionadas ao declínio populacional de *S. flaveola* (Sick, 1997). Apesar do intenso tráfico, as populações de *S. flaveola* são incluídas em categorias de baixo risco de ameaça de extinção (*Least Concern* - LC) pela IUCN (2011) e não aparecem na lista nacional de espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção (MMA, 2008).

Além do impacto direto sob as populações naturais das quais as aves são subtraídas, existe um segundo problema relacionado ao tráfico de animais que é a soltura indiscriminada na natureza. Nas práticas de soltura de canários-da-terra, uma das orientações frequentemente ignorada é aquela referente ao reconhecimento de possíveis populações diferenciadas dentro da distribuição de *S. flaveola*, já que existem poucos

estudos consistentes sobre a validade do *status* taxonômico atribuído as diferentes formas desta espécie.

Neste estudo, buscamos preencher lacunas de conhecimento que envolve as espécies de *Sicalis* em dois aspectos principais: (I) abordaremos as relações filogenéticas de dez das doze espécies descritas para o gênero e (II) realizamos uma abordagem filogeográfica de *S. flaveola*, buscando identificar se as subespécies descritas correspondem a populações geneticamente diferenciadas, auxiliando assim na revisão taxonômica e na conservação desta espécie. Ainda em relação ao item I, buscando ampliar o estudo filogenético de Burns et al. (2014) aumentando o número de espécimes e a área geográfica amostrada por cada *taxa*. O uso de poucos indivíduos por espécie pode negligenciar variações intraespecíficas, um exemplo disso se deu em nosso estudo com a espécie *S. uropygialis*, que carece de uma revisão taxonômica mais detalhada. Além disso, foi realizada a datação molecular dos eventos de diversificação do gênero, buscando com isso compreender quais eventos históricos podem ter influenciado os processos de diversificação neste gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARETA, J.I., PEARMAN, M. & ÁBALOS, R., 2012. Taxonomy and Biogeography of the Monte Yellow-Finch (*Sicalis Mendozae*): Understanding the Endemic Avifauna of Argentina's Monte Desert. *Condor* 114: 654-671.
- AVISE, J.C., 2000. *Phylogeography*. Harvard University Press, London.
- AVISE, J. C., 1987. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ecol. And Systematics*. 18: 489-522.
- BARKER, F.K., BURNS, K.J., KLICKA, J., LANYON, S.M. & LOVETTE, I.J., 2013. Going to Extreme: Contrasting Rates of Diversification in a Recent Radiation of New World Oasserines Birds. *Syst. Biol.* 62 (2): 298-320.
- BLEDSON, A.H., 1988. Nuclear DNA evolution and phylogeny of the new world nine-primaried oscines. *Auk* 105: 504-515.
- 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. *Mol. Phylogenetics Evol.* 75: 41-72.
- CAMPAGNA, L., GEALE, K., HANDFORD, P., LIJMAER, D.A., TUBARO, P.L. & LOUGHEED, S.C., 2011. A molecular phylogeny of the Sierra-Finches (*Phrygilus*, Passeriformes): Extreme polyphyly in a group of Andean specialists. *Mol. Phylogenetics Evol.* 61: 521-533.
- CLARK, G. A., Jr. 1986. Systematic interpretations of foot-scut patterns in Neotropical finches. *Wilson Bull.* 98 (4): 594-597.
- CLEMENTS, J.F., SCHULENBERG, T.S., ILIFF, M.J., ROBERSON, D., FREDERICKS, T.A., SULLIVAN, B.L. & WOOD, C.L., 2014. The eBirds/Clements checklist of birds of the world: Version 6.9. Downloaded from <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/> (Aces so em 09.02.2014).
- COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. 2014. Listas das aves do Brasil. 11ª Edição 1/1/2014. www.cbro.org.br/CBRO/pdf/AvesBrasil2014.pdf. (acesso em 29.11.2014).
- DEL HOYO, J., ELLIOTT, A. & CHRISTIE, D. A., 2014. *Handbook of the Birds of the World - Volume 16*. Linx Edicions.
- FRANHAM, R., 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17 (1): 325-333.

- HELLMAYR, C. E., 1938. Catalogue of the birds of the Americas and adjacent islands. Field Mus. Nat. Hist., Zool. Ser. Volume 13 (11): 320-327.
- HOWARD, R. & MOORE, A., 1994. A complete checklist of the birds of the world. 2ª Edição. London. Academic Press. 630 p.
- IUCN, 2014. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Versão 2.014,3. www.iucnredlist.org. (acessado em 30.11.2014).
- KLICKA, J., BURNS, K.J. & SPELLMAN, G.M., 2007. Defining a monophyletic Cardinalini: A molecular perspective. *Mol. Phylogenetics Evol.* 45: 1014-1032.
- MEYER DE SCHAUENSEE, R., 1970. A guide to the birds of South America. Philadelphia: Acad. Nat. Sci. Philadelphia.
- MMA, 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Editores Angelo Barbosa Monteiro Machado, Glaucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia. 1ª edição. Fundação Biodiversitas. Belo Horizonte.
- MORITZ, C., 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3: 401-411.
- MORITZ, C., 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst. Biol.* 51 (2): 238-254.
- NEWTON, I., 2003. The Speciation and Biogeography of Birds. Academic Press, San Diego.
- PAYNTER, R. A., Jr. 1970. Subfamily Emberizinae, Buntings and American Sparrows. In Paynter, R. A., Jr. & Storer, R. W. (eds). Check-List of Birds of the world. Volume 13. Cambridge and Massachusetts; Museum of Comparative Zool. 312 p.
- REMSEN Jr, J.V., CADENA, C.D., JARAMILLO, A., NORES, M., PACHECO, J.F., PÉREZ-EMÁN, J., ROBBINS, M.B., STILES, F.G. & ZIMMER, K.J., 2014a. A Classification of the Bird Species of South America. American Ornithologists Union. www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html (acessado em 29.11.2014).
- RESTALL, R., RODNER, C. & LENTINO, M., 2006. Birds of northern South America: an identification guide. Volume 1, 690 p.
- RIDGELY, R. S. & TUDOR, G. 1989. The birds of South America: The Oscine passerines. Austin: University of Texas press. volume 1516 p.
- RIDGELY, R. S. & TUDOR, G. 2009. The birds of South America: The Oscine passerines. Austin: University of Texas press, volume 1.
- RYDER, O. A., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1: 9-10.
- SHARPE, R.B., 1888. Catalogue of the birds in the British Museum. London; Taylor and Francis. Volume 12: 871.
- SIBLEY, C. G & B. L. MONROE Jr., 1990. Distribution and taxonomy of the birds of the world. New Haven, Yale University Press, 1111 p.
- SICK, H., 1997. Ornitologia Brasileira, uma Introdução. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- SIGRIST, T. 2006. Aves do Brasil: uma visão artística. Editora Fosfetil, 672 p.
- SILVEIRA, L. F., & MÉNDEZ, A. C., 1999. Caracterização das formas brasileiras do gênero *Sicalis* (passeriformes, emberizidae). *Atualidades Ornitológicas*, 90: 6-8.
- TORDOFF, H. B. 1954. A systematic study of the avian family Fringillidae based on the structure of the skull. *Misc. Publ. Museum of Zoology, Univ. Michigan*, 81.

CAPÍTULO I

FILOGENIA MOLECULAR REFORÇA O POLIFILETISMO DO GÊNERO *SICALIS* (PASSERIFORMES, AVES) E REVELA POLIFILETISMOS EM ALGUMAS LINHAGENS INFRAGENÉRICAS

RESUMO

Estudos recentes vêm mostrando que o gênero *Sicalis* faz parte do grupo dos “tanagers”, um grupo monofilético. No entanto, não há consenso entre os sistematas quanto à posição taxonômica desse gênero. Um dos fatores que gera essa falta de consenso é a grande disparidade morfológica, comportamental e ecológica entre os “tanagers”, e é essa disparidade que, ao mesmo tempo, os tornam um importante grupo para estudos filogenéticos. Neste capítulo, a filogenia do gênero *Sicalis* foi realizada com um número mais abrangente de indivíduos e de locais de coleta por *taxa* do que estudo prévio. As reconstruções filogenéticas foram baseadas em dois marcadores moleculares: um mitocondrial (cerca de 1041 pb ND2) e outro nuclear (cerca de 569 pb do FIB5), obtidos de dez espécies do gênero: *S. citrina*, *S. columbiana*, *S. flaveola*, *S. lebruni*, *S. lutea*, *S. luteocephala*, *S. luteola*, *S. olivascens*, *S. taczanowskii* e *S. uropygialis*. Para investigar os possíveis processos responsáveis pela diversificação neste gênero foi realizada também a datação molecular. As reconstruções filogenéticas indicam que: 1) *Sicalis* é um gênero polifilético; 2) o gênero pode ser dividido em dois clados principais, um com *S. citrina* e outras tanagers e outro com as demais espécies de *Sicalis* estudadas; 3) *S. citrina* parece ser a espécie mais basal e monofilética; 4) *S. lutea*, *S. olivascens* e *S. uropygialis* carecem de estudos complementares; 5) *S. flaveola* parece ser uma linhagem monofilética. O tempo de divergência entre as espécies foi estimado assumindo o relógio molecular e as datas sugerem que *Sicalis* tenha divergido há aproximadamente 15 milhões de anos atrás no Mioceno.

INTRODUÇÃO

Os canários, gênero *Sicalis* (Boie, 1828), são atualmente incluídos dentro da família Thraupidae, ordem Passeriformes (Clark, 1986; Clements et al., 2014; Remsen et al., 2014; Burns et al., 2014; CBRO, 2014). Contudo, o gênero já foi incluído na família Fringillidae (Sharpe, 1888; Sibley & Monroe, 1990) e Emberizidae (Ridgely & Tudor, 1989; Howard & Moore, 1994; Sick, 1997; del Hoyo et al., 2014). Encontra-se também uma variação quanto ao número de espécies que compõe o gênero.

Ridgely e Tudor (1989) dividiram o gênero em dois grupos: (I) encontrado na parte árida do oceano Pacífico e/ou terras baixas da América do Sul, composto pelas espécies *S. citrina*, *S. raimondii*, *S. columbiana*, *S. flaveola*, *S. luteola* e *S. taczanowskii*; e (II), nos Andes ou Patagônia, representado pelas espécies *S. lutea*, *S. uropygialis*, *S. luteocephala*, *S. auriventris*, *S. olivascens* e *S. lebruni*.

Burns et al. (2014) investigaram as relações filogenéticas do gênero *Sicalis*, englobando as doze espécies aceitas por del Hoyo et al. (2014) com dois seguimentos mitocondriais (cit b e ND2) e quatro seguimentos nucleares (RAG1 e os íntrons ACO1-19, MB-12 e o íntron 5 do β -fibrinogênio). Neste trabalho, o gênero *Sicalis* foi dado como polifilético.

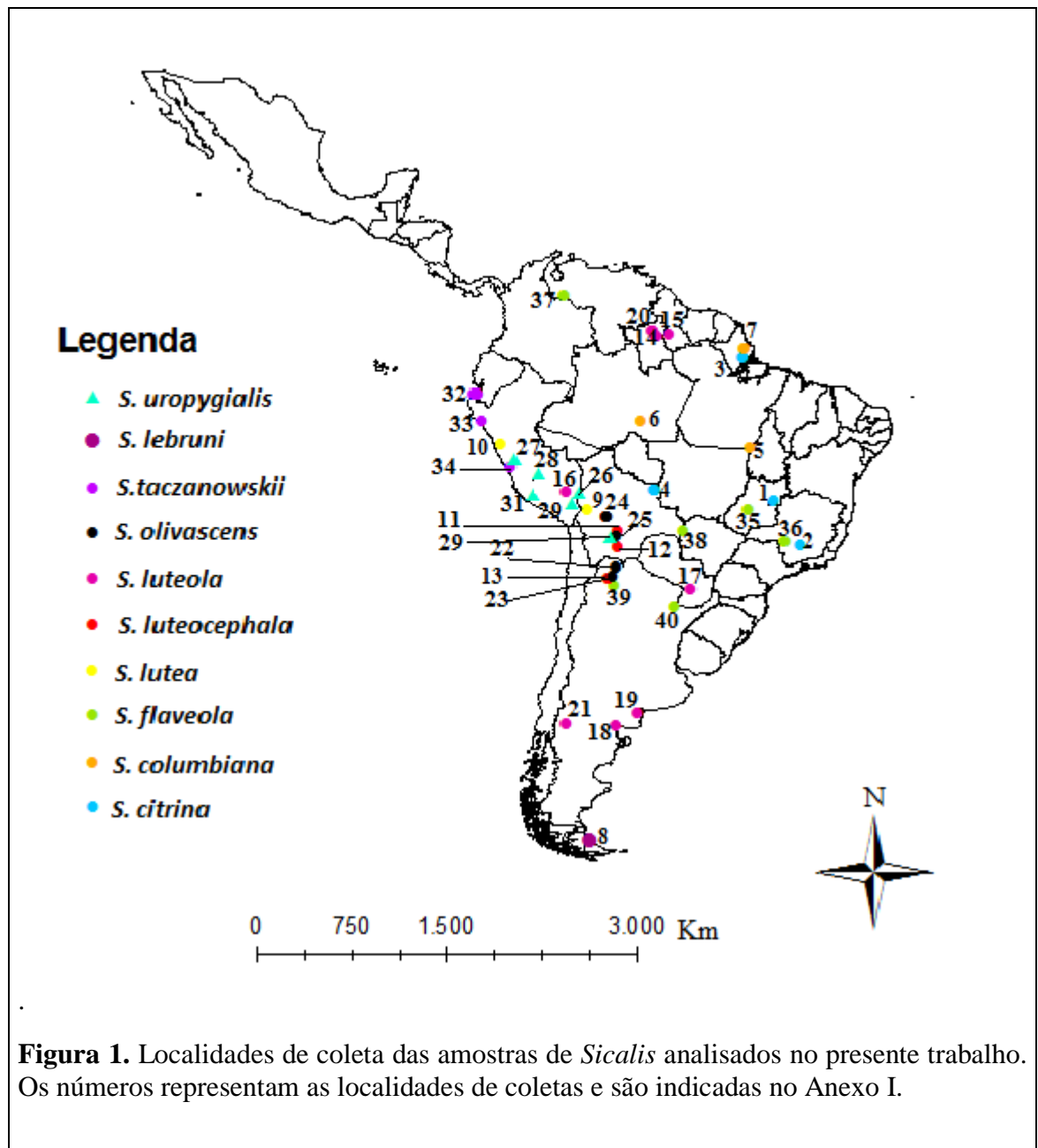
Visando melhor compreender as relações filogenéticas entre as espécies deste gênero, nós analisamos um número maior de indivíduos e de localidades do que Burns et al. (2014) com os seguintes objetivos: (I) propor uma hipótese filogenética para o gênero *Sicalis* e compará-la com as previamente descritas; (II) identificar se as espécies descritas constituem linhagens monofiléticas; (III) estimar datas de divergência para as espécies/linhagens deste gênero e (IV) propor hipóteses para a diversificação das espécies do gênero *Sicalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

Para este estudo, levou-se em consideração a classificação das espécies segundo del Hoyo et al. (2014), que adota 12 espécies e 32 subespécies para o gênero *Sicalis*. Foram analisadas amostras de tecidos (sangue, fígado ou músculo) de 10 das 12 espécies descritas para o gênero *Sicalis* (del Hoyo et al., 2014): *S. citrina*, *S. lutea*, *S. uropygialis*, *S. luteocephala*, *S. olivascens*, *S. lebruni*, *S. columbiana*, *S. flaveola*, *S. luteola* e *S. taczanowskii*. As amostras para análise foram cedidas por museus nacionais

e internacionais, além das depositadas no banco de tecidos do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília (LabGenBio) (Anexo I). Para as análises filogenéticas foram adicionadas sequências homólogas depositadas no GenBank de espécies proximoamente relacionadas ao gênero (Anexo I) segundo filogenia proposta por Burns et al. (2014) como grupos externos



EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

O DNA total foi extraído individualmente de amostras de sangue ou músculo/fígado. Para as amostras de sangue, a extração foi feita em solução contendo 0,1% de SDS, Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM e 10 mg/ml de proteinase K, sendo mantidas durante uma noite a 37°C. O DNA foi purificado por procedimento padrão com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Bruford et al., 1992). Amostras de DNA total cedidas por museus foram extraída individualmente utilizando o *kit* comercial QIAamp DNA (Qiagen), segundo recomendações do fabricante.

Os marcadores genéticos analisados foram o gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) do DNA mitocondrial e o íntron 5 do gene α -fibrinogênio do genoma nuclear (FIB5). Para amplificação e sequenciamento do segmento mitocondrial foram utilizados os iniciadores LMET e H6313 e dois iniciadores internos, o L5758 e H5766 (Sorenson et al., 1999). Para o segmento do genoma nuclear foram utilizados os iniciadores FIB5 e FIB6 (Bowie & Fjeldsa, 2005). Para algumas amostras, só foi possível o sequenciamento de apenas um dos dois *loci* selecionados conforme especificado no Anexo I. No Anexo III estão especificados os primers utilizados.

Para a amplificação das amostras de sangue e tecido cedidos por museus foram usadas um volume total de 10 μ L, contendo 3.9 μ L de água milli-Q, 1 μ L de dNTPs, 1 μ L de tampão, 0.5 μ L de MgCl₂, 0.1 μ L de Taq polimerase, 1 μ L de primer (F) a 10 μ M, 1 μ L de primer (R) a 10 μ M e 1.5 μ L de DNA. As reações foram desnaturadas a 95°C por 7 minutos, 35 ciclos compostos por 1 minuto a 95°C para desnaturação, 40 segundos a 52°C (sangue) ou 54°C (amostras dos museus) para hibridação e 1 minuto a 72°C para extensão. Seguindo extensão de 10 minutos a 72°C. Foi usada Taq polimerase PLATINUM (0.4 μ L de MgCl₂ e 0.1 μ L de Taq polimerase PLATINUM) para amostras que não estavam amplificando, seguindo as mesmas especificações acima.

Os produtos de PCR foram purificados por reação enzimática com a exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão (ExoI/SAP, USB), segundo recomendações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Life Technologies), segundo recomendações do fabricante. Os produtos do sequenciamento foram analisados em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas e corrigidas com o auxílio do programa GENEIOUS (versão 6.0.6, Drummond et al., 2011).

ANÁLISES GENÉTICAS

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo ClustalW, implementado no programa BioEdit (versão 7.2.1, Hall, 1999). As sequências foram organizadas em três matrizes de dados para as análises: uma matriz para o gene mitocondrial (matriz mt), uma matriz para o gene nuclear (matriz nu) e uma terceira matriz, para os dados concatenados (matriz mt + nu). Foram obtidas matrizes de distâncias par a par para as matrizes mt e nu, dadas com o programa MEGA (versão 6.0, Tamura et al., 2013) e os gráficos de saturação foram feitos no Excel.

O modelo de evolução molecular para os dois genes foi selecionado no programa JModeltest (versão 2.1.4, Darriba et al., 2012) utilizando o Critério de Informação de Akaike (Akaike, 1974). Para concatenar os genes, foi utilizado o programa DAMBE (versão 5.5.0, Xia, 2013). As análises filogenéticas das matrizes de sequências foram realizadas empregando métodos de Máxima Verossimilhança (ML) com o programa MEGA (versão 6.0, Tamura et al., 2013) e por Inferência Bayesiana (IB) com o programa MrBayes (versão 3.2.0, Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Para análise de ML foi realizada busca heurística tendo como base uma árvore obtida pelo método de *neighbour-joining*, usando a abordagem *Maximum Composite Likelihood* (MCL) (Tamura et al., 2013). O suporte estatístico dos ramos da filogenia de ML foi obtido com 1000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Na análise de IB foi utilizado 2.000.000 de gerações, com *burn-in* estimado e eliminado por meio de análise no programa TRACER (versão 1.5; Rambaut et al., 2014).

RELÓGIO MOLECULAR

A hipótese do relógio molecular foi testada seguindo a opção *Test Molecular Clock* (ML) com o programa MEGA (versão 6.0, Tamura et al., 2013). Esta opção realiza um teste de máxima verossimilhança da hipótese do relógio molecular para uma determinada topologia da árvore e alinhamento de sequências. Dois valores de $- \ln L$ são calculados e exibidos, uma com e outra sem a hipótese de relógio. A hipótese do relógio molecular pode então ser ou não ser rejeitada. Neste estudo a hipótese do relógio molecular foi rejeitada e para analisar o tempo de divergência entre as linhagens, foi utilizado o programa BEAST (versão 1.8.1, Drummond et al., 2002) que permite a aplicação do método do relógio relaxado.

Os modelos de evolução utilizados para cada partição são os mesmo da Tabela 2. O modelo de especiação escolhido foi o *Yule* para formar a árvore e usou-se o critério

Relaxed clock: uncorrelated lognormal, assumindo taxas de divergências diferentes para os dois genes. Usamos um total de 150 milhões de gerações. Os valores de tamanho amostral efetivo (ESS) foi calculado pelo programa TRACER (versão 1.5; Rambaut et al., 2014), considerando todos os parâmetros e aceitando seu valor significativo quando igual ou maior do que 200.

A taxa média de substituição nucleotídica de 2,1% por milhão de ano (0.0105 substituições por sítios e por linhagens por milhões de anos; Weir & Schluter, 2008) foi usada para o gene mitocondrial. Para o gene nuclear, como não existem estimativas de taxas de divergência na literatura, essa foi estimada pelo programa BEAST (versão 1.8.1, Drummond et al., 2002).

RESULTADOS

Cerca de 1041 pb do ND2 e cerca de 569 pb do FIB foram sequenciados para a maioria dos indivíduos analisados. Apenas para *S. lebruni*, o seguimento do DNA mitocondrial não foi sequenciado por completo e não houve sucesso na amplificação do FIB5. Não foi identificada saturação de bases neste conjunto de dados (Figura 2) e as sequências mitocondriais foram analisadas considerando todas as posições dos códons. As distâncias genéticas estimadas para o seguimento mitocondrial foram corrigidas segundo o modelo de evolução TrN+G+I, enquanto para o segmento nuclear foi empregado o modelo TIM+G.

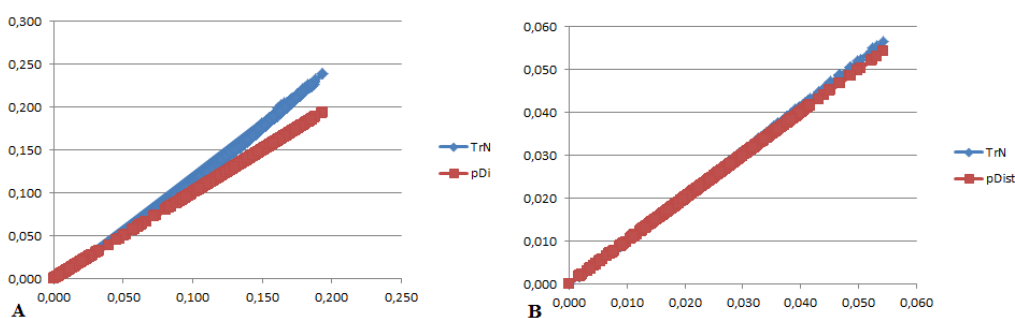


Figura 2. Gráfico de saturação de bases do segmento mitocondrial (A) e nuclear (B), considerando todas as posições do códon para o gene mitocondrial. TrN = valores de distância segundo modelo de Tamura-Nei; pDist = valores de p-distance.

Dados sobre a composição nucleotídica, total de sítios, sítios conservados, sítios variáveis, sítios informativos para parcimônia, modelo evolutivo selecionado para o gene mitocondrial (DNAm_t) e para o gene nuclear (DNAnu) são apresentados na Tabela 1. No caso do segmento nuclear, o modelo selecionado foi TIM e como o programa MEGA (versão 6.0, Tamura et al., 2013) não possui esse modelo implementado, substituímos o modelo pelo GTR, que é um modelo mais geral.

Tabela 1. Informações sobre a composição nucleotídica, sítios, e modelos evolutivos selecionados para cada segmento usado nas reconstruções das relações filogenéticas para o gênero *Sicalis*.

	ND2	FIB5
Composição nucleotídica em (% de A/C/G/T)	30,21/37,65/9,66/22,48	30,71/17,66/19,59/32,04
Número de sítios analisados	1041	569
Número de sítios conservados	540	450
Número de sítios variáveis	501	119
Número de sítios informativos para parcimônia	443	68
Modelo Evolutivo	TrN+I+G	GTR+G

As filogenias obtidas com os diferentes métodos apresentaram resultados ligeiramente discordantes para os genes em separado (Anexos IV a VII) e para os dois segmentos concatenados (Figura 2, Anexo VIII), diferindo no suporte estatístico e na posição de alguns terminais. Nas reconstruções filogenéticas baseadas na ML para a matriz do gene mitocondrial, *S. citrina* e *S. taczanowskii* são polifilético, já na matriz nuclear somente *S. citrina* apresenta politomia. Na ML para a matriz do gene mitocondrial, *S. uropygialis*, *S. olivascens* e *S. lutea* são grupos irmãos, o que não ocorre com a ML para a matriz do gene nuclear onde *S. uropygialis* forma um clado separado e *S. olivascens* e *S. lutea* formam um clado juntamente com *S. luteocephala*. Para as demais espécies (*S. flaveola*, *S. luteola*, *S. columbiana*, *S. lebruni*, *S. luteocephala*) a ML com a matriz mitocondrial apresentou clados independentes, mas com uma ou outra espécie caindo em seus ramos.

Nas duas matrizes de dados, *S. citrina* se mostra mais próximo das espécies do grupo externo e diferem no fato de que *S. flaveola*, mais um grupo de *S. uropygialis* e *S. olivascens* caem em um ramo separado do restante das espécies do seu gênero, na matriz de genes mitocondrial e na matriz de genes nuclear, *S. columbiana* cai separado das outras espécies congêneras. Fato que não se confirma na matriz de genes concatenados, onde somente *S. citrina* está em um ramo diferente do restante das espécies de *Sicalis*.

Nas reconstruções filogenéticas baseadas na IB para as matrizes dos genes parcionados, o gênero se mostra polifilético. Na matriz do gene mitocondrial *S. citrina*, *S. flaveola* e alguns indivíduos de *S. uropygialis* caem em ramos separados das demais espécies do gênero, enquanto que na matriz nuclear são as espécies *S. citrina* e *S. columbiana* que são polifiléticos. A filogenia obtida com base na IB da matriz com os genes concatenados (Figura 3) foi usada como referência nas discussões dos resultados. Esta opção foi feita buscando utilizar todos os dados disponíveis, mesmo não havendo consenso entre eles. Nas análises das árvores, *Sicalis* mostra-se polifilético, como descrito previamente por Burns et al. (2014).

Sicalis uropygialis é a espécie com maior complexidade em se tratando das relações filogenéticas dos exemplares analisados. A maioria dos indivíduos aparece na forma de politomia no ramo mais basal dos demais *Sicalis*. E ainda, alguns indivíduos (*uropygialis14* e *uropygialis12*; Figura 4) aparecem no mesmo clado que *S. olivascens*. Um *S. taczanowskii* (*taczanowskii5*) também está no clado de *S. uropygialis*. Os dois representantes da espécie *S. lutea* não estão em um clado bem definido e sim no clado junto com *S. uropygialis* (*lutea1*) e o outro (*lutea2*) com *S. olivascens*.

O clado que envolve a espécie *S. taczanowskii* está bem delimitado e com suporte estatístico alto ($P > 95\%$). Já nos clados de *S. columbiana* e *S. luteocephala*, mesmo com alto suporte estatístico ($P > 95\%$), indivíduos de outras espécies caíram nesses clados. Em *S. columbiana* o único representante de *S. lebruni* e dois *S. luteola* estão presentes no clado ($P > 95\%$), já no caso de *S. lebruni*, na filogenia com o gene mitocondrial é um clado irmão de *S. luteocephala* e com alto suporte estatístico ($P > 95\%$).

DATAÇÃO MOLECULAR

As datas de divergência para as diferentes linhagens de *Sicalis* indicam que o gênero teve sua diversificação aproximadamente há 15 milhões de anos atrás (Mya), no Mioceno inferior (Figura 4). Dentro do gênero houve uma diversificação a aproximadamente 12 Mya, dando origem às linhagens ancestrais de *S. citrina* como grupo irmão dos gêneros *Phrygilus*, *Melanodera*, *Rowettia* e *Nesospiza*, e das demais espécies de *Sicalis*. A maior parte da diversificação das demais espécies de *Sicalis* (com exceção de *S. citrina*) ocorreu aproximadamente entre oito e dois Mya, no final do Mioceno e ao longo do Plioceno.

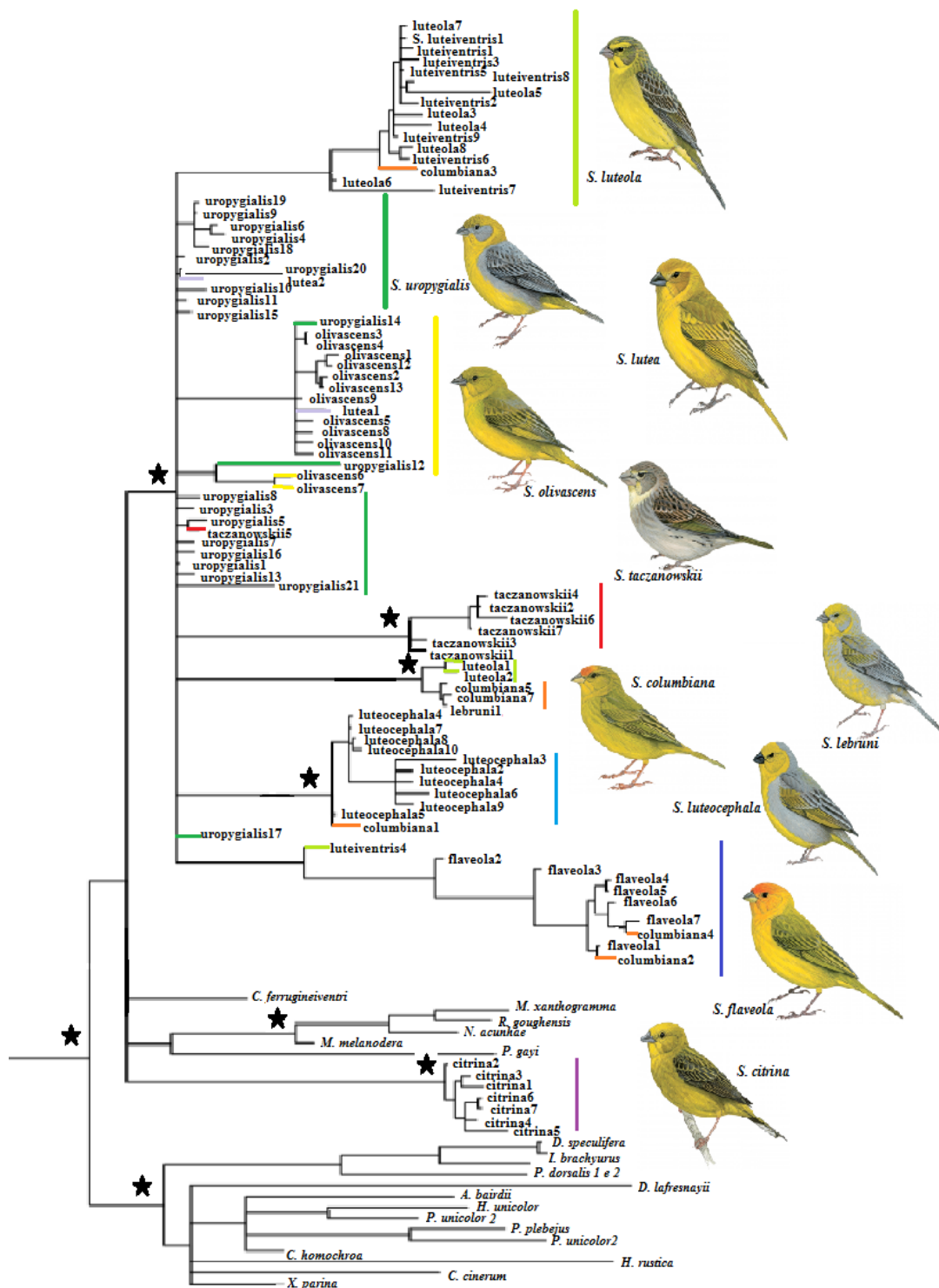


Figura 3. Reconstrução filogenética para as diferentes espécies do gênero *Sicalis* obtida por Inferência Bayesiana para o ND2 e o FIB5 concatenados. Os valores de probabilidade posterior superiores a 0,95 são indicados no cladograma por uma estrela. As ilustrações foram obtidas do *Handbook Birds of the World* (del Hoyo et al., 2014).

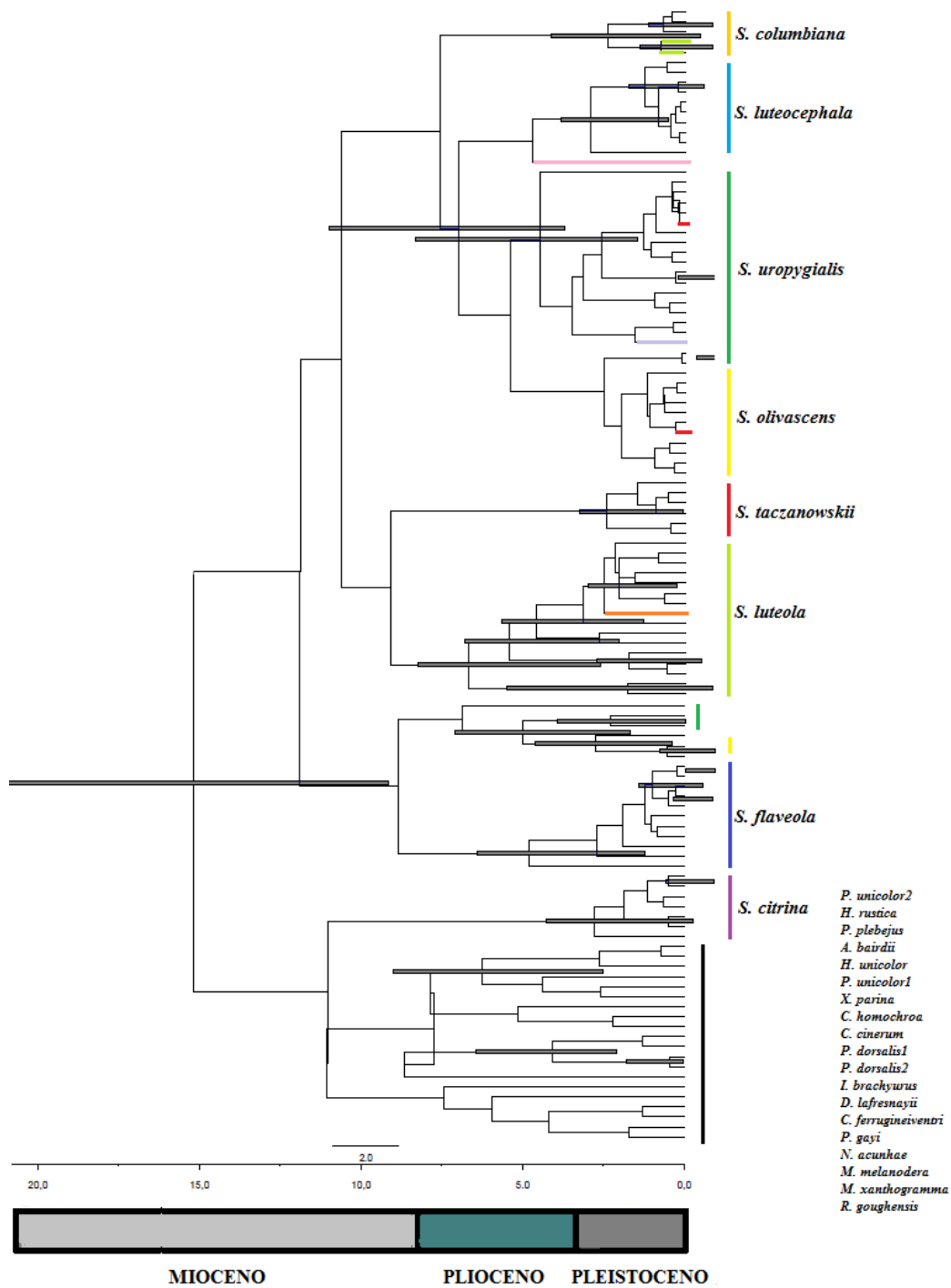


Figura 4. Estimativas dos tempos de divergência dos clados identificados para o gênero *Sicalis* com base no gene mitocondrial ND2 e no segmento nuclear FIB5 com a matriz de dados concatenados. As barras cinza nos nós são proporcionais ao intervalo entre as idades de cada nó.

DISCUSSÃO

As espécies do gênero *Sicalis* apresentam mudanças ao longo de sua história de classificação com muitas formas consideradas espécies por alguns autores e subespécies por outros, conforme descrito na Introdução. No presente estudo, *Sicalis* se apresenta como um gênero polifilético com alto apoio estatístico (*bootstrap* de 95%; probabilidade posteriori > 95%; Figura 3). *S. citrina*, tanto em Burns et al. (2014) como em nossas análises, se mostra separado das demais espécies do gênero e próximo da base junto com *Phrygilus gayi*, *Melanodera xanthogramma*, *Rowettia goughensis* e *Nesospiza acunhae*. Burns et al. (2014) encontrou em suas análises baixo suporte estatístico (*bootstrap* de 62%; probabilidade posteriori > 80%) na matrizes dos genes concatenados, sugerindo que mais estudos e dados adicionais são necessários para esclarecer a polifilia em *Sicalis*. Contudo, os autores recomendam que *S. citrina* continue no mesmo gênero devido a suas semelhanças morfológicas e comportamentais.

Nas matrizes de dados mitocondrial e nuclear *S. citrina* se mostra mais próxima de algumas espécies do grupo externo nas reconstruções filogenéticas. Porém, é a única espécie que constitui um grupo claramente monofilético. As demais espécies não formam clados ou formam clados com a inclusão de um ou mais exemplares de outra espécie (polifiletismo).

Tanto *S. uropygialis* quanto *S. olivascens* apresentam uma distribuição restrita e com sobreposição. Em nossas análises, os indivíduos destas espécies não formam clados monofiléticos e carecem de estudos adicionais.

Em *S. flaveola*, os espécimens analisados formam um clado com apoio estatístico alto, porém com dois *S. columbiana* (*columbiana2* e *columbiana4*) caindo no mesmo clado. Estas duas espécies possuem uma sobreposição de ocorrência.

Todas as outras espécies de *Sicalis* (*S. lebruni*, *S. taczanowskii*, *S. luteola*, *S. columbiana* e *luteocephala*) também apresentam um ou dois indivíduos de outras espécies em seus ramos. Isso pode ser devido a erros de identificação em relação à forma dos machos jovens que são semelhantes às fêmeas adultas, sendo necessária uma análise mais detalhada dos indivíduos e uma possível reclassificação. Outro fator é que pode haver fluxo gênico entre algumas espécies e uma possível hibridização em zona de contato (simpatria) com introgressão do DNA mitocondrial, com híbridos ou descendentes de híbridos. Ainda pode estar ocorrendo divergência recente com retenção de polimorfismo ancestral, onde duas espécies distintas ainda carregam uma bagagem ancestral em comum. Contudo, mais estudos são necessários para claramente identificar

quais destes processos podem estar contribuindo para o polifiletismo genético neste *taxa*.

As relações filogenéticas encontradas em *Sicalis* neste estudo foram divergentes das encontradas por Burns et al. (2014). Em Burns et al. (2014) podemos dividir o gênero em três clados: I) com *S. citrina* e com outros indivíduos dos gêneros *Phrygilus*, *Nesospiza*, *Rowettia* e *Melanoderera*, separado dos demais *Sicalis*; II) representado por *S. flaveola*, *S. columbiana*, *S. luteola* e *S. luteiventris*; e III) com *S. taczanowskii*, *S. uropygialis*, *S. lebruni*, *S. luteocephala*, *S. olivascens*, *S. auriventris*, *S. lutea* e *S. raimondii*. Neste estudo, podemos dividir o gênero em apenas dois clados: I) *S. citrina*, com a mesma relação encontrada por Burns et al. (2014) e II) com as demais espécies utilizadas neste estudo (Anexo I) isso provavelmente ocorreu pela quantidade de indivíduos por espécie e localidades mais abrangentes usados nos trabalhos.

DIVERSIFICAÇÃO E EVENTOS HISTÓRICOS

Realizou-se a datação molecular para auxiliar a levantar hipótese sobre os eventos geológicos ou climáticos que possivelmente estão relacionados com a diversificação do gênero *Sicalis*. O nó que separa *Sicalis* das demais espécies do grupo externo e de *S. citrina* foi datado de aproximadamente 15 milhões de anos (Mioceno inferior; Figura 4). Ao longo do Mioceno inferior, as características geológicas e geográficas do continente permaneceram praticamente inalteradas. Porém, durante o período que vai do Mioceno inferior ao médio, o clima tornou-se relativamente mais quente e chuvoso (Carvalho & Almeida, 2010). As linhagens dentro de *Sicalis*, em sua maior parte, se diversificaram aproximadamente a oito milhões de anos atrás (fim do Mioceno e início do Plioceno). Segundo Silva (1995), durante este período, o soerguimento do Planalto Central Brasileiro e à medida que o Chaco e áreas circundantes abaixavam em relação ao nível do mar, pode ter sido um processo determinante para a vicariância de grupos de aves que hoje apresentam distribuições disjuntas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAIKE, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19:716-723.
- BOWIE, R. C. K. & FJELDSA, J., 2005. Genetic and morphological evidence for two species in the Udzungwa Forest Partridge *Xenoperdix udzungwensis*. *Journal of East African Natural History* 94(1): 191-201.
- BRUFORD, M. W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J. F., BURKE, T. & HOELZEL, A. R., 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: HOELZEL, A. R. (Ed.). *Molecular genetic analysis of populations: a practical Approach*: IRL Press, Oxford, 225-269.

- BURNS, K.J., SHULTZ, A.J., TITLE, P.O., MASON, N.A., BARKER, F.K., KLICA, J., LANYON, S.M. & LOVETTE, I.J., 2014. Phylogenetics and diversification of Tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Mol. Phylogenetics Evol.* 75: 41-72.
- CARVALHO & ALMEIDA, 2010. *Biogeografia da América do sul*. São Paulo. Rocca.
- CLARK, G. A., Jr. 1986. Systematic interpretations of foot-scut patterns in Neotropical finches. *Wilson Bull.* 98 (4): 594-597.
- CLEMENTS, J.F., SCHULENBERG, T.S., ILIFF, M.J., ROBERSON, D., FREDERICKS, T.A., SULLIVAN, B.L. & WOOD, C.L., 2014. The eBirds/Clements checklist of birds of the world: Version 6.9. Downloaded from <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/> (acesso em 29.11.2014).
- COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. 2014. Listas das aves do Brasil. 11ª Edição 1/1/2014. www.cbro.org.br/CBRO/pdf/AvesBrasil2014.pdf. (Acesso em 29.11.2014).
- DARRIBA D., TABOADA G.L., DOALLO, R. & POSADA, D., 2012. "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9(8): 772.
- DEL HOYO, J., ELLIOTT, A. & CHRISTIE, D. A., 2011. *Handbook of the Birds of the World - Volume 16*. Linx Edicions.
- DRUMMOND, A. J., SUCHARD, M. A., XIE, D., & RAMBAUT, A., 2002. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29 (8): 1969-1973.
- DRUMMOND, A.J., ASHTON, B., BUXTON, S., CHEUNG, M., COOPER, A., DURAN, C., FIELD, M., HELED, J., KEARSE, M., MERKOWITZ, S., MOIR, R., STONES-HAVAS, S. STURROCK, S., THIERER, T. & WILSON, A., 2011. Geneious versão 6.0.6. <http://www.geneious.com/>
- FELSENSTEIN, J., 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 125 (1).
- HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HOWARD, R. & MOORE, A., 1994. *A complete checklist of the birds of the world*. 2ª Edição. London. Academic Press. 630 p.
- HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 17:754-755.
- RAMBAUT, A., SUCHARD, M.A., XIE, D. & DRUMMOND, A.J., 2014. Tracer v1.6, disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (acessado em 08.01.2015).
- REMSEN Jr, J.V., CADENA, C.D., JARAMILLO, A., NORES, M., PACHECO, J.F., PÉREZ-EMÁN, J., ROBBINS, M.B., STILES, F.G. & ZIMMER, K.J., 2014a. A Classification of the Bird Species of South America. *American Ornithologists Union*. www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html (acessado em 29.11.2014).
- RIDGELY, R. S. & TUDOR, G. 1989. *The birds of South America: The Oscine passerines*. volume 1. Austin: University of Texas press. 516 p.
- SHARPE, R.B., 1888. *Catalogue of the birds in the British Museum*. London; Taylor and Francis. Volume 12. 871 p.
- SIBLEY, C. G & B. L. MONROE Jr., 1990. *Distribution and taxonomy of the birds of the world*. New Haven, Yale University Press. 1111 p.
- SICK, H., 1997. *Ornitologia Brasileira, uma Introdução*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- SILVA, J. M. C., 1995. Biogeographic analysis of the South American avifauna. *Steenstrupia*. 21: 49-67.
- SORENSEN, M.D., AST, J.C., DIMCHEV, D.E., YURI, T. & MINDELL, D.P., 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenetic. Evol.* 12: 105-114.
- TAMURA, K. & NEI, M., 1993. Estimation of number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729
- XIA, X., 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular Biology and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 30 (7): 1720-1728.
- WEIR, J. T., & SCHLUTER, D., 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*. 17.10: 2321-2328.

CAPÍTULO II

PADRÃO FILOGEOGRÁFICO DE *S. FLAVEOLA* EVIDENCIA DISCORDÂNCIAS ENTRE AS SUBESPÉCIES DESCRITAS E AS LINHAGENS MITOCONDRIAIS: IMPACTOS PARA A CONSERVAÇÃO

RESUMO

Milhares de canários-da-terra (*Sicalis flaveola*) são apreendidos por órgãos ambientais brasileiros a cada ano e a soltura na natureza é feita sem qualquer critério e de forma indiscriminada, tornando-se difícil sem uma identificação correta das espécies. Além disso, problemas genéticos podem ser causados nas populações locais se indivíduos de diferentes grupos genéticos são introduzidos. *S. flaveola* possui cinco subespécies encontradas em quase toda América do Sul: *S. f. flaveola*, *S. f. valida*, *S. f. koenigi*, *S. f. brasiliensis* e *S. f. pelzelni*. Neste estudo, foi investigado a diferenciação genética entre as cinco subespécies descritas para *S. flaveola* com base em um segmento de 1041 pb do gene mitocondrial desidrogenase subunidade 2 (ND2) e 569 pb do segmento nuclear íntron 5 do gene β -fibrinogênio (FIB5). As análises realizadas evidenciaram que estes foram sete populações geneticamente diferenciadas, sendo estas *S. f. flaveola*, *S. f. valida*, *S. f. koenigi*, *S. f. brasiliensis* do norte e do sul e *S. f. pelzelni* do norte e do sul de suas distribuições. *S. f. brasiliensis* apresentou-se monofilético, sendo o grupo mais antigo. As populações de *S. f. pelzelni* do norte e do sul mostraram-se polifiléticas, apresentando forte estruturação genética. Estas populações poderiam ser tratada como unidades geneticamente distintas, carecendo de uma revisão taxonômica detalhada. As subespécies *S. f. flaveola* e *S. f. valida* parece estarem evoluindo de forma independente, mas ainda não são geneticamente distinguíveis. *Sicalis f. brasiliensis* e *S. f. pelzelni* carecem de um maior cuidado dos órgãos de fiscalização em relação à soltura de exemplares apreendidos na natureza.

INTRODUÇÃO

Os canários-da-terra (*Sicalis flaveola* ssp. (Linnaeus, 1766)) são encontrados em quase toda América do Sul (Ridgely & Tudor, 1989). Esta espécie apresenta porte pequeno (11 a 14 cm) e habita principalmente as áreas semi-abertas da América do Sul (Ridgely & Tudor, 1989; Sick, 1997; Sigrist, 2006). Alguns exemplares foram introduzidos no Havaí, Panamá, Porto Rico e Jamaica (Ridgely & Tudor, 1989).

Atualmente são reconhecidas cinco subespécies de *S. flaveola*: *S. f. brasiliensis*, *S. f. pelzelni*, *S. f. flaveola*, *S. f. valida* e *S. f. koenigi*. As distribuições geográficas das duas primeiras subespécies formam uma área contínua, com possível zona de contato entre os dois táxons no sudeste do Paraná e nordeste de Santa Catarina. *S. f. flaveola* está mais ao norte da América do Sul (Venezuela, região costeira de Guiana, Suriname e Guiana Francesa), *S. f. valida* ocorre apenas nos Andes, entre o Equador e Peru e *S. f. koenigi*, mais ao sul da América do Sul, no noroeste da Argentina. Segundo del Hoyo et al. (2014), as subespécies de *S. flaveola* formariam dois grupos distintos: grupo *flaveola* (forma nominal e *S. f. valida*) e o grupo *pelzelni* (*S. f. pelzeni*, *S. f. brasiliensis* e *S. f. koenigi*) de acordo com características morfológicas e da presença/ausência de dimorfismo sexual.

Ingui & Silveira (2007; dados não publicados) avaliaram a taxonomia das formas brasileiras de *S. flaveola* com base em caracteres morfológicos. Neste trabalho, os autores ressaltam o fato de que o diagnóstico dos táxons em *S. flaveola* pode permitir à elevação a subespécie de *S. f. pelzelni* para a categoria de espécie, segundo o conceito filogenético de espécie e que o *status* de espécie garantirá assim um manejo mais adequado para o táxon em projetos de conservação e reintrodução.

Baseado na grande similaridade morfológica entre as subespécies de *S. flaveola* e nos atuais padrões de distribuição geográfica dessas formas, ocorrendo em populações disjuntas em áreas semiabertas circundando a Amazônia, Sick (1997) propôs que as alterações climáticas que ocorreram durante a formação da Floresta Amazônica no período Quaternário agiram fragmentando as populações de *S. flaveola*. Este autor ressalta ainda que a pouca diferença quanto aos caracteres externos entre as populações setentrionais e meridionais indica que a separação tenha sido relativamente recente. A distribuição de *S. flaveola* pode também ser explicada pela hipótese do corredor de savana Andino que teria conectado no passado a região savânica dos Llanos, em Roraima, Paru, em Monte Alegre, Amapá, com a região do Cerrado brasileiro, Pantanal

e Lhanos de Mojos (Silva & Bates, 2002). Contudo, os processos que levaram a diversificação desta espécie ainda não são claramente compreendidos.

Além disso, o canário-da-terra é um dos pássaros canoros mais apreciados pela população brasileira para criação em cativeiro, juntamente com o papa-capim (*Sporophila* spp.), o pássaro-preto (*Gnorimopsar chopi*), icterídeos (*Icterus* spp.), o curió (*Oryzoborus angolensis*) e o bicudo (*Oryzoborus maximiliani*) (Silveira & Méndez, 1999). A retirada ilegal de canários da natureza pode estar contribuindo para o declínio das populações naturais e ainda ocasiona um segundo problema que é a superlotação dos Centros de Triagens com os indivíduos apreendidos. Na tentativa de diminuir a superlotação em cativeiros, algumas solturas indiscriminadas vêm sendo realizadas pelos órgãos ambientais. A soltura indiscriminada na natureza pode ter impacto direto sob as populações naturais, podendo causar sérios problemas genéticos, como depressão endogâmica e, em casos mais graves, a extinções locais (Templeton, 1986). Por isso, é de extrema importância a identificação das populações geneticamente diferenciadas para orientar o manejo dessa espécie.

A identificação de diferenciação genética entre populações tem sido indispensável para a elaboração de propostas de conservação. Ryder (1986) propôs o conceito de Unidade Evolutivamente Significativa (Evolutionary Significant Unit – ESU), definido como populações ou grupos de indivíduos isolados por um período de tempo suficiente para que estes apresentem alta diversidade genética entre si. A diferenciação genética entre populações também serviu de base na proposta de um conceito menos específico que o de ESU. Moritz (1994) propôs o conceito de Unidade de Manejo (*Management Unit* - MU) baseado nas diferenças das frequências alélicas entre subpopulações.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo filogeográfico de *S. flaveola*, envolvendo as cinco subespécies descritas, buscando compreender os processos históricos e recentes que podem ter influenciado o padrão de distribuição dessa espécie e identificar as possíveis Unidades Evolutivas Significativas (ESUs) e/ou Unidades de Manejo (MUs) presentes nesta espécie. Com base nisso, esperamos proporcionar subsídios para auxiliar na taxonomia desta espécie e para orientar as políticas públicas voltadas ao manejo e conservação dessa espécie, particularmente no que se refere a repatriação de canários apreendidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAGEM

Foram analisadas amostras de tecidos de 80 *S. flaveola*, sendo 12 de *S. f. flaveola*, 33 de *S. f. brasiliensis*, 20 de *S. f. pelzeni*, nove de *S. f. valida*, três de *S. f. koenigi*, três *S. flaveola* “sem confirmação da subespécie”. As amostras foram cedidas por museus nacionais e internacionais, assim como retiradas do banco de tecidos do Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília (LabGenBio). As amostras analisadas abrangem as cinco subespécies descritas e, em alguns casos, mais de um local de coleta por *taxa* foi considerado (Anexo II; Figura 1).

EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

O DNA total foi extraído individualmente de amostras de sangue ou músculo/fígado. Para as amostras de sangue, a extração foi feita em solução contendo 0,1% de SDS, Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM e 10 mg/ml de proteinase K, sendo mantidas durante uma noite a 37°C. O DNA foi purificado por procedimento padrão com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Bruford et al., 1992). Amostras de DNA total cedidas por museus foram extraída individualmente utilizando o *kit* comercial QIAamp DNA (Qiagen), segundo recomendações do fabricante.

Os marcadores genéticos analisados foram o gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) do DNA mitocondrial e o íntron 5 do gene α -fibrinogênio do genoma nuclear. Para amplificação e sequenciamento do segmento mitocondrial foram utilizados os iniciadores LMET e H6313 e dois iniciadores internos, o L5758 e H5766 (Sorenson et al., 1999). Para o segmento do genoma nuclear foram utilizados os iniciadores FIB5 e FIB6 (Bowie & Fjeldsa, 2005). Para algumas amostras, só foi possível o sequenciamento de apenas um dos dois *loci* selecionados conforme especificado no Anexo II, no Anexo III estão especificados os primers utilizados.

Para a amplificação das amostras de sangue e tecido cedidos por museus foram usadas um volume total de 10 μ L, contendo 3.9 μ L de água milli-Q, 1 μ L de dNTPs, 1 μ L de tampão, 0.5 μ L de MgCl₂, 0.1 μ L de Taq polimerase, 1 μ L de primer (F) a 10 μ M, 1 μ L de primer (R) a 10 μ M e 1.5 μ L de DNA. As reações foram desnaturadas a 95°C por 7 minutos, 35 ciclos compostos por 1 minuto a 95°C para desnaturação, 40 segundos a 52°C (sangue) ou 54°C (amostras dos museus) para hibridação e 1 minuto a

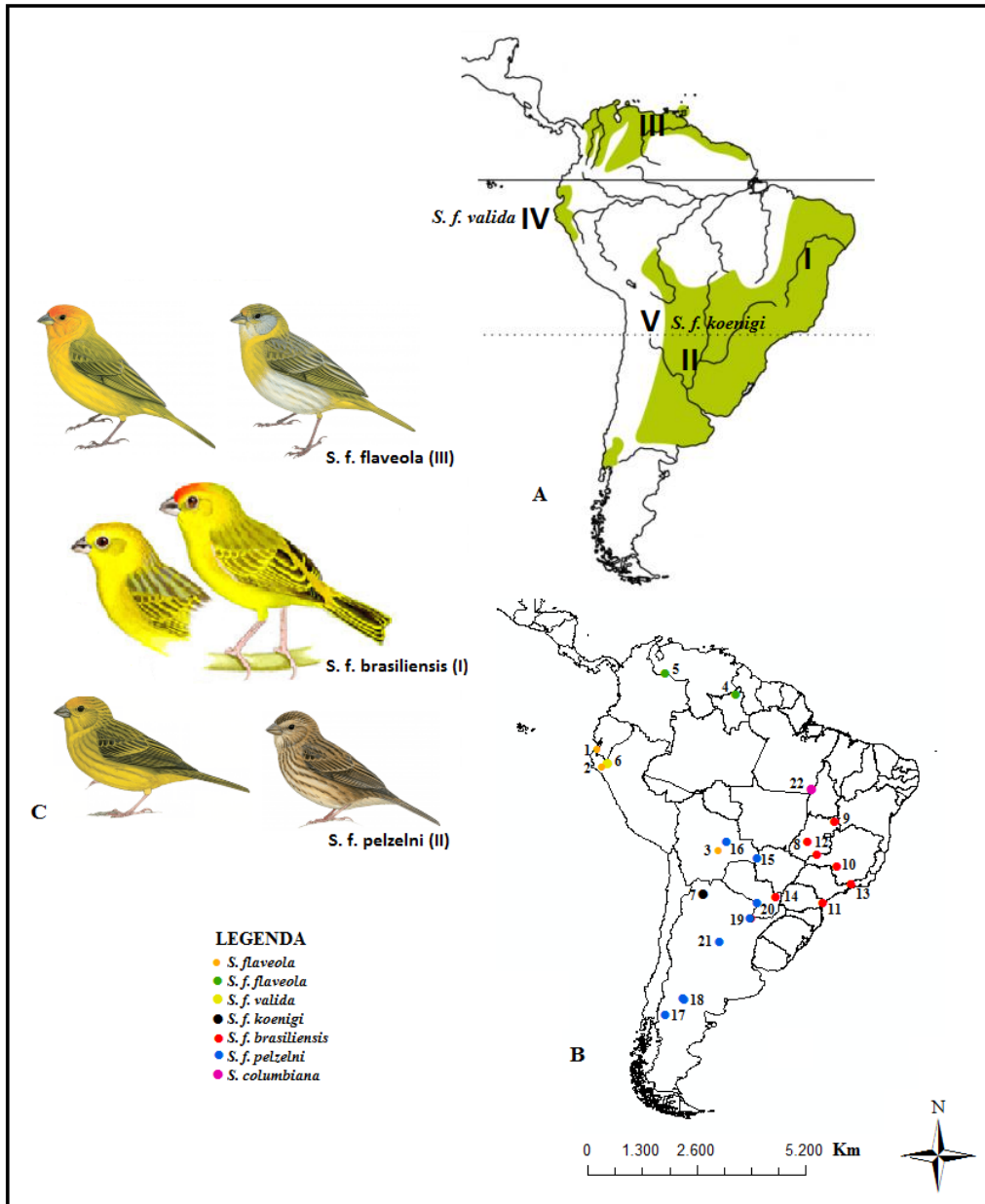


Figura 1. Distribuição das subespécies de *S. flaveola* (A) e as respectivas localidades de coletas das amostras analisadas neste trabalho (B). Fonte: *S. f. pelzelni*, *S. f. flaveola* e mapa de distribuição retirado de *Handbook Birds of the World* (del Hoyo et al., 2014); *S. f. brasiliensis* retirado de Silveira & Méndez (1999).

72°C para extensão. Seguindo extensão de 10 minutos a 72°C. Foi usada Taq polimerase PLATINUM (0.4 µL de MgCl₂ e 0.1 µL de Taq polimerase PLATINUM) para amostras que não estavam amplificando, seguindo as mesmas especificações acima.

Os produtos de PCR foram purificados por reação enzimática com a exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão (ExoI/SAP, USB), segundo recomendações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Life Technologies), segundo recomendações do fabricante. Os produtos do sequenciamento foram analisados em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas e corrigidas com o auxílio do programa GENEIOUS (versão 6.0.6, Drummond et al., 2011).

ALINHAMENTO E MATRIZ DE DADOS

O alinhamento das sequências foi realizado com o algoritmo CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997), implementado no BioEdit (versão 7.2.1, Hall, 1999). No mesmo programa, as sequências foram corrigidas manualmente, obtendo-se duas matrizes de sequências: uma com o gene mitocondrial e a outra com o segmento nuclear.

ANÁLISES GENÉTICAS

Para a realização das análises genéticas, as amostras foram separadas em sete populações refletindo as diferentes subespécies e seus respectivos locais de coleta:

- I) *S. f. flaveola* (Pacaraíma-RR, Brasil e Venezuela);
- II) *S. f. valida*, (Peru);
- III) *S. f. koenigi* (Jujuy, Argentina);
- IV) *S. f. brasiliensis* do norte de Goiás (Guarani de Goiás-GO, Brasil);
- V) *S. f. brasiliensis* do sul de Goiás (Aurilândia-GO, Brasil);
- VI) *S. f. pelzelni* do norte (Corumbá-MS, Brasil) e
- VII) *S. f. pelzelni* do sul (Argentina).

A diversidade genética das diferentes populações de *S. flaveola* foi caracterizada calculando os índices de diversidade nucleotídica (D_N) e diversidade haplotípica (D_H) no programa DNAsp 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009).

Para averiguar a relação genética entre as sequências ou haplótipos obtidos para as diferentes populações de *S. flaveola* foi realizada a construção de rede de haplótipos pelo método descrito por Bandelt et al. (1999) com o programa NETWORK (versão 4.6.1.2; Fluxus Technology Ltd). Para identificar um possível cenário de estruturação

genética em *S. flaveola* foi empregado o método descrito por Holsinger & Mason-Gamer (1996) com o programa Nucleodiv. Para esta análise os grupos citados acima foram usados como terminais na construção do dendograma.

Para averiguar o nível de estruturação genética em *S. flaveola* foram estimados os valores de Φ_{ST} (análogo ao F_{ST} de Wright (1950) em diferentes níveis hierárquicos empregando a Análise de Variância Molecular (AMOVA com o programa ARLEQUIM (versão 3.5.1.3; Excoffier & Lischer, 2010). A formação dos níveis hierárquicos para esta análise foi feita com base nos resultados da análise anterior, ou seja, a população de *S. f. brasiliensis* do norte contem indivíduos coletados em Guarani de Goiás-GO, Brasil; a população de *S. brasiliensis* do sul é representada por indivíduos coletados em Aurilândia-GO, Brasil; a população de *S. f. flaveola* foi coletada em dois pontos: Pacaraíma-RR, Brasil e na Venezuela; a população de *S. f. koenigi* foi coletada em Jujuy na Argentina; a população de *S. f. pelzelni* do norte são representantes da localidade de Corumbá-MS, Brasil; *S. f. pelzelni* do sul, coletada na Argentina e a população de *S. f. valida* foi coletada no Peru.

RESULTADOS

A composição nucleotídica, o número total de sítios, de sítios conservados, de sítios variáveis, para o gene mitocondrial (DNAm_t) e para o gene nuclear (DNAnu) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Informações sobre a composição nucleotídica, sítios, e modelos evolutivos selecionados para cada gene usados nas análises filogeográficas.

	ND2	FIB5
Composição nucleotídica em (% de A/C/G/T)	29,63/34,32/0,88/25,17	30,26/16,55/21,02/32,17
Número de sítios analisados	1041	569
Número de sítios conservados	788	537
Número de sítios variáveis	253	32

Para o ND2, foram identificados 27 haplótipos, dos quais três são compartilhados por duas ou mais subespécies. Para o FIB5 foram observados apenas sete haplótipos, sendo que um deles foi compartilhado por todas as subespécies e dois são exclusivos de *S. columbiana*. O número de haplótipos identificados por subespécie variou de dois a oito para o ND2 e de um a quatro para FIB5 (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização genética das subespécies de *S. flaveola* com base na análise de um segmento de 1.041 pb do gene ND2 e um de 569 pb do FIB5.

Táxon	ND2			FIB5		
	N	D _N	D _H	N	D _N	D _H
<i>S. f. flaveola</i>	10(5)	0,001	0,75	11(2)	0,001	0,18
<i>S. f. valida</i>	7(2)	0,001	0,28	7(2)	0,001	0,28
<i>S. f. koenigi</i>	2(2)	0,003	1,00	3(2)	0,001	0,66
<i>S. f. brasiliensis</i> norte	11(8)	0,017	0,89	11(1)	0,000	0,00
<i>S. f. brasiliensis</i> sul	10(7)	0,017	0,91	12(3)	0,001	0,31
<i>S. f. pelzeni</i> norte	6(3)	0,001	0,60	10(2)	0,001	0,20
<i>S. f. pelzeni</i> sul	4(3)	0,001	0,83	4(4)	0,007	1,00

N - número de indivíduos analisados (número de haplótipos); D_N – diversidade nucleotídica; D_H diversidade haplotípica.

Com base na rede de haplótipos do gene ND2, foram identificados três grupos de haplótipos (Figura 2). O GRUPO I corresponde à *S. f. brasiliensis* e os *S. columbiana* coletados em Almeirim e Santana do Araguaia no estado do Pará. O GRUPO II corresponde às subespécies *S. f. valida*, *S. f. flaveola* e *S. f. pelzeni* do norte, com dois haplótipos (Ha16 e Ha17) compartilhados entre estas subespécies. O GRUPO III

corresponde à *S. f. pelzeni* do sul e *S. f. koenigi*, com apenas um haplótipo (Ha18) compartilhado com *S. f. brasiliensis* e *S. columbiana*.

A variabilidade genética do *loci* nuclear foi menor do que a do *loci* mitocondrial, com praticamente todas as subespécies possuindo um único haplótipo, o qual é compartilhado entre elas (Figura 2B).

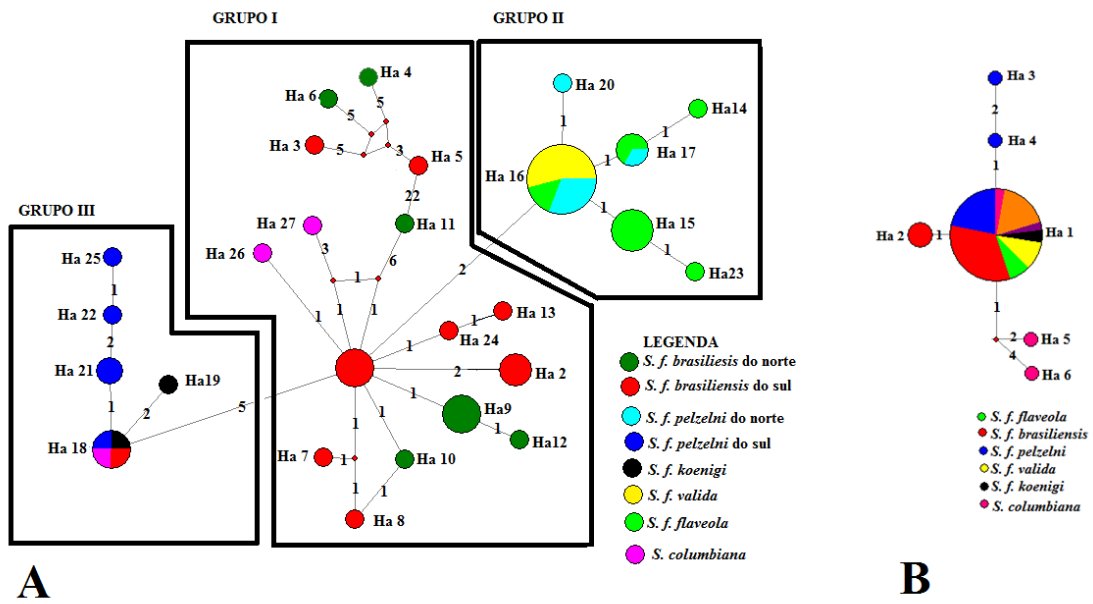


Figura 2. Redes de haplótipos obtidas pela análise de segmentos de DNA de exemplares das cinco subespécies de *S. flaveola* e *S. columbiana* com o programa NETWORK 4.6. A) 1.041 pb do gene ND2; B) 569 pb do FIB5. O tamanho dos círculos corresponde à frequência relativa dos haplótipos na população amostral. O número em cada linha de conexão entre haplótipos corresponde ao número de sítios polimórficos que separam os respectivos haplótipos.

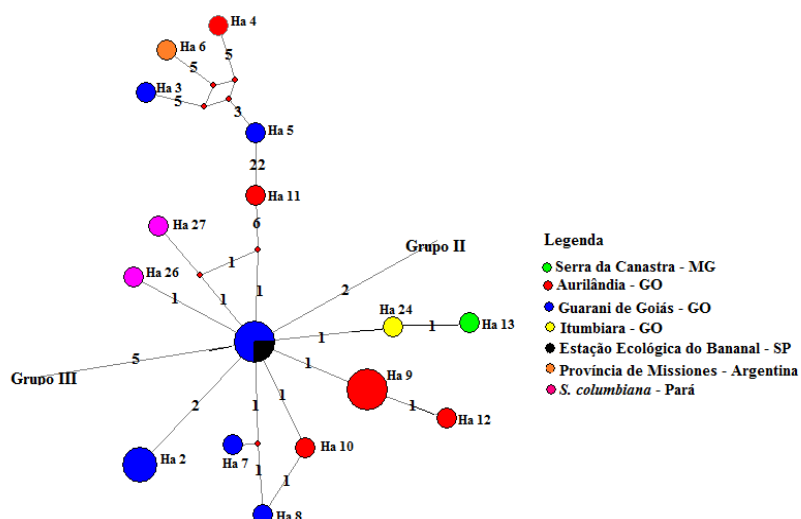


Figura 3. Redes de haplótipos obtidas pela análise de um segmento DNA mitocondrial (1041 pb) de exemplares *S. f. brasiliensis* obtida com o programa Network 4.6. O tamanho dos círculos corresponde à frequência relativa dos haplótipos na população amostral. O número em cada linha de conexão entre haplótipos corresponde ao número de sítios polimórficos que separam os respectivos haplótipos.

A análise hierárquica da diversidade nucleotídica (Figura 4) evidenciou a estruturação das duas populações de *S. f. brasiliensis*, mas no mesmo grupo está a subespécie *S. f. flaveola*. *S. f. koenigi* está no mesmo grupo que *S. f. pelzelni* do sul, mostrando a mesma relação apresentada pela rede de haplótipos e o mesmo se observa com as subespécies *S. f. valida* e *S. f. pelzelni* do norte. A diferença encontrada está no fato que na rede de haplótipos *S. f. flaveola* está no mesmo grupo (GRUPO III) formado por *S. f. valida* e *S. f. pelzelni* do norte.

A Tabela 3 descreve os índices de diversidade molecular obtidos pela AMOVA, sendo que a maior parte da diversidade genética (cerca de 74%) encontra-se dentro das populações, porém uma parcela significativa (cerca de 26%; $P = 0,005$) encontra-se entre as populações dos diferentes grupos estudados.

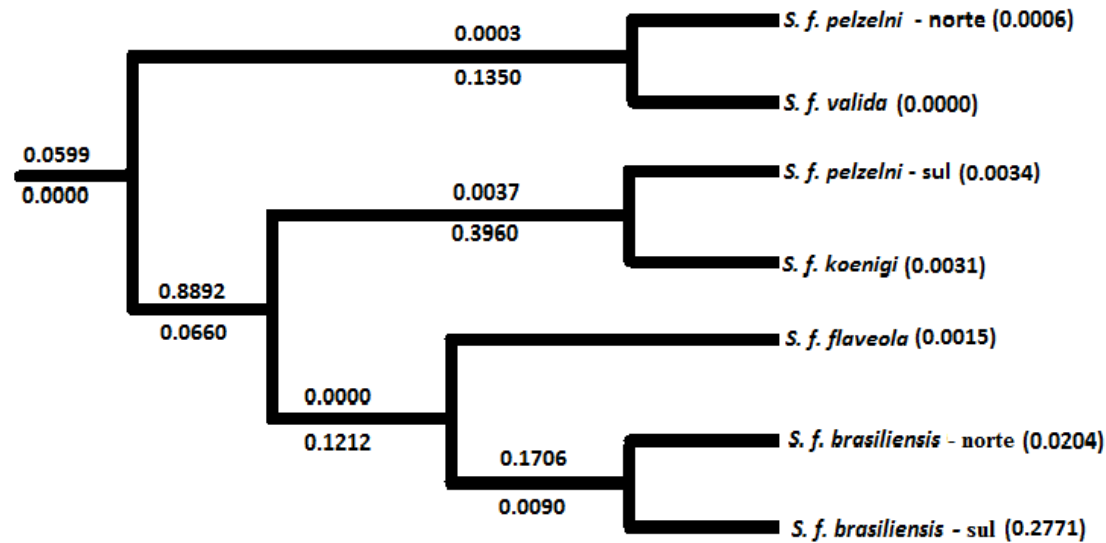


Figura 4. Relação genética entre os sete grupos amostrados, obtidos pela análise hierárquica da diversidade nucleotídica. Os valores de G_{ST} são mostrados e representam a proporção do total da diversidade genética dentro de um clado (número acima dos ramos). Os números entre parênteses indicam os valores Φ_{ST} estimados por AMOVA (Φ_{ST} valores significativos ($P < 0,05$) são indicados por um asterisco) e números abaixo dos ramos representa o valor de P.

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) para o gene mitocondrial entre os diferentes níveis hierárquicos estabelecidos para as diferentes subespécies de *S. flaveola*.

Fonte de variação	d.f.	Soma dos Quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	3	577	1,49776 Va	2,10%
Entre Populações dentro de grupos	3	497	17,06634 Vb	23,92%
Dentro populações	43	2270	52,79090 Vc	73,98%
Total	49	3344	71,35500	---

Por outro lado, as subespécies *S. f. valida* e *S. f. flaveola* (GRUPO II) não são

Tabela 4. Valores par a par de Φ_{ST} para as sete populações de *S. flaveola* com base na análise do ND2 (diagonal inferior). Os valores estatisticamente significativos ($P < 0,05$) são indicados pelo símbolo “+” na diagonal superior.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
I - <i>S. f. brasiliensis</i> norte	0,00000	+	+	+	-	+	+
II - <i>S. f. brasiliensis</i> sul	0,26970	0,00000	+	-	-	-	-
III - <i>S. f. flaveola</i>	0,43481	0,22400	0,00000	+	+	+	-
IV - <i>S. f. koenigi</i>	0,31197	0,09539	0,47293	0,00000	-	+	-
V - <i>S. f. pelzelni</i> sul	0,07857	0,12551	0,41484	0,34915	0,00000	+	-
VI - <i>S. f. pelzelni</i> norte	0,15905	0,25411	0,50676	0,78002	0,47872	0,00000	-
VII - <i>S. f. valida</i>	0,18239	0,19599	0,17436	0,48057	0,27730	0,23045	0,00000

DISCUSSÃO

Pela análise dos grupos apresentados pela rede de haplótipos (Figura 2) é possível inferir que *S. f. brasiliensis* (GRUPO I) parece ser um táxon geneticamente bem definido e com elevada diversidade nucleotídica e haplotípica (Tabela 4), o que sugere que este seja o grupo mais antigo dos três. Em acordo com esta interpretação está o fato dos demais grupos de haplótipos terem sua origem a partir do haplótipo mais interno (Ha 1) do GRUPO I. Neste grupo também estão os indivíduos de *S. columbiana* que nas relações filogenéticas (Capítulo I) caíram no mesmo clado que *S. flaveola*, o que possivelmente pode ter sido um erro de identificação já que estas duas espécies possuem sobreposição em suas distribuições. Observação mais detalhada desses indivíduos de *S. columbiana*, que estão depositados em museu, deve ser realizada para resolver esta questão.

Por outro lado, as subespécies *S. f. valida* e *S. f. flaveola* (GRUPO II) não são claramente distinguíveis entre si com base na distribuição de haplótipos, inclusive com o compartilhamento do haplótipo mais interno (Ha 16) e possível ancestral do grupo. De forma semelhante, o valor de ϕ_{ST} observado entre estas duas linhagens não é estatisticamente diferente de zero ($\phi_{ST} = 0,17$; $P = 0,05$), o que sugere ausência de diferenciação genética entre estas duas subespécies. Porém, considerando que estas duas subespécies apresentam distribuição disjunta (Figura 6), é razoável considerar que o compartilhamento deste haplótipo entre estas duas subespécies seja devido à retenção de polimorfismo ancestral mais do que devido a fluxo gênico recente. Considerando ainda que este grupo possa ter origem recente, parece plausível inferir que estas duas subespécies estejam evoluindo de forma independente, porém ainda não atingiram distinção genética entre si.

Ainda no GRUPO II estão presentes os exemplares de *S. f. pelzeni* amostrados mais ao norte da distribuição desta subespécie, em Corumbá – MS, Brasil. Os haplótipos observados nestes indivíduos estão separados dos haplótipos dos demais indivíduos de *S. f. pelzeni* por diversos sítios variáveis e ainda, o valor de ϕ_{ST} entre estas duas populações são altos ($\phi_{ST} = 0,48$; $P = 0,01$), evidenciando forte estruturação genética nesta subespécie, podendo inclusive ser interpretada como unidades geneticamente distintas.

Ingui e Silveira (2007; dados não publicados) observaram que *S. f. pelzelni* é morfologicamente diferenciado de *S. f. brasiliensis* pela coloração e comprimento da região da frente nos machos e coloração do ventre nas fêmeas, assim como parece ser também das demais subespécies de *S. flaveola*. Com base nestes resultados, os autores

sugerem a elevação de *S. f. pelzelni* ao nível de espécie. Nossos dados parcialmente concordam com esta observação, uma vez que evidenciam diferença genética alta entre *S. f. pelzelni* e *S. f. brasiliensis*, porém nenhuma das populações de *S. f. pelzelni* apresenta identidade genética em relação a *S. f. koenigi* e *S. f. valida*.

De forma semelhante ao descrito acima para *S. f. valida* e *S. f. flaveola*, o cenário para as subespécies envolvidas no GRUPO III, isto é, as amostras de *S. f. pelzeni* do sul da distribuição e as de *S. f. koenigi* parece ser de divergência recente com compartilhamento de haplótipos por retenção de polimorfismo ancestral. Estes dois *taxa* possuem haplótipos exclusivos, mas também compartilham o haplótipo mais interno do grupo e provavelmente o ancestral deste grupo. Contudo, para estes dois *taxa* não é conhecida nenhuma barreira efetiva que crie uma descontinuidade na distribuição geográfica destas subespécies. Desta forma, ainda é necessário identificar com mais precisão os possíveis limites geográficos destas duas subespécies. Por fim, considerando que o número de sítios variáveis que separa o GRUPO III do GRUPO I (cinco sítios) é maior do que o número de sítios que separa o GRUPO II do GRUPO I (dois sítios) pode-se inferir que o GRUPO II tenha se divergido do GRUPO I mais recentemente do que o GRUPO III.

Finalmente, del Hoyo et al. (2014) dividem *S. flaveola* em dois grupos: o grupo *flaveola* (forma nominal e *S. f. valida*) e o grupo *pelzelni* (*S. f. pelzelni*, *S. f. brasiliensis* e *S. f. koenigi*). Essa divisão foi feita com base no dimorfismo sexual, onde no primeiro grupo, as subespécies não apresentam diferenciação morfológica entre os sexos enquanto no segundo, as subespécies apresentam dimorfismo sexual. Desta forma, os dados deste trabalho reforçam esta divisão, uma vez que, que as subespécies *S. f. flaveola* e *S. f. valida* parecem formar um grupo genético distinto das demais subespécies.

BIOGEOGRAFIA DE *S. FLAVEOLA*

O cenário filogeográfico que pode ser interpretado a partir da rede de haplótipos se configura com a origem de *S. flaveola* em algum lugar no leste do Brasil (GRUPO I), seguido de dois eventos de diferenciação genética em regiões opostas, um a noroeste (GRUPO II) e outro ao sul da América do Sul (GRUPO III), sendo que em ambas estas localidades parece estar havendo nova divergência nestas linhagens. *S. flaveola* apresenta ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo em quase todos os biomas neotropicais, estando ausente somente na bacia Amazônica (Figura 6). Portanto, a bacia

Amazônica parece representar uma barreira efetiva à dispersão de *S. flaveola*. Sendo assim, a diversificação deste táxon pode estar relacionada com a formação desta importante bacia da América do Sul. Por outro lado, o padrão de distribuição das subespécies do GRUPO II também parece favorecer a hipótese de expansão demográfica seguido de isolamento em consonância com a expansão e retração das áreas abertas da América do Sul durante os ciclos climáticos do Quaternário (Silva & Bates, 2002). Estudos futuros empregando métodos de estimativa de tempos de divergência entre estas linhagens poderão contribuir para elucidar o papel da Bacia Amazônica na diversificação deste táxon.

CONTRIBUIÇÃO PARA A CONSERVAÇÃO

Um problema ocasionado pelo tráfico de animais silvestres, além da potencial diminuição das populações originais, é a soltura indiscriminada de indivíduos apreendidos na natureza. O acréscimo de indivíduos geneticamente diferentes nas populações naturais pode causar sérios problemas genéticos, podendo levar a depressão por exocruzamento e, em casos mais graves, a extinções locais (Templeton, 1986). Nesse caso, é de fundamental importância para o manejo dessa espécie a identificação das populações geneticamente diferenciadas presentes na sua área de distribuição e consequentemente, uma reavaliação taxonômica de suas formas geográficas.

Com este trabalho foi possível identificar a existência de populações com diferenças genéticas dentro de *S. f. brasiliensis* do norte e do sul e *S. f. pelzeni* do norte e do sul, o que requer uma atenção maior dos órgãos ambientais no que se refere à soltura dos canários apreendidos na natureza. Para isso, devem-se levar em consideração quais subespécies estão sendo traficadas, como e onde devem ser soltas. Outro exemplo é *S. f. valida*, a forma encontrada no Peru, e que é facilmente confundida com o *S. f. brasiliensis*, que difere basicamente no tamanho (*S. f. valida* é maior). Com os resultados deste trabalho fica mais evidente que estas duas formas também apresentam diferenciação genética suficiente para serem tratadas com unidades de manejo diferentes do ponto de vista da conservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDELT, H. J., FORSTER, P. & RÖHL, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- BOWIE, R. C. K. & FJELDSA, J., 2005. Genetic and morphological evidence for two species in the Udzungwa Forest Partridge *Xenoperdix udzungwensis*. *Journal of East African Natural History* 94.1: 191-201.
- BRUFORD, M. W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J. F., BURKE, T. & HOELZEL, A. R., 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: HOELZEL, A. R. (Ed.). *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach.*: IRL Press, Oxford, 225-269.
- DEL HOYO, J., ELLIOTT, A. & CRITIE, D. A., 2011. *Handbook of the Birds of the World - Volume 16*. Linx Edicions.
- DRUMMOND, A.J., ASHTON, B., BUXTON, S., CHEUNG, M., COOPER, A., DURAN, C., FIELD, M., HELED, J., KEARSE, M., MERKOWITZ, S., MOIR, R., STONES-HAVAS, S. STURROCK, S., THIERER, T. & WILSON, A., 2011. Geneious versão 6.0.6. <http://www.geneious.com/>
- EXCOFFIER, L. e HEL Lischer (2010). Arlequin suíte ver 3.5: Uma nova série de programas para realizar análises de genética de populações sob Linux e Windows . *Moleculares Recursos ecologia*. 10: 564-567.
- HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HOLSINGER, K.E. e MASON-GAMER, R. J., 1996. A análise hierárquica da diversidade de nucleotídeos em populações geograficamente estruturados. *Genetics* 142: 629-639.
- INGUI, D. L. e SILVEIRA L. F., 2007. Taxonomia das formas brasileiras de *Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766) (passeriformes: emberizidae) com base em caracteres morfológicos. Relatório final do projeto de Iniciação Científica realizado no Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo (USP) e financiado pela (FAPESP).
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- MORITZ, C., 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3: 401-411.
- RIDGELY, R. S. & TUDOR, G. 1989. *The birds of South America: The Oscine passerines*. volume 1. Austin: University of Texas press. 516 p.
- RYDER, O. A., 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 9-10.
- SICK, H., 1997. *Ornitologia Brasileira, uma Introdução*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- SIGRIST, T. 2006. *Aves do Brasil: uma visão artística*. Editora Fوسفetil, 672p.
- 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.
- SILVEIRA, L. F. & MÉNDEZ A. C., 1999. Caracterização das formas brasileiras do gênero *Sicalis* (passeriformes, emberizidae). *Atualidades Ornitológicas* 90: 6-8.
- SORENSEN, M.D., AST, J.C., DIMCHEV, D.E., YURI, T. & MINDELL, D.P., 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenetic. Evol.* 12: 105-114.
- TEMPLETON, A.R., 1986. Coadaptation and outbreeding depression. In: *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. (ed. Soulé ME), pp. 105–116. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- WRIGHT, S., 1950. Genetical structure of populations. *Nature* 166: 247-249.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados das análises filogenéticas e filogeográficas nos permitem concluir que:

- Assim como descrito por Burns et al. (2014), o gênero *Sicalis* é polifilético;
- O gênero pode ser dividido em dois clados principais, um com *S. citrina* e espécies dos gêneros *Phrygilus*, *Melanodera*, *Rowettia* e *Nesospiza* e outro com as demais espécies de *Sicalis*;
- *S. citrina* parece ser uma espécie válida, constituindo um grupo monofilético;
- *S. lutea*, *S. olivascens* e *S. uropygialis* se mostram grupos polifiléticos e carecem de mais estudos complementares;
- *S. flaveola* provavelmente constitui uma linhagem monofilética;
- A linhagem que deu origem ao gênero surgiu há aproximadamente 15 milhões de anos atrás, no Mioceno inferior;
- A bacia Amazônica parece ser um importante elemento na diversificação deste gênero e merece maior atenção em estudos futuros;
- *S. f. brasiliensis* parece ser geneticamente a forma mais antiga;
- *S. f. pelzelni* é polifilético e merece atenção especial quando na revisão taxônomica deste taxa;
- *S. f. pelzelni* apresenta forte estruturação genética e as populações do norte e do sul de sua distribuição poderiam ser tratadas como unidades de manejo geneticamente distintas;
- *S. f. flaveola* e *S. f. valida* parece estarem evoluindo de forma independente, mas ainda não são geneticamente distinguíveis e
- *S. f. brasiliensis* e *S. f. pelzelni* merecem um maior cuidado dos órgãos de fiscalização em relação à soltura de exemplares apreendidos na natureza.

ANEXOS

Anexo I. Descrição das amostras do gênero *Sicalis* usados para reconstrução das relações filogenéticas. Táxon; N° = número no mapa de localidades de coleta; Fonte; Vouchers; localidade; sequências usadas na matriz de DNA mitocondrial (**ND2**), na matriz de DNA nuclear (**FIB5**) e na matriz com os genes concatenados (**ND2+FIB5**).

Táxon	N°	Fonte	Voucher	Localidade	GenBank		
					ND2	FIB5	ND2+FIB
<i>Sicalis citrina</i>	1	MUZUSP	75503	Brasil: Estação Águas Emendas, Distrito Federal	-	*	citrina1
	2	MUZUSP	91791	Brasil: Sítio Bom Retiro, Oliveira, Minas Gerais	*	*	citrina2
	2	MUZUSP	91792	Brasil: Sítio Bom Retiro, Oliveira, Minas Gerais	*	*	citrina3
	3	LabGenBio-UnB	UFG 4079	Brasil: Fazenda Experimental da Embrapa – Macapá, Amapá	*	*	citrina4
	3	LabGenBio-UnB	UFG 4082	Brasil: Fazenda Experimental da Embrapa – Macapá, Amapá	*	*	citrina5
	4	LSUMZ	B-15400	Bolívia: Serrania de Huanchaca, Departamento de Santa Cruz	*	*	citrina6
	4	LSUMZ	B-15400	Bolívia: Santa Cruz, Serrania de Huanchaca, 45 km E Florida	JN8105 18.1	JN810 265.1	citrina7
<i>Sicalis columbiana</i>	5	MUZUSP	83717	Brasil: Almeirim, Pará	*	*	columbiana1
	5	MUZUSP	88296	Brasil: Fazenda Fartura, Santana do Araguaia, Pará	*	-	columbiana2
	5	MUZUSP	90295	Brasil: Fazenda Fartura, Santana do Araguaia, Pará	*	*	columbiana3
	5	MUZUSP	90296	Brasil: Fazenda Fartura, Santana do Araguaia, Pará	*	*	columbiana4
	6	MPEG	MPDS 773	Brasil: Humaitá, Território Indígena Ipixuna, Miriti, Amazonas	*	*	columbiana5

	6	MPEG	MPDS 774	Brasil: Humaitá, Território Indígena Ipixuna, Miriti, Amazonas	*	*	columbia na6
	7	FMNH	391601	Brasil: Fazenda São Bento, Tartarugalzinho, Amapá	JN8105 19.1	-	columbia na7
<i>Sicalis lebruni</i>	8	MACN	53253	Argentina: Tierra del Fuego, Estancia la Violeta	*	-	lebruni1
<i>Sicalis lutea</i>	9	MACN	6717	Bolivia: La Paz, Provincia de Murillo, Campus Univ. de Cota Cota	*	*	lutea1
	10	FMNH	391932	Peru: Departamento de Ancash, Carhuaz, Ishinca	EU6479 56.1	-	lutea2
<i>Sicalis luteocephala</i>	11	ZMUC	116483	Bolivia: Cerro Kehuinal, Cochabamba	*	*	luteoceph ala1
	11	ZMUC	116484	Bolivia: Cerro Kehuinal, Cochabamba	-	*	luteoceph ala2
	11	ZMUC	116485	Bolivia: Cerro Kehuinal, Cochabamba	*	*	luteoceph ala3
	12	ZMUC	120814	Bolivia: Tarabuco, Chuquisaca	-	*	luteoceph ala4
	12	ZMUC	120867	Bolivia: Chuquisaca	*	*	luteoceph ala5
	12	ZMUC	120870	Bolivia: Culpina, Chuquisaca	-	*	luteoceph ala6
	12	ZMUC	120871	Bolivia: Culpina, Chuquisaca	*	*	luteoceph ala7
	13	MACN	350	Argentina: Ruta 5, cerca del puente el Rio Yavi, Jujuy	*	*	luteoceph ala8
	13	MACN	351	Argentina: Ruta 5, cerca del puente el Rio Yavi, Jujuy	-	*	luteoceph ala9
	11	ZMUC	116483	Bolivia: Cerro Kehuinal, Cochabamba	JN8105 22.1	-	luteoceph ala10
<i>Sicalis luteola</i>	14	MUZUSP	79069	Brasil: Margem esquerda do Rio Urarioera, Roraima	*	*	luteola1

	-	MUZUSP	83532	Cativeiro	*	*	luteola2
	15	LSUMZ	B-48520	Guyana: Region 9, Ireng River, Karasabai	*	*	luteola3
	16	LSUMZ	B-61434	Peru: 10 km SW Nunoa, Departamento de Puno	*	*	luteola4
	17	ZMUC	144830	Paraguai: Estancia Sombrero, Cordillera	-	*	luteola5
	18	NHMK	11905	Argentina: Rio Negro, ao sul de Las Grutas	*	*	luteola6
	19	MACN	17	Argentina: Lago Parque La Salada, Pedro Luro, Buenos Aires	*	*	luteola7
	20	FMNH	389274	Brasil: Fazenda Santa Cecília, E Rio Branco, Boa vista, Roraima	EU6479 57.1	JN810 266.1	luteola8
<i>Sicalis luteiventris</i>	19	MACN	68470	Argentina: Parque La Salada, Pedro Luro, Buenos Aires	JN8105 21.1	-	S. luteiventris1
<i>Sicalis luteola luteiventris</i>	21	AMNH	DOT134 71	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	*	-	luteiventris1
	21	AMNH	DOT134 72	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	-	*	luteiventris2
	21	AMNH	DOT134 73	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	*	*	luteiventris3
	21	AMNH	DOT134 74	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	-	*	luteiventris4
	21	AMNH	DOT134 82	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	*	*	luteiventris5
	21	AMNH	DOT135 10	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	*	*	luteiventris6
	21	AMNH	DOT135 25	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	-	*	luteiventris7
	21	AMNH	DOT135 26	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	*	*	luteiventris8

<i>Sicalis olivascens</i>	21	AMNH	DOT13568	Argentina: Rio Negro, Departamento de Pilcaniyeu	*	-	luteiventris9
	22	MACN	359	Argentina: Ruta 5 8 Km E de Susques, Jujuy	*	*	olivascens1
	23	MACN	1307	Argentina: 20 km N Antofagasta de la Sierra, Catamarca	*	*	olivascens2
	22	NHMK	9801	Argentina: Tumbaya, ca. 7 km, Jujuy	*	*	olivascens3
	22	NHMK	9816	Argentina: Tumbaya, ca. 7 km, Jujuy	*	*	olivascens4
	24	ZMUC	116488	Bolivia: Cerro Khenwa-Sandra, Cochabamba	-	*	olivascens5
	24	ZMUC	116489	Bolivia: Cerro Khenwa-Sandra, Cochabamba	*	*	olivascens6
	24	ZMUC	116490	Bolivia: Cerro Khenwa-Sandra, Cochabamba	-	*	olivascens7
	24	ZMUC	116491	Bolivia: Cerro Khenwa-Sandra, Cochabamba	-	*	olivascens8
	24	ZMUC	116492	Bolivia: Cerro Khenwa-Sandra, Cochabamba	*	*	olivascens9
	24	ZMUC	116493	Bolivia: Cerro Khenwa-Sandra, Cochabamba	-	*	olivascens10
	25	ZMUC	116494	Bolivia: Potosi	-	*	olivascens11
-	LSUMZ	B-17162	Argentina	*	*	olivascens12	
	22	MBM	5435	Argentina, Jujuy	EF529874.1	-	olivascens13
<i>Sicalis uropygialis</i>	26	NHMK	21262	Peru: leste de Sina	*	*	uropygialis1

26	NHMK	21174	Peru: leste de Sina	*	*	uropygial is2
27	ZMUC	116495	Peru: 3 Km de Ondores, Junin	-	*	uropygial is3
27	ZMUC	116496	Peru: 3 Km de Ondores, Junin	*	*	uropygial is4
27	ZMUC	116497	Peru: 3 Km de Ondores, Junin	-	*	uropygial is5
27	ZMUC	116498	Peru: 3 Km de Ondores, Junin	*	-	uropygial is6
27	ZMUC	116499	Peru: 3 Km de Ondores, Junin	-	*	uropygial is7
27	ZMUC	116500	Peru: 3 Km de Ondores, Junin	*	*	uropygial is8
28	ZMUC	116501	Peru: Abra la Raya, Cusco, Puno	*	*	uropygial is9
28	ZMUC	116502	Peru: Abra la Raya, Cusco, Puno	*	*	uropygial is10
28	ZMUC	116503	Peru: Abra la Raya, Cusco, Puno	*	*	uropygial is11
29	ZMUC	116505	Bolívia: Kencoara, Potosi	*	*	uropygial is12
29	ZMUC	116507	Bolívia: Kencoara, Potosi	-	*	uropygial is13
29	ZMUC	116508	Bolívia: Kencoara, Potosi	*	*	uropygial is14
29	ZMUC	116509	Bolívia: Kencoara, Potosi	*	*	uropygial is15
27	ZMUC	116510	Peru: Ondores, Junin	-	*	uropygial is16

	30	ZMUC	116515	Peru: Yaurihuirí, Ayacucho, Punquio	-	*	uropygialis17
	27	ZMUC	116511	Peru: Ondores, Junin	-	*	uropygialis18
	31	ZMUC	121465	Peru: Quebrada Pucavado, Ancash C. Blanca	*	*	uropygialis19
	27	LZUMZ	B-49616	Peru: Vicco área, ca 39.5 km NW, Departamento de Pasco, Junin	*	*	uropygialis20
	27	ZMUC	116495	Peru: 3 Km de Ondores, Junin	JN8105 24.1	-	uropygialis21
<i>Sicalis Taczanowskii</i>	32	LZUMZ	B-5244	Peru: La Pampas, próximo a Olmos, Departamento de Lambayeque	-	*	taczanowskii1
	33	LZUMZ	B-65965	Peru: Departamento de Tumbes, Zorritos	*	*	taczanowskii2
	33	LZUMZ	B-66807	Peru: Departamento de Tumbes, Rio Bocapan Drainage	-	*	taczanowskii3
	33	LZUMZ	B-67422	Peru: Departamento de Tumbes, Zorritos	*	*	taczanowskii4
	34	LZUMZ	B-49602	Peru: Santa Eulalia road, ca 100 km ENE Lima	*	*	taczanowskii5
	-	ZMUC	134128	Cativeiro	*	-	taczanowskii6
	32	LZUMZ	B-5244	Peru: La Pampas, próximo a Olmos, Departamento de Lambayeque	JN8105 23.1	-	taczanowskii7
<i>Sicalis flaveola</i>	35	LabGenBio-UnB	UFG244	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	*	*	flaveola1
	35	LabGenBio-UnB	UFG265	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	*	*	flaveola2
	36	LabGenBio-UnB	UFG275 9	Brasil: Parque Nacional Serra da Canastra, Minas Gerais	*	*	flaveola3

	37	LabGenBio- UnB	UFG141 3	Venezuela	*	*	flaveola4
	38	MUZUSP	80857	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	*	*	flaveola5
	39	MACN	345	Argentina: Calle Quitupi, Los Perales, Jujuy	*	*	flaveola6
	40	UWBM	70184	Argentina: Provincia de Corrientes	JN8105 20.1	-	flaveola7
<i>Acanthidops bairdii</i>	-	LSUMZ	B-8300	Costa Rica: San Jose, Cerro de la Meurte, Pan American Highway, Km 113	EU6479 24.1	-	<i>A. bairdii</i>
<i>Catamenia homochroa</i>	-	LSUMZ	B-426	Peru: Departamento de Piura, Cruz Blanca, 33 rd km SW Huancabamba	JN8104 32.1	JN810 170.1	<i>C. homochroa</i>
<i>Conirostum ferrugineiventri</i>	-	FMNH	391984	Peru: Cusco, Urubamba, Pumahuanca	-	JN810 179.1	<i>C. ferrugineiv entri</i>
<i>Conirostrum cinereum</i>	-	LSUMZ	B-8300	Peru: Pasco, Millpo, E Tambo de Vacas on Pozuzo-Chaglla trail	JN8104 39.1	-	<i>C.cinereu m</i>
<i>Diuca speculifera</i>	-	LSUMZ	B-22574	Bolívia: La Paz, Valle Zongo	JN8104 60.1	JN810 193.1	<i>D. speculifer a</i>
<i>Diglossa lafresnayii</i>	-	LSUMZ	351	Peru: Cajamarca, Cerro Chinguela, 5 km NE Sapalache	-	JN810 191.1	<i>D.lafresn ayii</i>
<i>Haplospiza rustica</i>	-	FMNH	433797	Peru: Cusco, Paucartambo, La Esperanza, 39 km NE Paucartambo	-	JN810 201.1	<i>H. rustica</i>
<i>Haplospiza unicolor</i>	-	FMNH	5186 e 395452	Brasil: São Paulo (local de depósito do material)	EF5298 58.1	JN810 202.1	<i>H. unicolor</i>
<i>Idiopsar brachyurus</i>	-	LSUMZ	B-22571	Bolívia: La Paz, Valle Zongo	EU6479 50.1	JN810 210.1	<i>I. brachyur us</i>
<i>Melanodera melanodera</i>	-	MACN	209	Argentina (local de depósito desconhecido)	-	JN417 980.1	<i>M. melanode ra</i>

<i>Melanodera xanthogramma</i>	-	AMNH	DOT121 15	Argentina: Departamento de Bariloche, Rio Negro	EU6479 52.1	-	<i>M. xanthogramma</i>
<i>Nesospiza acunhae</i>	-	ITU	35	Reino Unido: Inaccessible Island, Tristan da Cunha	JN8104 82.1	-	<i>N. acunhae</i>
<i>Phrygilus dorsalis</i>	-	MBM	6476	Argentina: Tucuman (local de depósito do material)	EF5298 69.1	-	<i>P. dorsalis</i> ¹
<i>Phrygilus dorsalis</i>	-	LSUMZ	B-17176	Argentina: Tucuman (local de depósito do material)	-	JN810 230.1	<i>P. dorsalis</i> ²
<i>Phrygilus gayi</i>	-	MBM	6475	Argentina: Tucuman, Amaicha del Valle 12 km S, 12 km E	JN8104 90.1	JN810 233.1	<i>P. gayi</i>
<i>Phrygilus plebejus</i>	-	MBM	5310	Argentina: Jujuy (local de depósito do material)	EF5298 69.1	-	<i>P. plebejus</i>
<i>Phrygilus unicolor</i>	-	MBM	6471	Argentina: Tucuman (local de depósito do material)	EF5298 66.1	-	<i>P. unicolor</i>
<i>Phrygilus unicolor</i>	-	LSUMZ	B-61444	Argentina: Tucuman (local de depósito do material)	-	JN417 961.1	<i>P. unicolor</i>
<i>Rowettia goughensis</i>	-	LSUMZ	B-33437	Reino Unido: Gough Island	JN8105 09.1	JN810 249.1	<i>R. goughensis</i>
<i>Xenodacnis parina</i>	-	LSUMZ	B-7760	Equador: Azuay, 1 km W CJS NCNL de recreação, perto MGR	EU6479 60.1	JN810 291.1	<i>X. parina</i>

MUZUSP = Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; **LabGenBio-UnB** = Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília; **LSUMZ** = Museu de Ciências Naturais da Universidade de Louisiana; **MPEG** = Museu Paraense Emilio Goeldi; **MACN** = Museu de Ciências Naturais Bernadino Rivadavia; **ZMUC** = Museu de Zoologia da Universidade de Copenhagen; **NHMK** = Museu de História Natural da Universidade do Kansas; **AMNH** = Museu Americano de História Natural; **FMNH** = Museu Field de História Natural; **MBM** = Museu de História Natural Barrick, Universidade Las Vegas, Nevada; **UWBM** = Museu Burke da Universidade de Washington.

Anexo II. Descrição das amostras da espécie *Sicalis flaveola* usados para reconstrução das relações filogeográficas. Táxon; N° = número no mapa de localidades de coleta; Fonte; Vouchers; localidade; sequências usadas na matriz de DNA mitocondrial (**ND2**), na matriz de DNA nuclear (**FIB5**).

Táxon	N°	Fonte	Voucher	Localidade	GenBank	
					ND2	FIB5
<i>Sicalis flaveola</i>	1	LZUMZ	B-66629	Peru: Rio Bocapan Drainage, Departamento de Tumbes	-	Ha1
	2	LZUMZ	B-5248	Peru: La Pampas, próximo a Olmos, Departamento de Lambayeque	-	Ha1
	3	LZUMZ	B-1493	Bolívia: Departamento de Santa Cruz, Província de Andrés Banez	-	Ha4
<i>Sicalis flaveola flaveola</i>	4	MUZUSP	79130	Brasil: Pacaráima, Roraima	-	Ha1
	4	MUZUSP	79131	Brasil: Pacaráima, Roraima	Ha15	Ha1
	4	MUZUSP	79132	Brasil: Pacaráima, Roraima	Ha15	Ha1
	4	MUZUSP	79133	Brasil: Pacaráima, Roraima	Ha15	Ha1
	4	MUZUSP	79134	Brasil: Pacaráima, Roraima	Ha23	Ha1
	4	MUZUSP	79135	Brasil: Pacaráima, Roraima	Ha17	Ha1
	5	LabGenBio-UnB	UFG1408	Venezuela	Ha14	Ha1
5	LabGenBio-UnB	UFG1410	Venezuela	-	Ha1	

	5	LabGenBio-UnB	UFG1412	Venezuela		Ha15	Ha1
	5	LabGenBio-UnB	UFG1413	Venezuela		Ha15	Ha1
	5	LabGenBio-UnB	UFG1414	Venezuela		Ha16	Ha1
	5	LabGenBio-UnB	UFG1428	Venezuela		Ha17	-
<i>Sicalis flaveola valida</i>	6	MUZUSP	82789	Cativeiro		Ha16	-
	6	MUZUSP	82790	Cativeiro		-	Ha1
	6	MUZUSP	82791	Cativeiro		Ha16	Ha1
	6	MUZUSP	82792	Cativeiro		Ha16	Ha1
	6	MUZUSP	82793	Cativeiro		-	Ha1
	6	MUZUSP	82796	Cativeiro		Ha16	-
	6	MUZUSP	82797	Cativeiro		Ha16	Ha1
	6	CETAS/GO	UFG3344	Peru: Provável, apreensão em Caçu, Goiás		Ha16	Ha1
	6	CETAS/GO	UFG3348	Peru: Provável, apreensão em Caçu, Goiás		Ha16	Ha1
<i>Sicalis flaveola koenigi</i>	7	MACN	345	Argentina: Calle Quitupi, Los Perales, Jujuy		Ha18	Ha1
	7	MACN	346	Argentina: Calle Quitupi, Los Perales, Jujuy		-	Ha1
	7	MACN	347	Argentina: Calle Quitupi, Los Perales, Jujuy		Ha19	Ha1
<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	8	LabGenBio-UnB	UFG233	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás		Ha2	Ha1

8	LabGenBio-UnB	UFG234	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha1	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG235	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha5	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG236	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	-	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG237	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha7	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG241	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	-	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG244	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha1	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG261	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha1	-
8	LabGenBio-UnB	UFG262	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha8	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG263	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	-	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG264	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha2	-
8	LabGenBio-UnB	UFG265	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha3	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG266	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha2	Ha1
8	LabGenBio-UnB	UFG267	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	-	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG421	Brasil: Fazenda Samambaia, Aurilândia, Goiás	Ha9	Ha2
9	LabGenBio-UnB	UFG441	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	Ha9	Ha1

9	LabGenBio-UnB	UFG462	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	-	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG464	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	-	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG474	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	-	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG463	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	Ha4	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG422	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	-	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG460	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	Ha9	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG461	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	Ha9	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG484	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	Ha10	-
9	LabGenBio-UnB	UFG486	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	-	Ha2
9	LabGenBio-UnB	UFG487	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	Ha12	Ha1
9	LabGenBio-UnB	UFG488	Brasil: Fazenda Morro Branco, Guarani de Goiás, Goiás	Ha11	-
10	LabGenBio-UnB	UFG2758	Brasil: Parque Nacional Serra da Canastra, Minas Gerais	-	Ha1
10	LabGenBio-UnB	UFG2759	Brasil: Parque Nacional Serra da Canastra, Minas Gerais	Ha13	Ha2
11	LabGenBio-UnB	UFG3526	Brasil: Ilha Rasa, Paraná	Ha18	-
12	CETAS/GO	UFG3396	Brasil: Itumbiara, Goiás	Ha24	Ha1

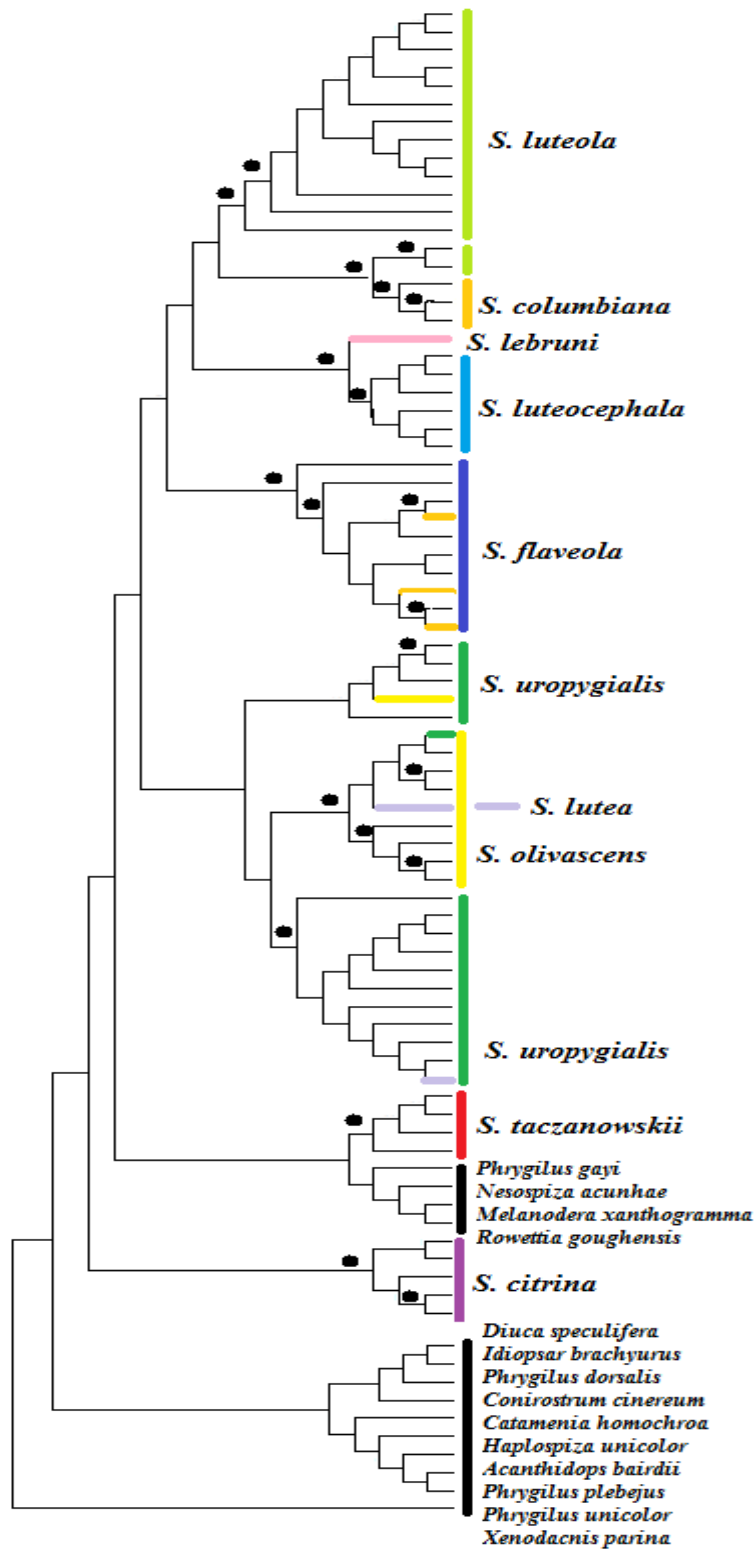
	13	MUZUSP	81106	Brasil: Estação Ecológica de Bananal, São Paulo	Ha1	Ha1
	14	MACN	6962	Argentina: CIAR, Oberá, Província de Misiones	Ha6	Ha1
<i>Sicalis flaveola pelzelni</i>	15	MUZUSP	80852	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	Ha17	Ha1
	15	MUZUSP	80853	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	Ha16	Ha1
	15	MUZUSP	80854	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	Ha16	Ha1
	15	MUZUSP	80855	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	-	Ha1
	15	MUZUSP	80857	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	Ha16	Ha1
	15	MUZUSP	80859	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	Ha20	Ha1
	15	MUZUSP	80860	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	-	Ha1
	15	MUZUSP	80861	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	Ha16	Ha1
	15	MUZUSP	80862	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	-	Ha1
	15	MUZUSP	80863	Brasil: Corumbá, Mato Grosso do Sul	-	Ha1
	16	AMNH	DOT2251	Bolívia: Estancia San Julian, Departamento Santa Cruz, Província Cordillera	-	Ha1
	16	AMNH	DOT6130	Bolívia: Estancia San Julian, Departamento Santa Cruz, Província Cordillera	-	Ha1
	17	AMNH	DOT13470	Argentina: Departamento Pilcaniyeu, Província Rio Negro	-	Ha1
	17	MACN	634	Argentina: Neneu Ruca, Pilcaniyeu, Rio Negro	-	Ha1
	18	AMNH	DOT10427	Argentina: Neuquem, Departamento Confluencia, Centenario	Ha22	Ha1

	18	AMNH	DOT10428	Argentina: Neuquem, Departamento Confluencia, Centenario	Ha21	Ha3
	19	MACN	1442	Argentina: EBCO, Província de Corrientes	Ha21	Ha1
	19	UWBM	70184	Argentina: Provincia de Corrientes	JN810520.1	-
	20	MACN	3230	Argentina: Parque Nacional Pilcomayo, Estero "Poi", Província de Formosa	-	Ha1
	21	MACN	6154	Argentina: La Para, Rio Primero, Província de Córdoba	Ha18	Ha1
<i>Sicalis columbiana</i>	22	MUZUSP	83717	Brasil: Almeirim, Pará	Ha26	Ha1
	22	MUZUSP	88296	Brasil: Fazenda Fartura, Santana do Araguaia, Pará	Ha18	-
	22	MUZUSP	90295	Brasil: Fazenda Fartura, Santana do Araguaia, Pará	Ha27	Ha5
	22	MUZUSP	90296	Brasil: Fazenda Fartura, Santana do Araguaia, Pará	-	Ha6

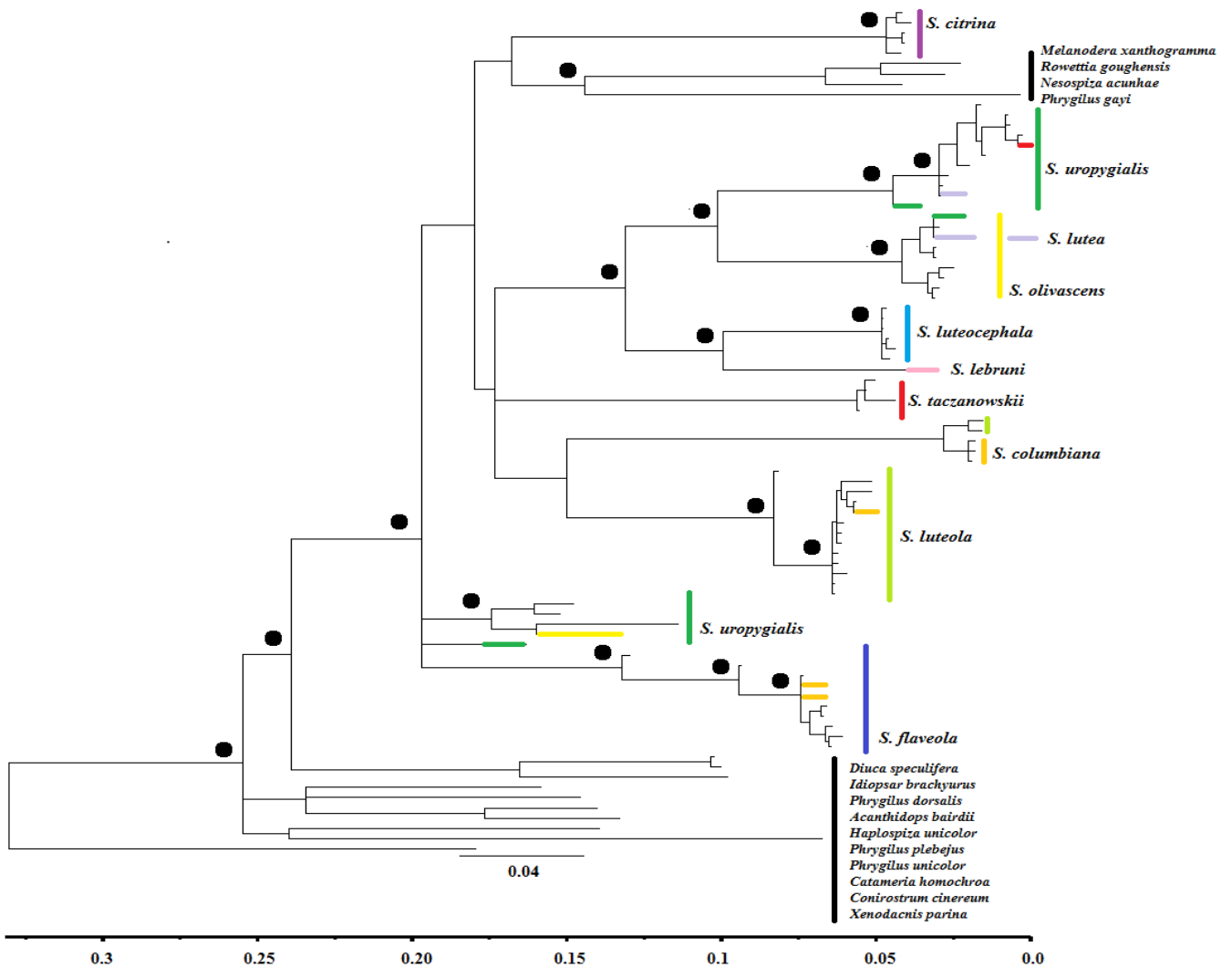
MUZUSP = Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; **MACN** = Museu de Ciências Naturais Bernardino Rivadavia; **LabGenBio-UnB** = Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília; **LSUMZ** = Museu de Ciências Naturais da Universidade de Louisiana; **AMNH** = Museu Americano de Historia Natural; **UWBM** = Museu Burke da Universidade de Washington; **CETAS/GO** = Centro de Triagem de Animais Silvestres de Goiás (IBAMA).

Anexo III. Relação de primers utilizados.

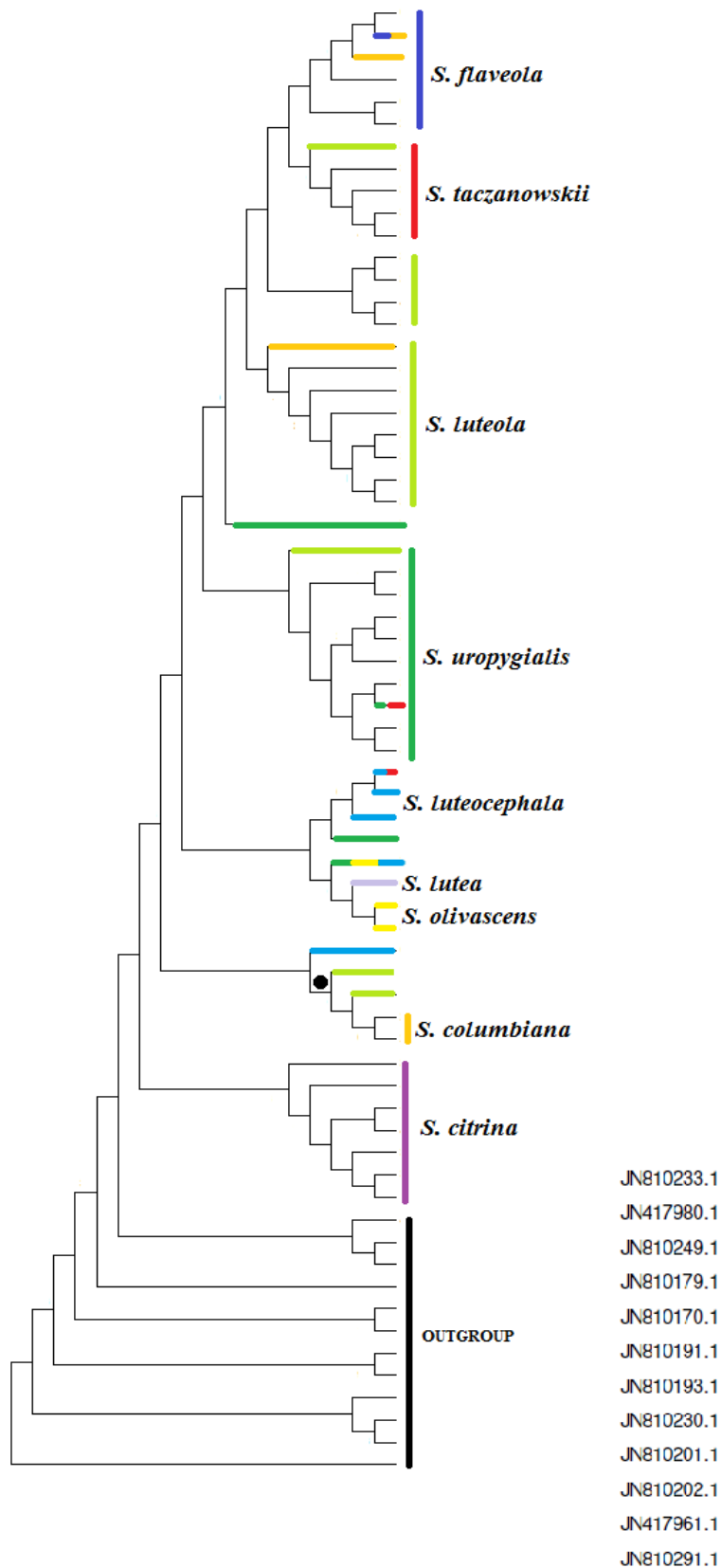
Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Referência
ND2	LMET	GGCCATACCCCGAAAATGA	Sorenson et al., 1999
ND2	H6313	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	Sorenson et al., 1999
ND2	L5758	GGNGGNTGAATRGGNYTNAAYCARAC	Sorenson et al., 1999
ND2	H5766	RGAKGAGAARGCYAGGATYTTKCG	Sorenson et al., 1999
→-fibrinogênio	FIB 5	CGCCATACAGAGTATACTGTGACAT	Bowie & Fjeldsa, 2005
→-fibrinogênio	FIB 6	GCCATCCTGGCGATTCTGAA	Bowie & Fjeldsa, 2005



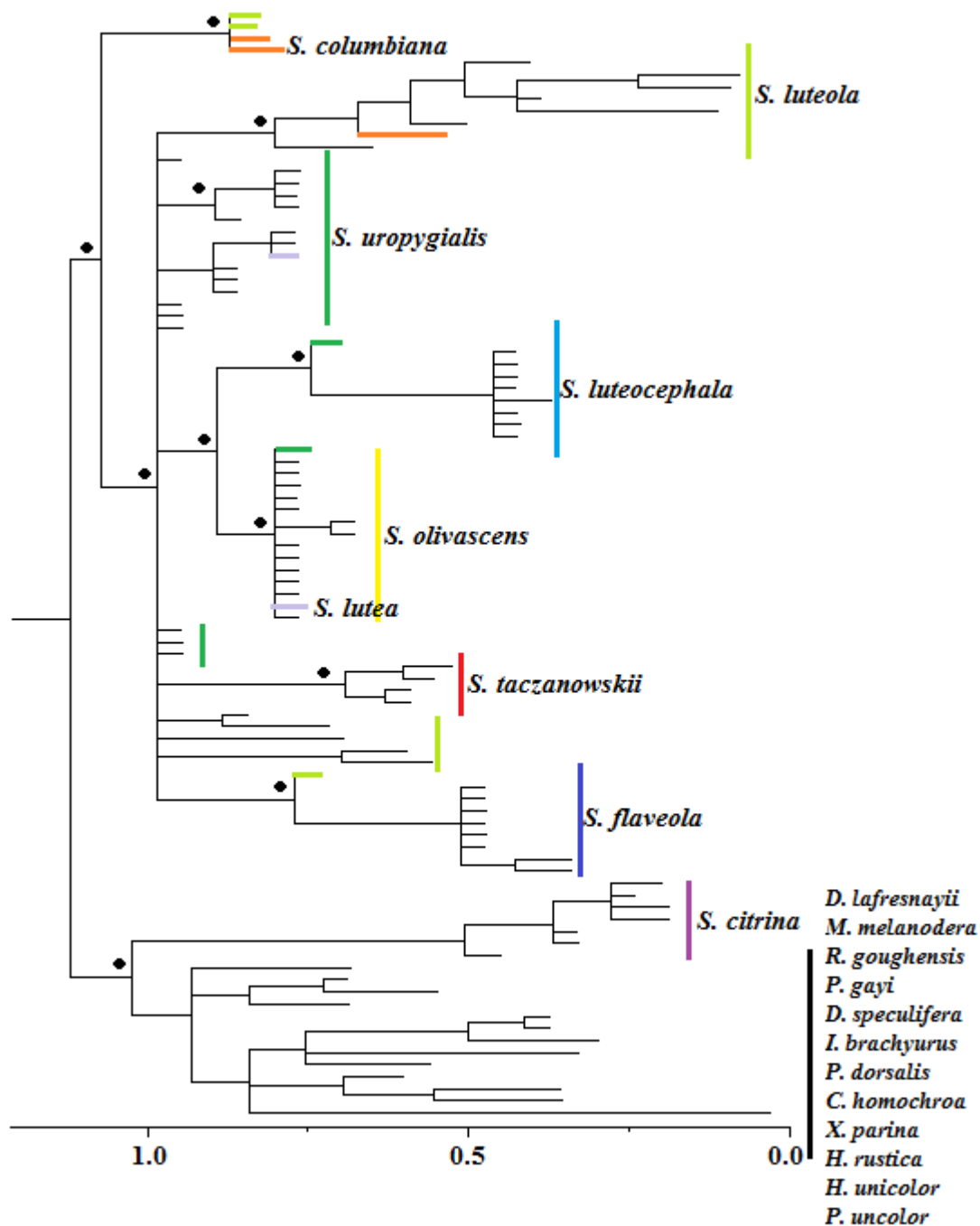
Anexo IV. Reconstrução filogenética para as diferentes espécies do gênero *Sicalis* obtida pelo método de máxima verossimilhança para o gene mitocondrial. Os valores de bootstrap superiores a 90% são indicados no cladograma por um círculo.



Anexo V. Reconstrução filogenética para as diferentes espécies do gênero *Sicalis* obtida por Inferência Bayesiana do gene mitocondrial. Os valores de probabilidade posterior superiores a 90% são indicados no cladograma por um círculo.



Anexo VI. Reconstrução filogenética para as diferentes espécies do gênero *Sicalis* obtida pelo método de máxima verossimilhança para o gene nuclear. Os valores de bootstrap superiores a 90% são indicados no cladograma por um círculo.



Anexo VII. Reconstrução filogenética para as diferentes espécies do gênero *Sicalis* obtida por Inferência Bayesiana do gene nuclear. Os valores de probabilidade posterior superiores a 90% são indicados no cladograma por um círculo.



Anexo VIII. Reconstrução filogenética para as diferentes espécies do gênero *Sicalis* obtida por Máxima Verossimilhança do gene mitocondrial e nuclear concatenados. Os valores de probabilidade posterior superiores a 90% são indicados no cladograma por um círculo.