

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

CESAR AUGUSTO BRONZATTO MEDOLAGO

DESCRIÇÃO DE UMA ZONA HÍBRIDA E MECANISMOS DE ISOLAMENTO  
REPRODUTIVO ENTRE DUAS ESPÉCIES DE CABOCLINHOS (*SPOROPHILA  
PILEATA* E *S. BOUVREUIL*) (AVES: PASSERIFORMES) E SUAS IMPLICAÇÕES PARA  
CONSERVAÇÃO

São Carlos, SP

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

CESAR AUGUSTO BRONZATTO MEDOLAGO

DESCRIÇÃO DE UMA ZONA HÍBRIDA E MECANISMOS DE ISOLAMENTO  
REPRODUTIVO ENTRE DUAS ESPÉCIES DE CABOCLINHOS (*SPOROPHILA  
PILEATA* E *S. BOUVREUIL*) (AVES: PASSERIFORMES) E SUAS IMPLICAÇÕES PARA  
CONSERVAÇÃO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Ecologia e Recursos naturais do Centro  
de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade  
Federal de São Carlos, como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências (Ciências Biológicas)

Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco

São Carlos, SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Cesar Augusto Bronzatto Medolago, realizada em 13/09/2018:

Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco  
UFSCar

Prof. Dr. Manoel Martins Dias Filho  
UFSCar

Prof. Dr. Augusto João Piratelli  
UFSCar

Prof. Dr. Luis Fábio Silveira  
USP

Prof. Dr. José Maurício Barbentí Duarte  
UNESP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, aos meus pais, Natalino e Norma, por nunca terem medido esforços para me ajudar a buscar meus objetivos;

À minha esposa, Alexsandra, por todo amor, conselhos e paciência em todos os momentos durante essa caminhada. Seria impossível a realização desse sonho sem você;

Ao meu irmão, Lucas, por todo o companheirismo, inclusive enfrentando horas e horas de sol do Cerrado para me ajudar;

A minha, Natália, por toda amizade, conselhos e por ser um espelho para minha vida;

Ao meu orientador, Mercival, por ter acreditado em meu potencial, por todas as conversas, ideias, ensinamentos e conselhos, sem os quais esse trabalho não teria acontecido e por ter me concedido o privilégio de ser seu primeiro aluno de doutorado;

À amiga, companheira de milhares de horas de brejo e laboratório, Mariellen, por todo conhecimento compartilhado durante esse período;

Ao amigo Flávio Ubaid, por ter me apresentado o mundo da ornitologia e por todas as oportunidades dadas a mim em todos esses anos;

Aos meus amigos-irmãos Thiago (Uruta) e Lucas, pela amizade de anos e parceria nas jornadas a campo;

Ao amigo Adriano por todo apoio e amizade que sempre me deu em Sorocaba;

Aos amigos Fernando (Codorna) e Marcelo (Cabeça), pelas estadias em São Carlos e pelas conversas e risadas;

A todos os professores do PPGERN, pelos conhecimentos passados nas disciplinas do programa;

A todos os amigos que fiz no PPGERN, Mario, Toni e Raphael (ET);

Ao PPGERN, por todo apoio logístico;

À Raizen - Radar, pela autorização para realização de pesquisas em suas áreas em Santa Bárbara d'Oeste;

À Comissão Técnico-Científica - COTEC da Fundação Florestal do Estado de São Paulo, pela concessão de autorização para os trabalhos de campo nas unidades de conservação estaduais;

Ao CEMAVE e SISBIO pela concessão das licenças para a captura e marcação das aves;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ, pelo auxílio financeiro, através da concessão de bolsa e taxa de bancada, durante todo o período de doutoramento.

## RESUMO

A hibridização é muitas vezes um processo natural que desempenha um importante papel na história evolutiva de muitas espécies. Por outro lado, pode ser causada por modificações ambientais, decorrente das atividades humanas, tendo efeitos prejudiciais para as espécies envolvidas, levando a perda de biodiversidade. Vários mecanismos podem atuar dentro de uma zona híbrida, mantendo-a estável, evitando, assim, que haja homogeneização dos taxa parentais e por consequência, o desaparecimento de uma de um deles ou de ambos. Entender quais desses mecanismos atuam nas zonas híbridas contribui com o conhecimento da história evolutiva e fornece subsídios para traçar planos de conservação eficazes. Vários trabalhos têm estudado zonas híbridas em aves, porém poucos acessam diretamente os ninhos e as relações entre os indivíduos adultos. As aves do gênero *Sporophila* formam um grupo de interesse conservacionista devido a alto número de espécies ameaçadas. Os caboclinhos, são os menores representantes do gênero, formando um grupo de 12 espécies muito semelhantes na forma, tendo a sua principal diferenciação na cor da plumagem dos machos adultos. Várias espécies realizam movimentos migratórios e nidificam em sítios específicos e muitas vezes em simpatria, entretanto nunca foi confirmada a hibridização das espécies na natureza. Esse estudo descreve a primeira zona híbrida entre duas espécies de caboclinhos. Para confirmar a presença da hibridização foram estudadas três áreas no interior do Estado de São Paulo, onde foram identificadas populações reprodutivas de *S. pileata*, sendo que uma delas também é um sítio reprodutivo de *S. bouvreuil*. Foram sequenciados para o gene COI, 91 indivíduos adultos incluindo indivíduos com o fenótipo de cada espécie, fêmeas e indivíduos com plumagem intermediária. A distribuição haplotípica variou entre as áreas e na área de contato entre as espécies todos os fenótipos apresentaram ambos os haplótipos (SBO), evidenciando a hibridização. Através de marcadores de microssatélites observamos a presença de dois grupos gênicos dentro da população de SBO, com 15 indivíduos potencialmente puros para *S. bouvreuil* e 14 para *S. pileata*. Foi confirmada a paternidade dos filhotes de dois casais, cujos indivíduos eram portadores de haplótipos de DNAmT diferentes e entre indivíduos com  $q < 0,90$ , mostrando que indivíduos híbridos são férteis. Os dados mostram que existe uma zona híbrida entre as espécies de caboclinhos, que gera indivíduos híbridos férteis e apesar de não haver indivíduos com fenótipo de *S. bouvreuil* nas demais áreas, a presença de indivíduos com plumagens intermediária e haplótipo de DNAmT da espécie, indica que possa existir uma zona de introgressão gênica nas demais áreas, devido a dispersão de híbridos.

## ABSTRACT

Hybridization is often a natural process that plays an important role in the evolutionary process among many species. On the other hand, when human environmental changes cause the phenomenon, it can result in detrimental effects on the species involved, leading to biodiversity loss. Several mechanisms can shape a hybrid zone, keeping it stable, thus avoiding the homogenization of parental taxa and, consequently, the disappearance of one or them both. Understanding the mechanisms that shape the hybrid zones contributes with the knowledge of the evolutionary history and provides subsidies to draw of conservation plans. Several autors have studied hybrid zones in birds, but few have directly accessed nests and relationships between adult individuals. Birds of the genus *Sporophila* form a conservation interest group due to high number of threatened species. The “capped group” (capuchinos) consists in 12 little species of seedeaters very similar in shape, having their main differentiation in the plumage colour of the adult males. Several species migrate and nest in specific sites and often in sympatry, but the hybridization of species in nature has never been confirmed. This study describes the first hybrid zone between two species of capuchinos. To confirm the presence of hybridization, we studied three areas in State of São Paulo, with reproductive populations of *S. pileata* and one of which is also a reproductive site of *S. bouvreuil*. We sequenced 91 adult individuals for the mitochondrial gene COI including individuals with the phenotype of each species, females and individuals with intermediate plumage. The haplotypic distribution varied between the areas and in the contact area between the species all phenotypes presented both haplotypes (SBO), evidencing the hybridization. Through microsatellite markers, we observed the presence of two groups within the SBO population, with 15 potentially pure individuals for *S. bouvreuil* and 14 for *S. pileata*. We confirmed the paternity of offspring of two couples, whose individuals had different mtDNA haplotypes and among individuals with  $q < 0.90$ , showing that hybrid individuals are fertile. Our data confirms the hybrid zone between the the capuchinos and the fertile of hybrid individuals. Although there are no individuals with *S. bouvreuil* phenotype in the other areas, the presence of individuals with intermediate plumages and mtDNA haplotype of the species indicates an area of gene introgression in the other areas, due to the dispersion of hybrids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Localização das áreas de amostragem no estado de São Paulo. ....	29
<b>Figura 2:</b> A) Áreas marginais de um dos lagos presentes em SBO, com abundância de <i>Andropogon bicornis</i> e B) vista geral do lago com abundante vegetação emergente e a área de reflorestamento, ao fundo. ....	30
<b>Figura 3:</b> Vista geral dos campos presentes na EEI. ....	31
<b>Figura 4:</b> Áreas amostradas no município de São Manuel, com a vegetação em estágio inicial de regeneração e presença de gramíneas exóticas. ....	32
<b>Figura 5:</b> Método de captura com rede ornitológica, montada no território reprodutivo de um dos casais (Foto: Junior Esteves). ....	33
<b>Figura 6:</b> A) Método de retirada de sangue de um indivíduo fêmea, através de corte na unha; B) Armazenamento das amostras em tubo de 1,5 ml. ....	34
<b>Figura 7:</b> Indivíduos capturados e anilhados durante os trabalhos de campo do presente estudo: A) macho com fenótipo de <i>S. bouvreuil</i> ; B) macho com fenótipo de <i>S. pileata</i> ; C) fêmea; D) filhote aos 7 dias depois de deixar o ninho. ....	41
<b>Figura 8:</b> Ninhos com ovos e ninhegos encontrados em SBO. ....	42
<b>Figura 9:</b> Árvore resultante da análise filogenética bayesiana, baseada em 633 pb do gene COI-1. Os números indicam os valores de bootstrap de suporte de cada nó. <i>S. pileata</i> indica os indivíduos machos com fenótipo da espécie, <i>S. pileata*</i> indica os indivíduos machos com plumagem clara, mas com presença de penas de coloração rosa ou avermelhadas e <i>S. bouvreuil</i> indica os indivíduos machos com fenótipo desta espécie. ....	46
<b>Figura 10:</b> Gradiente de coloração da plumagem em indivíduos machos com plumagem reprodutiva que foram identificados com DNAmT de <i>S. pileata</i> . ....	47
<b>Figura 11:</b> Gradiente de coloração da plumagem em indivíduos machos com plumagem reprodutiva que foram identificados com DNAmT de <i>S. bouvreuil</i> . ....	48
<b>Figura 12:</b> Mapa com a proporção de ocorrência dos haplótipos de DNAmT de <i>S. pileata</i> (em amarelo) e de <i>S. bouvreuil</i> (em preto) nas três áreas estudadas incluindo machos em plumagem definitiva, machos em plumagem de eclipse e fêmeas. ....	50
<b>Figura 13:</b> Gráfico de saída do software STRUCTURE assumindo-se a presença de dois conjuntos gênicos para a população SBO. As cores indicam a proporção genética que cada indivíduo possui de cada um dos grupos. A cor vermelha representa <i>S. pileata</i> e a verde representa <i>S. bouvreuil</i> . ....	51
<b>Figura 14:</b> Fenótipos, haplótipos de DNAmT (P: <i>S. pileata</i> ; B: <i>S. bouvreuil</i> ) e o valor de q para os indivíduos machos adultos com plumagem reprodutiva da área SBO. A coloração vermelha representa <i>S. pileata</i> e a verde <i>S. bouvreuil</i> . ....	52
<b>Figura 15:</b> Gráficos de saída do software STRUCTURE indicando a proporção genética dos 50 indivíduos híbridos simulados quando comparados com os indivíduos potencialmente puros da população de SBO. a) F1; b) F2; c) Retrohíbrido com Grupo A; d) Retrohíbrido com Grupo B. ....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Primers utilizados para as reações de amplificação do gene mitocondrial COI 1, retirados de Kerret al. 2009. ....	35
<b>Tabela 2:</b> Descrição e caracterização de <i>loci</i> de microssatélites isolados de <i>S. maximiliani</i> e transferidos para <i>S. pileata</i> (23 animais de SM). <i>Motifs</i> , sequências dos <i>primers</i> , temperatura de <i>annealing</i> (TA), número de alelos (NA), variação de tamanho dos alelos em pares de bases (pb), heterozigose observada ( $H_e$ ) e esperadas ( $H_o$ ) e probabilidade de déficits heterozigotos (P). O valor P corrigido após a correção de Bonferroni foi 0,006. ....	43
<b>Tabela 3:</b> Caracterização dos <i>loci</i> microssatélites para cada uma das populações estudadas. <i>Loci</i> , número de alelos (NA), heterozigose esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ) e probabilidade de déficits heterozigotos (P). O valor P corrigido após a correção de Bonferroni é 0,006. ....	44
<b>Tabela 4:</b> Análises Bayesianas de microssatélites com 50 genótipos simulados de cada classe híbrida, indicando os percentuais de indivíduos simulados corretamente designados como potencialmente híbridos, para os diferentes níveis de corte. Retro A representa retrocruzamentos dos híbridos F1 simulados com animais potencialmente puros de <i>S. boubreuil</i> e Retro B com <i>S. pileata</i> . ....	54
<b>Tabela 5:</b> Machos e fêmeas de cada casal, seus respectivos haplótipos mitocondriais (B = boubreuil e P = pileata) e valores de q para cada grupo de possíveis puros. Ninhegos de cada casal e sua relação com o Macho e Fêmea: PO (Parent-offspring); FS (Full-sib), HS (Half-sib) e U (unrelated). ....	55
<b>Tabela 6:</b> Valores $F_{ST}$ , $\Phi_{ST}$ e de $p$ entre as áreas estudadas, obtidos através da utilização os marcadores de microssatélites e de frequências haplotípicas de DNAm <sub>t</sub> , respectivamente. As áreas de estudo são Santa Bárbara d'Oeste (SOB), Estação Ecológica de Itirapina (EEI) e São Manuel (SM). Os valores entre parênteses representam a distância em quilômetros entre as áreas. ....	56

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Alelos encontrados em cada loci, em cada área estudada. Os alelos exclusivos para cada área encontram-se destacados em negrito. ....	85
<b>Anexo 2:</b> Haplótipos identificados para o gene mitocondrial COI-1 e número de indivíduos identificados com cada haplótipo (n). Os números verticais indicam a posição das bases nas sequências de <i>S. pileata</i> e <i>S. bouvreuil</i> depositadas no GENBANK (GU070596; KF316366). ....	86
<b>Anexo 3:</b> Tabela de saída do programa STRUCTURE com os valores de q (inferred clusters) para cada amostra (labels), em cada uma de três corridas para os indivíduos da população de SOB, excluindo-se os ninhegos, utilizando-se K=2. ....	88
<b>Anexo 4:</b> Alelos encontrados em cada loci, para cada grupo identificado como possíveis híbridos através do programa STRUCTURE. Os alelos exclusivos encontram-se destacados em negrito. ....	90
<b>Anexo 5:</b> Dados genotípicos de microssatélites para oito famílias analisados através do método de observação direta (Fleischer 1996). Alelos discordantes entre filhotes e os dois os pais estão em negrito. ....	91

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1. Zonas híbridas e mecanismos de isolamento de espécies</b> .....	12
<b>1.2. Aves do gênero <i>Sporophila</i> (Passeriformes, Sporophilinae)</b> .....	17
<b>1.3. O grupo dos caboclinhos</b> .....	20
<b>1.4. O Caboclinho Branco, <i>S. pileata</i>, e o Caboclinho, <i>S. bouvreuil</i></b> .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>4. DESENHOS EXPERIMENTAIS</b> .....	27
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
<b>5.1. Áreas de estudo</b> .....	29
<b>5.2. Coleta de dados e obtenção das amostras</b> .....	32
5.2.1 <i>Localização dos ninhos</i> .....	32
5.2.2 <i>Captura das aves</i> .....	32
5.2.3 <i>Procedimento de coleta do sangue e extração do DNA</i> .....	34
<b>5.3. Análises moleculares</b> .....	34
5.3.1 <i>DNA mitocondrial</i> .....	34
5.3.1.1 <i>Procedimentos laboratoriais</i> .....	35
5.3.1.2 <i>Análise dos dados</i> .....	36
5.3.2 <i>Isolamento e caracterização dos marcadores de microssatélites</i> .....	37
5.3.3 <i>Testes de paternidade</i> .....	39
5.3.4 <i>Estruturação populacional</i> .....	39
5.3.5 <i>Identificação de níveis de hibridização dos indivíduos</i> .....	39
<b>6. RESULTADOS</b> .....	41
<b>6.1. Obtenção das amostras</b> .....	41
<b>6.2. Isolamento dos microssatélites e transferibilidade dos <i>loci</i></b> .....	42
<b>6.3. Caracterização genética das populações estudadas</b> .....	43
<b>6.4. Identificação de híbridos</b> .....	44
<b>6.5. Testes de paternidade</b> .....	54
<b>6.6. Estruturação populacional</b> .....	56
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>7.1. Identificação da hibridização</b> .....	57
<b>7.2. Mecanismos de contenção da zona de hibridização</b> .....	58
<b>7.3. Importância de estudos de zonas híbridas e implicações para conservação</b> .....	63

<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Zonas híbridas e mecanismos de isolamento de espécies

Uma das questões mais importantes e mais basais nas pesquisas que abordam a evolução é entender as forças motrizes que promovem e mantêm a diversificação das espécies (Mayr 1942). O isolamento geográfico causado por eventos geológicos ou flutuações climáticas (refúgios) é tradicionalmente considerado um pré-requisito para a divergência genética e ecológica, devido à completa interrupção do fluxo gênico entre as populações e divergências genéticas que surgem via mutações e adaptações locais (Mayr 1942, Coyne e Orr 2004). No entanto, quando essas barreiras físicas são quebradas, colocando-as novamente em contato, outros mecanismos de isolamento podem agir, evitando a homogeneização e, conseqüentemente, mantendo o processo de especiação (Coyne e Orr 2004).

O isolamento reprodutivo pode englobar processos pré- e pós-copulatórios. Os mecanismos de isolamento pré-copulatórios incluem o reconhecimento de padrões de coloração e de comportamentos reprodutivos, como os *displays* de cortejo ou vocalizações (Coyne e Orr 2004, Price 2007). As barreiras pós-copulatórias são subdivididas em pré-zigóticas, que incluem incompatibilidades fisiológicas e morfológicas entre o espermatozoide e a morfologia do trato reprodutivo feminino ou incapacidade de reconhecimento entre gametas, e pós-zigóticas, que incluem a inviabilidade ou esterilidade dos híbridos (Birkhead e Brillard 2007, Zhao 2018).

Quando os mecanismos pré-copulatórios e pré-zigóticos são superados, as zonas híbridas aparecem. A hibridização e a introgressão gênica desafiam o conceito biológico tradicional de espécies, e foram subestimadas ao longo dos anos, muitas vezes tratadas como eventos isolados relacionados a mudanças na distribuição das espécies e a perturbações

ambientais (Mallet 2005). Uma vez tratada como um "engano reprodutivo", evidências empíricas mais recentes indicam que a hibridização é um processo natural que ocorre em diversos grupos taxonômicos e pode ser uma força importante na trajetória evolutiva e na especiação (Grant e Grant 1992, Mallett 2005, Lamichhaney et al. 2018).

A hibridização pode ser caracterizada pela ocorrência de cruzamentos esporádicos entre espécies simpátricas ou pela formação de zonas de sobreposição estreitas envolvendo espécies parapátricas, o que pode resultar em um intenso processo de miscigenação entre as populações parentais e até mesmo no surgimento de novos táxons (Harrison 1993, Bronson et al. 2003, Mavarez e Linares 2008, Abbott et al. 2013, Schumer et al 2014, Lamichhaney et al. 2018). Neste contexto, é importante investigar os parâmetros que envolvem a origem de uma zona híbrida, os processos responsáveis por sua manutenção e suas implicações nas populações das espécies parentais (Harrison, 1993). Isto tem implicações conservacionistas, já que essas zonas de contato podem surgir naturalmente, fazendo parte da história evolutiva das espécies, ou podem ser consequências dos distúrbios antrópicos, levando ao risco a integridade genética das espécies envolvidas (Arnold 1992, Allendorf et al. 2001).

Dependendo da distância genética entre as espécies parentais, haverá diferentes categorias de híbridos (Mallet 2005). Se os híbridos forem estéreis, haverá apenas indivíduos híbridos F1 sem consequências genéticas para as espécies envolvidas. Por outro lado, a produção de híbridos férteis permite os cruzamentos entre as diferentes categorias de híbridos e também os retrocruzamentos com uma ou ambas as espécies parentais, permitindo a introgressão de características genéticas de uma população parental para a outra (Harrison 1993, Jiggins e Mallet 2000, Allendorf et al. 2001, Walsh et al. 2016a).

Associada às condições locais, a produção de híbridos férteis pode tornar uma população composta apenas de indivíduos com algum grau de hibridização após poucas gerações. Esta

condição pode levar à completa homogeneização das duas espécies se a população híbrida se expandir, ou ao desaparecimento de uma das espécies-mãe, dependendo da direção e intensidade da introgressão (Arnold 1993, Harrison 1993, Allendorf et al., 2001). Em alguns casos, como nos tentilhões de Darwin, os híbridos podem mostrar mais aptidão para explorar certos nichos, resultando no surgimento de novos táxons (Grant et al 2003, Lamichhaney et al. 2018).

Por outro lado, as zonas híbridas podem permanecer estáveis e restritas a faixas estreitas, sem afetar profundamente as espécies parentais, sendo controladas por dois processos seletivos principais. Os fatores denominados de intrínsecos refletem na inviabilidade ou esterilidade dos híbridos ou na deterioração dos F2 ou retrohíbridos (Barton e Hewitt, 1985, 1989; Barton e Gale, 1993). Bronson et al. (2003) concluíram que os híbridos F1 entre as aves *Dendroica occidentalis* e *D. townsendi* são viáveis e férteis, porém os F2 e os retrocruzamentos apresentam um aumento nas taxas de mortalidade e esterilidade. Outro exemplo é a zona híbrida entre *Pheucticus melanocephalus* e *P. ludovicianus*, no estado de Dakota do Sul, EUA (Anderson e Daugherty 1974, Kroodsma 1974, Mettler e Spellman 2009). Dados morfológicos e moleculares indicam que há uma redução da aptidão de fêmeas híbridas, concordando com a Regra de Haldane, que espera que o sexo heterogâmico (fêmeas, nas aves) sofra maior inviabilidade ou esterilidade do que o sexo homogamético, devido às incompatibilidades deletérias de alelos em genes dos cromossomos sexuais (Haldane 1922, Turelli e Begun 1997). Outro caso onde a menor viabilidade de fêmeas híbridas F1 moldam a dinâmica de uma zona híbrida é observado na zona de contato entre *Ammodramus caudacutus* e *A. nelsoni* (Walsh et al. 2016b), uma vez que a proporção de indivíduos fêmeas F1/F2 foi 2,3 vezes maior em filhotes em comparação com indivíduos adultos.

De acordo com o modelo de superioridade híbrida delimitada, ou processos extrínsecos (Moore 1977, Moore e Price 1993), a zona híbrida pode ser localizada em um ecótono, onde os

híbridos têm mais aptidão em ambientes heterogêneos do que os parentais e são desvantajosos fora dessas áreas. Por outro lado, a hipótese do gradiente ecológico prevê que as zonas híbridas ocorram em áreas ecologicamente transitórias que representam gradientes ambientais, mas os híbridos teriam uma aptidão reduzida em comparação com os pais (Endler 1977). Além dos fatores abióticos, o processo extrínseco pode incluir interações sociais. No caso da zona híbrida entre *Dendroica occidentalis* e *D. townsendi* no Noroeste do Pacífico (EUA), a superioridade agressiva da *D. townsendi* parece ser uma influência primária na zona de hibridização (Rohwer e Wood 1998, Pearson 2000, Pearson e Manuwal 2000, Pearson e Rohwer 2000, Rohwer et al. 2001). Alternativamente, em uma das zonas híbridas entre *Poecile atricapilla* e *P. carolinensis*, os fatores geográficos e temporais podem atuar reduzindo o fluxo gênico entre duas espécies em zonas de contato (Davidson et al. 2013).

Outro fator que pode influenciar a aptidão de indivíduos híbridos aparece quando as espécies parentais envolvidas realizam movimentos migratórios, levando os indivíduos resultantes do cruzamento entre espécies diferentes a apresentarem deficiências nos seus movimentos, tanto na distância quanto na direção das rotas migratórias (Rohwer e Manning 1990, Helbig 1991, Ruegg 2007, Rohwer e Irwin 2011, Ilieva et al. 2012, Toews et al. 2017).

Estudos que estimam taxas de evolução sugerem que pressões de seleção divergentes entre populações alopátricas são mais fortes em altas latitudes do que nos trópicos (Martin et al. 2010, Weir e Weathcroft 2011, Weir et al. 2012). Características sexualmente selecionadas, como coloração de plumagem e vocalização, além de evolução de nicho, podem acelerar os isolamentos pré- e pós-zigóticos extrínsecos mais próximo dos polos, enquanto nos trópicos, a menor taxa de divergência pode retardar a taxa de isolamento reprodutivo (Lawson e Weir 2014). Além disso, mecanismos intrínsecos de isolamento pós-zigótico parecem agir mais lentamente nas aves em geral. O tempo necessário para a esterilidade completa dos híbridos F1, em passeriformes, geralmente é de cerca de cinco milhões de anos de divergência entre as

espécies parentais, mais do que o dobro do tempo médio de divergência entre espécies irmãs típicas, sugerindo que o isolamento pós-zigótico intrínseco pode ter um papel limitado no processo de especiação destes animais (Klicka e Zink 1997, Price e Bouvier 2002).

A hibridização pode ter um papel importante em vários processos evolutivos, como a transferência de características adaptativas (Arnold 2006, Arnold et al. 2009, Hedrick 2013) e a origem de novas espécies (Mavarez e Linares 2008, Abbott et al. 2013, Schumer et al. 2014, Lamichhaney et al. 2018), por outro lado, pode resultar em efeitos prejudiciais para as espécies envolvidas, levando à perda de biodiversidade, devido à extinção de uma das espécies (Rhymer e Simberloff 1996) ou a fusão das duas espécies parentais em uma (Seehausen 2006, Seehausen et al. 2008). Dito isso, a hibridização também é um tópico relevante na conservação (Allendorf et al. 2001, Brumfield 2010) e as zonas híbridas oferecem a oportunidade de identificar as características genéticas e fenotípicas que influenciam a divergência de espécies (Gompert et al. 2013).

No entanto, nos neotrópicos, os estudos envolvendo áreas de contato de diferentes espécies de aves são escassos e pouco detalhados, sendo a maior parte concentrados na região amazônica, envolvendo espécies não-migratórias e historicamente separadas por barreiras geográficas como rios (Haffer 1997, Naka et al. 2012, Harvey et al. 2014, Areta et al. 2017, Barrera-Guzmán et al. 2018, Pulido-Santacruz et al. 2018). Pulido-Santacruz et al. (2018) investigaram híbridos de duas espécies de aves florestais de sub-bosque, concluindo que as barreiras reprodutivas pós-zigóticas, impulsionadas pelo acúmulo de incompatibilidades genéticas durante longos períodos de tempo, foram responsáveis pelo amadurecimento do isolamento reprodutivo. Em um estudo com piprídeos do gênero *Lepdothrix*, Barrera-Guzmán et al. (2018) concluíram que a população do táxon *L. vilasboasi*, trata-se de uma população híbrida das duas espécies parentais propostas (*L. natterei* e *L. iris*).

Com exceção de estudos realizados no Arquipélago de Galápagos (Grant e Grant 2001, Lamichhaney et al. 2018), nenhum outro estudo na região Neotropical, visou acessar a frequência na qual se dão os cruzamentos entre as espécies ou os híbridos e se eles são eventos acidentais ou comuns dentro das populações, uma vez que não monitoraram os casais e seus ninhos devido à dificuldade desse tipo de estudo em campo (Heneberg et al. 2016, Walsh et al. 2016b, Figarski e Kajtoch 2018).

## **1.2. Aves do gênero *Sporophila* Cabanis, 1844 (Passeriformes, Sporophilinae)**

O gênero *Sporophila* (Cabanis, 1844) compreende um grupo de aves comedoras de sementes de gramíneas com ampla distribuição, desde o sul dos Estados Unidos à Argentina, habitando principalmente áreas de vegetação aberta, como pastagens e pântanos, embora algumas poucas espécies sejam florestais (Ridgely e Tudor 1989). Possuem grande dimorfismo sexual, com machos apresentando coloração marcante, variando de tons pretos, brancos, marrons, cinzas e avermelhados, enquanto as fêmeas geralmente apresentam um padrão de coloração marrom amarelada, dificultando a identificação de algumas espécies (Ridgely e Tudor 1989).

A taxonomia do gênero é complexa e nos últimos anos diversos estudos têm buscado compreender as variações individuais e geográficas do grupo (Lijtmaer et al. 2004, Areta 2008, Reppening et al. 2010, Machado e Silveira 2010, 2011, Campagna et al. 2010, 2011, 2013, 2015, 2017, Areta et al. 2011, Areta e Reppening 2011, Rensemet et al. 2013, Burns et al. 2014, Ubaid et al. 2018). Existem alguns táxons que foram descritos com base em poucos indivíduos, e para alguns autores, tratam-se de indivíduos aberrantes ou híbridos, como é o caso de *S. melanops* (Pelzeln 1870), que foi descrito a partir de um único macho encontrado nas margens do rio Araguaia, em 1823 (Ouellet 1992, Sibley e Moroe 1990). Posteriormente, Areta et al. (2016)

sugeriram que se tratava de um indivíduo de *S. ruficollis* durante o processo de transição da plumagem de eclipse para a reprodutiva e com melanismo nas penas do píleo.

Alguns estudos suportam a inclusão de *Oryzoborus* dentro de *Sporophila* (Burns et al. 2002, Lijtmaer et al. 2004, Mason e Burns 2013, Burns et al. 2014). Os maiores representantes do gênero se encontram nesse grupo, caracterizando-se por bicos extremamente grossos e cônicos, com os machos apresentando uma plumagem predominante preta e fêmeas com coloração parda e marrom (Ridgely e Tudor 1994). Seis espécies são comumente reconhecidas: *S. angolensis*, *S. nuttingi*, *S. funerea*, *S. crassirostris*, *S. atrirostris* e *S. maximiliani* (Ridgely e Tudor 1994, Del Hoyo et al. 2018), mas não está claro se as formas *gigantirostris*, *occidentalis* e *parkesi*, muitas vezes consideradas subespécies de *S. atrirostris* e *S. maximiliani* podem ser consideradas espécies completas ou variantes. Com análises baseadas em padrões de plumagem e caracteres morfológicos, Ubaid et al. (2018) indicam que o tratamento mais apropriado para *S. m. parkesi* é como sinônimo de *S. maximiliani*.

Atualmente, já excluindo *S. melanops* (Areta et al. 2009), 32 espécies do gênero ocorrem no Brasil (Piacentini et al. 2015, Del Hoyo e Collar 2018). Destas, nove estão ameaçadas segundo a mais recente lista de espécies ameaçadas de extinção, publicada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (MMA 2014). São elas: o bicudo (*S. maximiliani*), o caboclinho-de-papo-branco (*S. palustris*), a patativa-tropeira (*S. beltoni*), a cigarra-verdadeira (*S. falcistrostris*), o pixoxó (*S. frontalis*), o caboclinho-do-sertão (*S. nigrorufa*), o caboclinho-de-barriga-preta (*S. melanogaster*), o caboclinho-de-garganta-escura (*S. ruficollis*) e o caboclinho-de-barriga-vermelha (*S. hypoxantha*) (MMA 2014). Sete espécies estão globalmente ameaçadas e três estão listadas como Quase Ameaçadas (IUCN 2018). O caboclinho-de-chapéu-cinzentos (*S. cinnamomea*), a patativa-tropeira, a cigarra-verdadeira, o pixoxó e o caboclinho-do-sertão são considerados Vulneráveis. Em Perigo se encontram o bicudo, o caboclinho-de-papo-branco e o recentemente descrito caboclinho-de-Iberá (*S. iberaensis*) (Di Giacomo e Kopuchian 2016).

As espécies listadas como Quase Ameaçadas pela IUCN são o caboclinho-de-sobre-ferrugem (*S. hypochroma*), o caboclinho-de-barriga-preta, o caboclinho-de-garganta-escura (IUCN 2018). A habilidade canora das espécies de *Sporophila* é muito apreciada por criadores e isso as torna muito valiosas no mercado ilegal (Sick, 1997, Silveira e Straube 2008). A cultura de manter as aves em gaiolas não é apenas comum no Brasil, mas também no Uruguai e na Argentina, o que aumenta a demanda e a captura dessas espécies (Fontana et al. 2003). Por esta razão, as aves do gênero *Sporophila* são as mais abundantes em apreensões realizadas por autoridades no Brasil, provindas do comércio ilegal (Regueira e Bernard 2012). Além do aprisionamento ilegal, as espécies de *Sporophila* são altamente impactadas pela alteração ou perda de habitat devido à drenagem de áreas úmidas e à substituição de campos naturais por espécies de interesse agrícola tanto em suas áreas de reprodução quanto em invernada (Silva 1999).

Outra característica dos *Sporophila* é o fato de muitas espécies realizarem movimentos migratórios, em direção a sítios específicos durante o período reprodutivo, que geralmente ocorre de novembro a março, e depois para as suas áreas de invernada (Ridgely e Tudor 1989, Silva 1995, 1999, Sick 1997, Areta e Almirón 2009, Areta et al. 2009, Somenzari et al. 2018). Algumas espécies realizam movimentos locais e regionais, enquanto outras se movimentam por milhares de quilômetros entre suas áreas de invernada e nidificação (Silva 1999). Alguns dos poucos representantes florestais do gênero, *S. frontalis*, *S. falcirostris* e *S. schistacea* tem forte relação com um recurso efêmero, se alimentando principalmente de sementes de bambu (Rising et al. 2011). Ao que tudo indica, elas parecem ser nômades, deslocando-se para encontrar áreas com frutificação de bambu, onde se concentram em grandes números de indivíduos e desaparecendo após o término desse evento (Areta et al. 2009). Por outro lado, algumas espécies migram do sul da América do Sul para o centro-norte do Brasil, incluindo a região amazônica durante a estação invernal (Silva 1995, 1999, Machado e Silveira 2010, 2011, Repenning e

Fontana 2013, Somenzari 2018). O bigodinho (*S. lineola*) possui duas populações distintas, uma que se reproduz no sudeste e Sul do país, além dos países vizinhos (Argentina e Paraguai) e outra que tem seus sítios reprodutivos na Caatinga, entretanto ambas se deslocam em direção a região amazônica durante o período de invernada (Silva 1999). Outras espécies como *S. caerulescens*, também possuem várias populações, inclusive residentes e migrantes que ocorrem em simpatria (Sick 1997, Ortiz e Capllonch 2007, Somenzari et al. 2018).

Os dados sobre as áreas de invernada e reprodução das espécies migratórias são de extrema importância, pois além de auxiliar no entendimento das rotas migratórias, possibilitam a elaboração de planos efetivos de conservação, com foco na proteção dessas áreas. Apesar do número de espécies ameaçadas no gênero *Sporophila*, muitas espécies não possuem informações sobre sua biologia reprodutiva. Neste sentido, nas últimas décadas, vários estudos têm se dedicado a preencher essa lacuna (Di Giácomo 2005, Roda e López-Lanús 2007, Francisco 2006, 2009, Oliveira et al. 2010, Rovedder e Fontana 2012, Franz e Fontana 2013, Vinzentin-Bugoni et al. 2013, Reppening e Fontana 2016, Medolago 2016, Freitas et al. 2018). Entre eles, vale a pena destacar que o bicudo, que se trata de um dos passeriformes mais ameaçados no Brasil e que não possuía nenhuma informação a respeito de sua biologia reprodutiva há até poucos anos (Medolago et al. 2016). Outro caso que merece destaque é o caboclinho-branco (*S. pileata*), ave ameaçada de extinção no Estado de São Paulo (SMA 2014) e que seus sítios reprodutivos em território paulista eram desconhecidos (Freitas et al. 2018). Apesar de várias espécies possuírem registros de suas áreas de reprodução e de invernada, os padrões e rotas migratórias ainda permanecem desconhecidos para a maioria dos *Sporophila* migrantes (Sick 1997, Machado e Silveira 2010, Somenzari et al. 2018).

### **1.3. O grupo dos caboclinhos**

As aves conhecidas popularmente como caboclinhos formam um grupo monofilético dentro do gênero *Sporophila*, com 12 espécies que são homogêneas em forma e tamanho, e consideravelmente menores que os outros representantes de *Sporophila* (10 cm) (Ridgely e Tudor 1989, Ouellet 1992, Areta e Repenning 2011, Areta et al. 2011, Campagna et al. 2012, 2013, Di Giacomo e Kopuchian 2016). Os machos apresentam um padrão de cor bem definido, variando de branco, cinza e canela, o que permite fácil identificação entre as espécies. Nos últimos anos, vários estudos avaliaram a taxonomia do grupo, classificando alguns como formas variantes e até descrevendo novas espécies, a maioria baseada em dados geográficos, morfológicos e de canto (Areta 2008, Machado e Silveira 2011, Campagna et al. 2013, Di Giacomo e Kopuchian 2016).

No entanto, devido à diferenciação muito rápida e recente dos caboclinhos, datada no Pleistoceno inferior, muitas espécies não apresentam diferenças genéticas significativas, considerando os marcadores moleculares mais tradicionais, especialmente dentro do grupo denominado “caboclinhos do sul” (Campagna et al. 2013). Campagna et al. (2017) sugere que a diferenciação do grupo possa ter se dado a partir de uma grande população do ancestral que possibilitou uma grande variação genética e, posteriormente, em alopatria, essas diferenças teriam se acumulado entre as espécies e em um terceiro momento foram trocadas via hibridização, dando origem as variações na plumagem dos machos (Campagna et al. 2017). O isolamento reprodutivo pode ter sido direcionado através seleção dos machos pelas fêmeas, nas espécies que se reproduzem em simpatria, já que as principais áreas divergentes nos genomas dos caboclinhos contêm genes de pigmentação (Campagna et al. 2017). Além disso, existem divergências no cromossomo sexual Z, que não descartam a seleção pós-zigótica (Campagna et al. 2017).

Muitas espécies de caboclinhos realizam grandes deslocamentos entre suas áreas de invernada e de reprodução. Espécies como *S. cinnamomea*, *S. melanogaster*, *S. hypoxantha*, *S.*

*palustres*, *S. ruficollis* e *S. hypochroma* são avistadas na região central do Brasil, nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, podendo alcançar até o sul do estado do Pará, em grandes bandos muitas vezes formados por mais de uma espécie, fora do período reprodutivo, retornando posteriormente para as áreas de nidificação na Região Sul do país, nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul (Sick 1997, Fontana et al. 2009, Doras et al. 2013, Cavarzere et al. 2015).

Apesar de haver registros de hibridização em cativeiro, os dados não permitem concluir com clareza a viabilidade e fertilidade dos híbridos, devido ao baixo número de indivíduos (Campagna et al. 2018). Não há relatos de híbridos de caboclinhos na natureza, entretanto, nesse grupo, a identificação de possíveis híbridos só seria possível através da observação de machos adultos, durante o período reprodutivo, visto que o grupo possui plumagem de eclipse e as fêmeas são de difícil diferenciação (Sick 1997, Benites et al. 2010). Mesmo com a restrição na identificação de possíveis híbridos, são conhecidas algumas variações na coloração de machos adultos, como acontece com *S. hypoxantha* com a variação uruguaia (Areta e Reppening 2011). *S. melanogaster* possui uma variação denominada xumanxu (Reppening et al. 2010), *S. ruficollis* apresenta uma coloração variante denominada caraguatá (Areta et al. 2011) e *S. palustris* apresenta a variação “zelichi” (Areta 2008), entretanto, trata-se de indivíduos raros entre as populações de caboclinhos.

#### **1.4. O Caboclinho Branco, *S. pileata* (Sclater, 1865), e o Caboclinho, *S. bouvreuil* (Statius Muller, 1776)**

A distribuição do caboclinho-branco (*S. pileata*), no Brasil, se dá no Cerrado e áreas abertas dentro da Mata Atlântica, principalmente em pastagens e áreas úmidas ou inundáveis nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná, Rio Grande do

Sul e países adjacentes (Paraguai, Argentina, Uruguai e Bolívia) (Machado e Silveira 2010, 2011, del Hoyo e Collar 2018). Há registros de reprodução no estado de São Paulo e Rio Grande do Sul, no período de novembro a março (Mauricio et al. 2013, Freitas et al. 2018). O caboclinho (*S. bouvreuil*) é distribuído pela América do Sul, habitando áreas abertas, desde a Guiana Francesa e Suriname, até o Chaco paraguaio e na Argentina. No Brasil, é registrado em ambientes abertos no Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, nos estados do Pará, Amazonas, por todo o Nordeste brasileiro, sul do Mato Grosso e Goiás e Região Sudeste até o nordeste do São Paulo (Machado e Silveira 2010, Jamarillo 2018).

Antes considerado uma subespécie de *S. bouvreuil*, o caboclinho branco foi recentemente elevado a espécie baseado em coloração da plumagem de machos adultos, distribuição geográfica (Machado e Silveira 2010, 2011), e posteriormente, confirmado por análises moleculares que indicam a divergência entre as espécies no Pleistoceno (Campagna et al. 2013). O grupo que compreende *S. bouvreuil* (*S. b. bouvreuil*, *S. b. saturata* e *S. b. crypta*) possui a coloração ventral variando entre castanho claro, castanho avermelhado ou castanho amarelado escuro com a região dorsal variando de marrom avermelhado e marrom-acinzentado escuro a marrom-amarelado, enquanto *S. pileata* é reconhecida por uma plumagem ventral que varia de cinza claro ou cinza rosado a castanho amarelado claro, combinado com uma plumagem dorsal de marrom acinzentado escuro ou marrom avermelhado claro. Este padrão de cores está de acordo com as distribuições geográficas dos táxons corroborando com a elevação de *S. pileata* a espécie plena (Machado e Silveira 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

Machado e Silveira (2011) ressaltaram a existência de uma zona de sobreposição entre *S. bouvreuil* e *S. pileata* que se estende do sudeste do Estado de Minas Gerais até o nordeste do estado de São Paulo. Segundo os autores, os indivíduos que apresentavam coloração cinza rosado analisados no estudo são todos oriundos dessa faixa de distribuição e seriam variações de *S. pileata*. No entanto, o fato de estes indivíduos rosados apresentarem coloração intermediária entre *S. bouvreuil* e *S. pileata* e serem encontrados apenas na faixa de sobreposição entre estas duas taxa também sugere que estes possam ser híbridos, algo que poderia ser melhor investigado através de estudos comportamentais e de genética populacional. Em caso de hibridização, o conhecimento sobre a existência de zonas híbridas e níveis de introgressão nas espécies parentais podem auxiliar na melhor compreensão da taxonomia dos organismos envolvidos e também na conservação dos mesmos, uma vez que as duas espécies envolvidas fazem parte de listas de taxa ameaçadas. Neste sentido, a detecção de zonas de hibridização pode auxiliar na escolha de áreas para a preservação e monitoramento das taxa, uma vez que as zonas de hibridização podem se retrair ou expandir de acordo com tendências de mudanças climáticas (La Morgia e Venturino 2017). Além disso, trata-se de aves típicas de gaiola, que embora possam ser criadas legalmente em cativeiro, ainda existe a influência do tráfico ilegal. Tanto para a potencial criação em cativeiro para fins de conservação, como para a realização de solturas de animais apreendidos pela polícia ambiental, o conhecimento sobre os níveis de hibridização dos indivíduos e das populações podem ser importantes.

Do ponto de vista da compreensão da dinâmica de zonas de hibridização em geral, embora muitos estudos tenham relatado a ocorrência de zonas híbridas e de introgressão genética entre diferentes espécies nos trópicos, poucos avaliam os mecanismos que tornam estas zonas híbridas contidas em suas faixas de ocorrência. Para isto, os caboclinhos são excelentes modelos porque são aves migratórias, com amplo poder de deslocamento e ao mesmo tempo,

com divergência filogenética muito recente (Campagna et al. 2013, 2017). Devido a estas características, estudos com estas taxa podem contribuir para elucidar como organismos com divergência tão recente podem ser isolados reprodutivamente, uma vez que os mecanismos clássicos de isolamento normalmente levam mais tempo para se desenvolver.

### 3. OBJETIVOS

- Testar se há hibridização entre *S. pileata* e *S. bouvreuil* na área de sobreposição entre as duas espécies;
- Em caso positivo, testar se os híbridos podem ser férteis;
- Testar se a variação na tonalidade de cores de *S. pileata* pode ser decorrente do processo de hibridização;
- Testar a hipótese da filopatria como um dos mecanismos que impedem a homogeneização das espécies;
- Por tratar-se de espécies migratórias, testar a hipótese de que os organismos híbridos possam não conseguir realizar as migrações;
- Verificar se na zona de contato entre as duas espécies as hibridizações são eventos raros ou se podem ocorrer livremente entre os taxa;
- Gerar diretrizes para a para a conservação das espécies em estudo.

#### 4. DESENHOS EXPERIMENTAIS

**Para comprovar se há hibridização entre *S. pileata* e *S. bouvreuil*** foram estudados indivíduos de uma área na qual as duas espécies foram observadas se reproduzindo em simpatria (Santa Bárbara do Oeste) e: i) foram realizadas análises fenotípicas e de DNAm com o intuito de confirmar se machos com fenótipos de uma espécie poderiam apresentar haplótipos de DNAm da outra; ii) foram amostrados os casais com a presença de ninhos e foram realizadas análises de DNAm com o objetivo de verificar se animais com haplótipo de *S. pileata* poderiam se cruzar com indivíduos com haplótipo de *bouvreuil* e a existência destes cruzamentos foi confirmada através de testes de paternidade dos filhotes com marcadores de microsatélites e iii) foram realizadas análises para verificação dos níveis de hibridização dos indivíduos através de modelagens Bayesianas, utilizando-se marcadores de microsatélites.

**Para testar se os híbridos poderiam ser férteis**, o grau de hibridização dos indivíduos que se reproduziram, com paternidade confirmada dos ninhos, foi acessado através de análises Bayesianas de microsatélites.

**Para testar a hipótese da filopatria como um dos potenciais mecanismos que poderiam impedir a homogeneização das espécies** foram estudadas mais duas populações de *S. pileata*, localizadas fora da área de sobreposição com *S. bouvreuil* e os níveis de estruturação genética entre elas foi avaliado através do uso de marcadores de microsatélites. Além disso, as frequências de haplótipos de DNAm das duas espécies foi verificada na zona de sobreposição entre elas e também nas duas populações de *S. pileata*, que estão localizadas em diferentes distâncias da zona de hibridização.

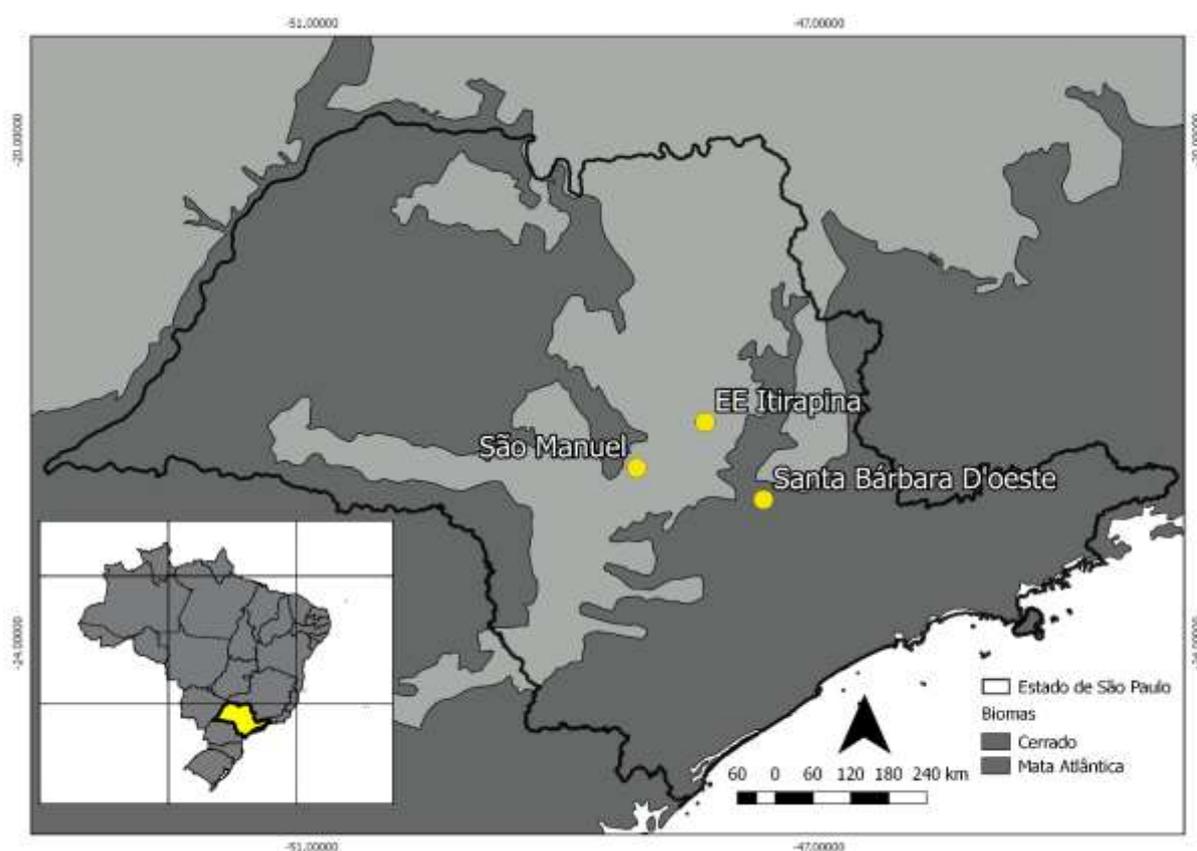
**Para testar a hipótese de que os híbridos poderiam ser inferiores por perderem as rotas migratórias**, os indivíduos amostrados na Zona de Contato entre as duas espécies foram marcados com combinações de anilhas coloridas e foi observada a proporção de indivíduos

identificados como híbridos pelas análises genéticas que voltaram para os mesmos territórios no ano seguinte. Desta maneira, assumiu-se que animais capazes de voltar para os mesmos pontos após a migração teriam a capacidade de deslocamento e localização normais.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Áreas de estudo

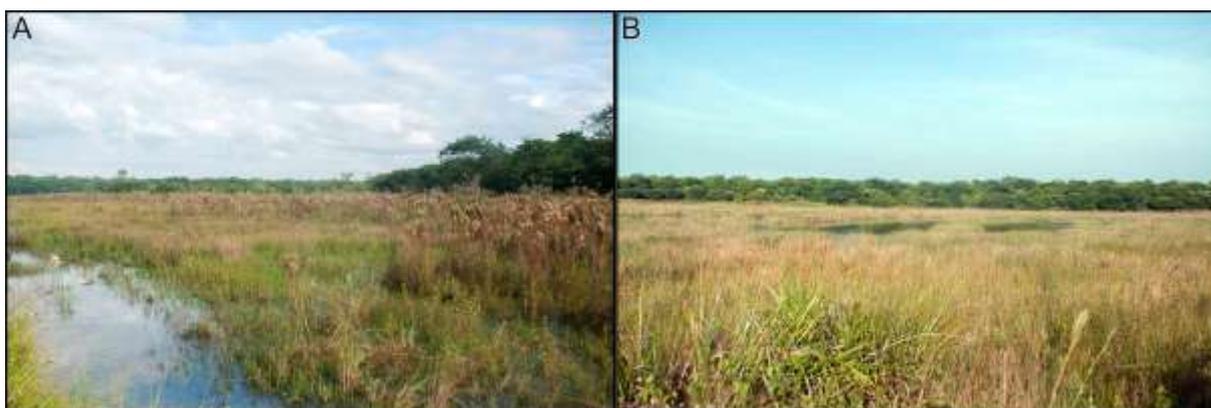
Três áreas no interior do estado de São Paulo foram amostradas durante os estudos. O clima da região é o mesotérmico, com uma estação quente e chuvosa de outubro a março (temperatura média até 22 ° C e precipitação em torno de 1100 mm) e uma estação seca e fria de abril a setembro (temperatura média abaixo de 18 ° C e precipitação em torno de 300 mm) (Alvares et al. 2013) (Figura 1).



**Figura 1:** Localização das áreas de amostragem no estado de São Paulo.

A primeira área de estudo está localizada no município de Santa Bárbara d'Oeste (SBO). Trata-se de um complexo de três lagos perenes e as áreas alagáveis que os circundam (25° 51' 13" 'S, 47° 26' 15" 'W, 590-610 m de altitude). Os lagos possuem área de 6, 14 e 45 ha, profundidade média de 1,5 metro e abundante vegetação emergente dos gêneros *Rhynchospora*

e *Cyperus*. Entre os seus limites e a vegetação arbórea secundária oriunda de um reflorestamento, cada lago apresenta um cinturão de áreas abertas e úmidas de cerca de 15 a 150 m, com predominância de *Andropogon bicornis*, e por vegetação herbácea e subarbustiva (Figura 2). A distância entre os lagos varia de 300 m a 800 m e estão inseridos em uma matriz agrícola de cultivo de cana-de-açúcar.



**Figura 2:** A) Áreas marginais de um dos lagos presentes em SBO, com abundância de *Andropogon bicornis* e B) vista geral do lago com abundante vegetação emergente e a área de reflorestamento, ao fundo.

A segunda área amostrada é a Estação Ecológica de Itirapina (EEI), localizada nos municípios de Itirapina e Brotas (22 ° 12 '24 ''S, 47 ° e 55' 46'' W, 720-750 m de altitude). Esta área de 2.300ha é uma das últimas áreas de Cerrado preservadas no estado, abrigando diferentes tipos de fitofisionomias desse bioma, como campos inundáveis, campos limpos, campos sujos, campos cerrado, cerrado *sensu stricto*, floresta de galeria e brejos (Durigan et al. 2004) (Figura 3). A unidade de conservação está circundada por ambientes alterados, como áreas destinadas à monocultura de *Pinus*, eucalipto, cana-de-açúcar e laranja, além da Represa do Lobo.



**Figura 3:** Vista geral dos campos presentes na EEI.

A terceira área amostrada situa-se às margens do Rio Tietê, no Reservatório de Barra Bonita, município de São Manuel ( $22^{\circ}36'20.59''S$  e  $48^{\circ}26'13.87''O$ , 469-479 m de altitude). Os ninhos foram encontrados em dois locais com áreas de 5,4 e 3,7 ha com vegetação em estágio inicial de regeneração, com predominância de gramíneas como *Brachiaria*, usados anteriormente como área de cultivo de cana-de-açúcar. A área com menor tamanho é circundada por uma mata de galeria e áreas de cultivo de cana-de-açúcar e deixou de ser utilizada para o fim agrícola, devido a uma nascente de água que surgiu no local. O outro ponto de amostragem, localiza-se em uma faixa de terra que foi adquirida por outro proprietário, deixando de ser utilizada para o fim anterior, permitindo o surgimento de uma vegetação pioneira. Esta área é circundada por áreas de cultivo agrícola e por um clube de campo com cerca de 500 residências (Figura 4).



**Figura 4:** Áreas amostradas no município de São Manuel, com a vegetação em estágio inicial de regeneração e presença de gramíneas exóticas.

## **5.2. Coleta de dados e obtenção das amostras**

### *5.2.1 Localização dos ninhos*

Para localizar os ninhos, durante o período reprodutivo das espécies (novembro a março) foram realizadas caminhadas nos ambientes de nidificação, durante as primeiras horas da manhã. Os ninhos foram localizados intensificando a procura nos territórios defendidos pelos machos e seguindo-se as fêmeas presentes nestes territórios, observando-se a presença de indivíduos com material para a construção de ninhos no bico ou alimento para os filhotes (Martin e Geupel 1993).

### *5.2.2 Captura das aves*

Aves adultas foram capturadas com o auxílio de uma a oito redes ornitológicas de 12 X 2,5 m (malha 28 a 30 mm), montadas em estacas verticais de alumínio, nos locais onde a espécies foram avistadas (Figura 5) e nos territórios, próximos aos ninhos com auxílio de *playback* de *S. pileata*. Cada ave capturada foi retirada da rede e acondicionada em sacos de pano de tecido leve e poroso. Para cada indivíduo foram obtidas fotos e foi colocada uma anilha padrão CEMAVE e anilhas coloridas de PVC, para possibilitar o posterior reconhecimento dos indivíduos, sem que houvesse a necessidade de uma nova captura. Além disso, uma amostra de

sangue foi coletada como descrito abaixo. O procedimento de retirada da ave da rede, anilhamento, coleta dos dados morfológicos e sangue levou de cinco a dez minutos, após o que as aves foram soltas no mesmo local em que foram capturadas.

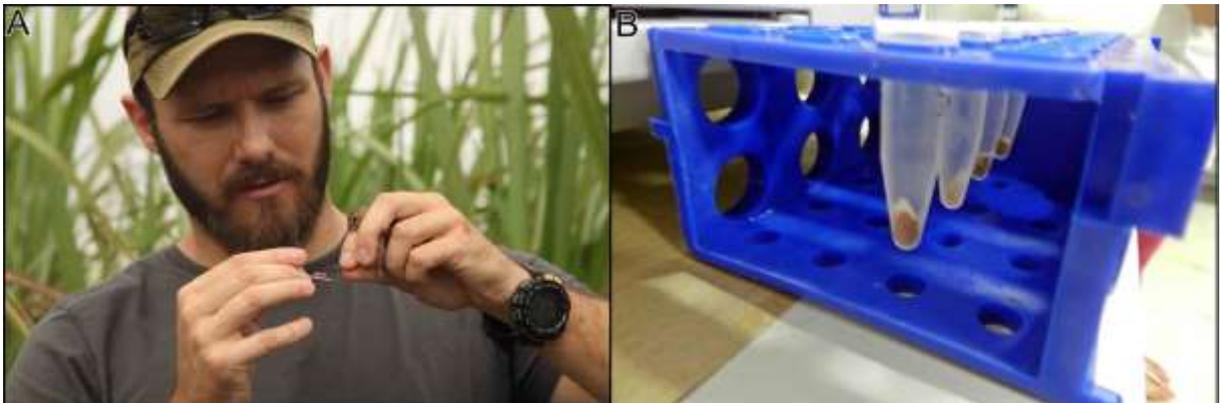
A captura manual dos ninhegos foi realizada diretamente no ninho, quando os filhotes já se encontravam suficientemente desenvolvidos para receber as anilhas, por volta de 5 dias após o nascimento, evitando-se também, realizar a captura próximo a data de os filhotes deixarem o ninho, a fim de evitar que a manipulação os induzisse a abandoná-lo prematuramente. Neste caso, os indivíduos foram anilhados e recolocados no ninho, sem a necessidade de tomar os dados morfológicos.



**Figura 5:** Método de captura com rede ornitológica, montada no território reprodutivo de um dos casais (Foto: Junior Esteves).

### 5.2.3 Procedimento de coleta do sangue e extração do DNA

Foi coletada uma amostra de sangue de aproximadamente 5  $\mu$ l de cada ave adulta através de um pequeno corte na ponta de uma das unhas (Figura 6). Este procedimento é o mais apropriado para aves de pequeno porte pois evita hematomas geralmente causados pelo uso tradicional de agulhas ou capilares (Francisco et al. 2007). O sangue foi transferido com auxílio de uma micropipeta para um tubo Eppendorf de 1,5 ml, juntamente com uma gota do anti-coagulante EDTA, e armazenado em álcool etílico 100%. Depois deste procedimento, a unha de cada ave foi limpa com etanol 70% e uma solução hemostática líquida foi aplicada no local para estancar o sangramento. O sangue foi armazenado em etanol absoluto em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A extração do DNA se deu seguindo o protocolo do kitReliaPrep(TM) *BloodgDNAMiniprep System*, PROMEGA.



**Figura 6:** A) Método de retirada de sangue de um indivíduo fêmea, através de corte na unha; B) Armazenamento das amostras em tubo de 1,5 ml.

## 5.3. Análises moleculares

### 5.3.1 DNA mitocondrial

### 5.3.1.1 Procedimentos laboratoriais

Nas análises do DNA mitocondrial foi utilizado o gene Citocromo Oxidase I (COI 1; *barcode*), que foi amplificado com os *primers* COIBirdF1 e COIbirdR2 (Kerret al. 2009) (Tabela 1). Esse gene apresentou sítios divergentes entre *S. pileata* e *S. bouvreuil* em trabalho realizado por Campagna et al. (2013). As amplificações foram realizadas utilizando-se um termo-ciclador (Eppendorf Master CyclerGradient), num total de 25 µl, contendo 100 ng de DNA, 150 µM de cada dNTP, 6,6 µl do buffer de amplificação (200 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 500 mM MKCl; Promega), 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 µl de BSA (25µg/ml) e 1 U Taq-Polymerase (Promega).

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para as reações de amplificação do gene mitocondrial COI 1, retirados de Kerret al. 2009.

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'
COI BirdF1	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC
COI BirdR2	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTGG

A fim de verificar a melhor temperatura de *annealing*, inicialmente o termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94° C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos em um gradiente de 45° a 60° C e um minuto e 30 segundos a 72° C, e uma extensão final de 10 minutos a 72° C. Para verificar a qualidade das amplificações e realizar a escolha da melhor temperatura, o produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corrido durante 30 minutos a 180 V. Após isso, o gel foi registrado utilizando-se o fotodocumentador CARESTREAM Gel Logic 212 PRO, através de transiluminação UV. A temperatura escolhida para a realização do PCR foi 51.2° C.

Os produtos da PCR foram purificados através do gel *Wizard SV* e *PCR Clean-Up System*, PROMEGA. As sequências foram obtidas em sequenciador automático ABI 3730

utilizando-se o *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit*, alinhadas automaticamente utilizando-se o procedimento de CLUSTAL W (Higginset al. 1994), e foi verificada a ausência de *stop codons* no software MEGA 7 (Kumaret al. 2013).

#### 5.3.1.2 Análise dos dados

Além das sequências obtidas no laboratório, foram utilizadas também 10 sequências do GenBank de *S. pileata* (GU070595, GU070599, GU070598, GU070597, GU070596, GU070594, KF316357, KF316356, KF316354, KF316355), oito para *S. bouvreuil* (KF316366, KF316365, KF316360, KF316373, KF316362, KF316367, KF316372, KF316369) e uma de *S. minuta* (DQ434137) e *S. castaneiventris* (GU070585) para os grupos externos (Campagna et al. 2013). As sequências foram alinhadas automaticamente usando o procedimento CLUSTALW (Higgins et al. 1994), implementado no software MEGA versão 7 (Kumar et al. 2006).

Para inferência bayesiana, foi selecionado o melhor modelo de substituição de nucleotídeos usando o *Bayesian Information Criteria* (BIC) (Schwarz 1978) implementado no *software* PartitionFinder2 (Lanfear et al. 2016), no qual cada conjunto de dados é particionado em primeiro, segundo e terceiro códon. Os modelos escolhidos através do PartitionFinder para o primeiro, segundo e terceiro códon foram F81 (Felsenstein 1981), TRN (Tamura e Nei 1993) e K80+I (Kimura 1980), respectivamente.

As árvores foram obtidas usando o procedimento de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) do programa *MrBayes* 3.2.1 (Ronquist e Huelsenbeck 2003). A análise consistiu em duas execuções independentes de 20.000.000 gerações, com uma cadeia fria e três aquecidas cada, amostrando árvores a cada 1.000 gerações, e foram adotadas configurações padrão de parâmetros. A convergência das corridas foi testada pelo *Potential Scale Reduction Factor*

(PSRF), cujo valor deve se aproximar de 1,0 na medida em que as corridas convergem (Gelman e Rubin, 1992).

### 5.3.2 Isolamento e caracterização dos marcadores de microssatélites

Os *primers* de microssatélites foram obtidos através de uma biblioteca genômica de *S. maximiliani*. A preparação das bibliotecas para o sequenciamento seguiu o protocolo do kit Illumina Nextera (Illumina), com exceção dos *primers* utilizados, que foram customizados, e a purificação das bibliotecas utilizou *Speedballs* ao invés dos reagentes fornecidos pelo *kit*. O sequenciamento foi realizado em plataforma MiSeq versão 2 (Illumina) utilizando a leitura *paired-end*. Os dados gerados pelo sequenciamento foram analisados utilizando o programa computacional PAL\_FINDER\_v0.02.04 (Castoe et al. 2012) e foram identificadas 240 sequencias contendo microssatélites de dinucleotídicos a hexanucleotídicos, e os *primers* foram projetados para 116 dessas sequencias. Em seguida, 30 *loci* foram selecionados para análises de amplificação e polimorfismo em *S. maximiliani* e para transferibilidade para *S. pileata* e *S. bouvreuil* (Medolago et al. submetido).

Os testes de amplificação dos *loci* selecionados foram realizados submetendo-se amostras de 10 indivíduos de *S. pileata*, oriundos de duas populações estudadas e oito de *S. bouvreuil* a reações de PCR em volume de 10  $\mu$ L, contendo 100 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs (Promega), tampão de amplificação 1X (Promega), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu$ M de cada primer e 1 U de Taq polimerase (Promega).

Primeiramente uma reação de PCR prévia foi realizada para cada par de *primers*, e o produto foi analisado em gel de agarose 1%, a fim de verificar a melhor temperatura de *annealing*. Para essa reação foi utilizado um *Termociclador Mastercycler Gradient* (Eppendorf®) programado para uma desnaturação inicial de 94° C (3 minutos), 30 ciclos de

94° C (30 segundos), 30 segundos em um gradiente de 45-65° C e 72° C (30 segundos), seguido de uma extensão final de 72° C (5 minutos).

Após definida a temperatura de *annealing* para cada par de *primers*, foi realizada outra reação de PCR, com as mesmas configurações, com a temperatura já pré-estabelecida. A eficiência de amplificação dos *loci* foi verificada em gel de agarose 1% e o polimorfismo destes foi visualizado em gel de poliacrilamida 7%, utilizando coloração por nitrato de Prata (Comincini et al. 1995).

Todos os *loci* de microssatélites que se mostraram polimórficos foram marcados com fluorescência (fluorocromo FAM) e foram analisados em sequenciador automático ABI 3730 (*DNA Analyzer* – AppliedBiosystems). A visualização dos genótipos de cada indivíduo foi realizada no programa computacional GENEMARKER 2.4.0 (Softgenetics).

Foram calculadas as heterozigoses observadas ( $H_O$ ) e esperadas ( $H_E$ ), e as probabilidades de déficit de heterozigotos ( $P$ ) para cada *locus* e foi verificado o desequilíbrio de ligação entre os *loci*, utilizando os procedimentos de randomização implementados no software GENEPOP 4.2 (Raymond e Rousset 1995). Para todas as análises os níveis de significância para testes múltiplos (método de Bonferroni) foram estimados usando o FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001).

As probabilidades de existência de alelos nulos, *allelic dropout* e *scoring errors* devido a *stuttering* foram estimados usando o MicroChecker (Van Oosterhout et al. 2004). Para acessar a precisão dos *loci* para fins forenses, incluindo testes de paternidade, estimamos: a probabilidade de que dois indivíduos aleatórios na população possam apresentar composição alélica idêntica (identidade); a probabilidade de que o conjunto de *loci* possa falhar em diferenciar irmãos (identidade de irmãos); a probabilidade de que o conjunto de *loci* não exclua um par de pais candidatos não aparentados (par pai) e a probabilidade de não exclusão de um

candidato a pai não relacionado quando o genótipo do pai é desconhecido (primeiro pai), todos usando Cervus 3.0 (Kalinowski et al 2007).

### *5.3.3 Testes de paternidade*

A verificação de cópulas extra-par foi realizada através da observação direta da herança de alelos (Fleischer 1996, Mitrus et al. 2014, Biagolini et al. 2016). Esse método consiste em considerar um filhote como resultante de cópula extra-par quando verificada a presença de pelo menos dois *loci* em discordância com o possível pai. Isso ocorre porque o descompasso em apenas um *locus* pode ser potencialmente causado por mutações ou alelos nulos (Westneat e Mays 2005, Liu et al. 2015). Dados faltantes por má qualidade nas genotipagens não foram considerados como discordantes dos pais. Além disso, foram utilizados os valores de máxima verossimilhança das estimativas de parentesco ( $r$ ) “relatedness” obtidos com o software ML-Relate (Kalinowski et al. 2006), para inferir a paternidade de indivíduos desconhecidos dentro da população.

### *5.3.4 Estruturação populacional*

Utilizando-se dos marcadores de microssatélites, foi calculada a diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre as populações, de acordo com Weir e Cockerham (1984), utilizando o teste exato de Fisher para testar se os valores encontrados foram significativos. A análise foi realizada no programa GENEPOP 4.2 (Raymond e Rousset 1995). Também foi calculado o  $\Phi_{ST}$ , obtido através de uma Análise de Variância Molecular (AMOVA), utilizando-se as frequências dos haplótipos de DNA mitocondrial das populações no programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005).

### *5.3.5 Identificação de níveis de hibridização dos indivíduos*

Para verificar os níveis de hibridização dos indivíduos da população de SBO, foram utilizados marcadores de microssatélites e foi utilizado o procedimento de análise Bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Considerando um conjunto de genótipos, o modelo assume que há diferentes grupos gênicos (K), com frequências alélicas distintas em cada *locus* o que caracteriza cada população. Baseado nestas frequências, o programa estima a probabilidade ( $q$ ) de cada indivíduo pertencer a uma ou mais populações (ou espécies). Os indivíduos foram considerados como sendo puros de uma espécie quando apresentaram probabilidade  $\geq$  de 90% de pertencer a tal grupo ( $q \geq 0.9$ ) (Luo et al. 2008, Väli et al. 2010).

As análises foram realizadas para  $K = 2$ , com três repetições. Foram utilizadas 1000000 re-amostragens pelo método de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) e 100000 re-amostragens como período de *Burn-in*, utilizando-se frequência correlacionada de alelos e o modelo que permite mistura de genomas (*admixture model*), sem informações *a priori*.

Para avaliar o poder dos modelos e para definir o melhor valor de limiar para as análises do STRUCTURE, foi utilizado o HYBRIDLAB 1.0 (Nielsen et al. 2006) para gerar os genótipos esperados para as diferentes classes parentais e híbridas (Godinho et al. 2011, Čížková et al. 2012). Este software cria genótipos *multilocus* através da seleção aleatória de um alelo de cada uma das duas populações parentais pré-definidas com base nas suas frequências alélicas.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Obtenção das amostras

Foi capturado um total de 135 indivíduos nas três áreas amostradas. A área, na qual foi obtido o menor número de capturas foi SM (n=23), sendo quatro fêmeas e 19 machos. Na EEI foram capturados 33 machos e três fêmeas de caboclinhos. Em SBO, foram capturados 76 indivíduos, entretanto foram considerados para as análises apenas os indivíduos jovens capturados nos ninhos e indivíduos com territórios confirmados (n=51). Por se tratarem de espécies migratórias, excluímos os indivíduos que não se estabeleceram no local durante a estação reprodutiva, para evitar assim a inclusão nas análises de passantes e de fêmeas pertencentes a outras espécies de caboclinhos que utilizam a região como rota migratória. Das amostras selecionadas, 13 são de fêmeas, 16 de jovens e ninhegos de sexo indefinido e 22 de machos. A Figura 7 mostra indivíduos machos adultos de *S. bouvreuil* e *S. pileata*, fêmea adulta e um indivíduo jovem, sete dias após ter deixado o ninho.



**Figura 7:** Indivíduos capturados e anilhados durante os trabalhos de campo do presente estudo: A) macho com fenótipo de *S. bouvreuil*; B) macho com fenótipo de *S. pileata*; C) fêmea; D) filhote aos 7 dias depois de deixar o ninho.

Em SOB foram encontrados 20 ninhos (Figura 8), durante duas temporadas reprodutivas (2016/2017 e 2017/2018). Doze destes ninhos tiveram sucesso até o ponto de ser possível a captura dos ninhegos e a coleta de sangue para a confirmação das paternidades, entretando em um deles, não foi possível a captura do macho para posterior análises de paternidade, logo foi excluído das análises.



**Figura 8:** Ninhos com ovos e ninhegos encontrados em SBO.

## **6.2. Isolamento dos microssatélites e transferibilidade dos *loci***

Para a transferência dos *primers* descritos para *S. maximiliani* para as os caboclinhos, foram utilizadas 23 amostras de *S. pileata*, oriundas de SM. Dos 30 microssatélites testados, 14 amplificaram e tiveram seu polimorfismo confirmado através de géis de poliacrilamida 7% (Tabela 2). Oito deles tiveram resultados satisfatórios durante as genotipagens. Entre os oito *loci*, o número de alelos variou de 4 a 16 ( $8,13 \pm 3,76$ ) e ( $H_O$ ) e ( $H_E$ ) variaram de 0,01 a 0,19 ( $0,58 \pm 0,22$ ) e 0,11 a 0,2 ( $0,73 \pm 0,11$ ), respectivamente. Não foi detectado desequilíbrio de ligação entre os *loci* analisados. Foi detectado déficit de heterozigose para os *loci* Sma20 ( $H_O = 0,04$ ;  $H_E = 0,49$ ;  $P=0,006$ ) e Sma33 ( $H_O = 0,43$ ;  $H_E = 0,73$ ;  $P=0,006$ ) (Tabela 2). Foi detectada a possibilidade de haver alelos nulos devido à baixa heterozigose nestes *loci*.

A probabilidade de não exclusão de um candidato a pai não relacionado, quando o genótipo do genitor é desconhecido (primeiro pai) foi de 0,01, e as probabilidades de dois indivíduos apresentarem composição alélica idêntica (identidade), a probabilidade de que o conjunto de *loci* possa falhar em diferenciar irmãos (identidade de irmãos) e de que o conjunto de *loci* não exclua um par de pais candidatos não aparentados (par pai) foram todas <0,00.

**Tabela 2:** Descrição e caracterização de *loci* de microssatélites isolados de *S. maximiliani* e transferidos para *S. pileata* (23 animais de SM). *Motifs*, sequências dos *primers*, temperatura de *annealing* (TA), número de alelos (NA), variação de tamanho dos alelos em pares de bases (pb), heterozigose observada ( $H_e$ ) e esperadas ( $H_o$ ) e probabilidade de déficits heterozigotos ( $P$ ). O valor  $P$  corrigido após a correção de Bonferroni foi 0,006.

<i>Loci</i>	<i>Motif</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	T <sub>A</sub> (°C)	N <sub>A</sub>	Intervalo (pb)	$H_e$	$H_o$	$P$
Sma20	(AT) <sub>21</sub>	F: GGAACCTCTGCTGCTTG R: TGCCTTCCTTAGCAGACTC	61.4	4	205-215	0,49	0,04	0,006
Sma21	(AT) <sub>12</sub>	F: GAGCAGGTACAAGGACTC R: GATCTCCACTTCCTCCAGC	64.5	7	255-287	0,50	0,52	0,712
Sma22	(AG) <sub>13</sub>	F: GCATCTTCTGTACTGAGAGC R: AACCTCAACAGACACGGAAC	63.3	9	400-420	0,74	0,74	0,600
Sma25	(AC) <sub>14</sub>	F: CTGTAGAAGAACTGCCAG R: AACTCTCACACAGCTTTGC	61.4	16	216-278	0,89	0,83	0,193
Sma29	(AC) <sub>14</sub>	F: CAAACAGGGCAAAGGGTGAC R: TCAGCCTCGAGTTAACAC	64.5	6	171-197	0,68	0,57	0,150
Sma31	(AC) <sub>14</sub>	F: AGAAGTAGTCCCTCTAGC R: TTGTCTGACTGGCTTGTAG	61.4	10	161-191	0,84	0,78	0,250
Sma32	(AC) <sub>12</sub>	F: GCCAGCTGAAATCCATAGGC R: CTCTCCTGTGCTCCTTCCAG	64.5	8	353-383	0,73	0,83	0,956
Sma33	(AT) <sub>12</sub>	F: GCTGCTTGAAATTCTCGTGC R: CCTAAAGCTGGAAGTGTGG	64.5	5	364-398	0,73	0,43	0,006

### 6.3. Caracterização genética das populações estudadas

Somando todas as três áreas amostradas, foram encontrados um total de 98 alelos para os oito *loci* de microssatélites, com o número de alelos por *locus* variando de 6 a 26 (12,15±5,6). Considerando as áreas separadamente, o número de alelos variou entre 4 a 16 (8,13±3,76) para a população de SM, 5 a 20 (8,38±4,9) para SBO e 5 a 14 (8,50±2,93) para a EEI. Em todas as áreas amostradas as populações apresentaram déficit global significativo de heterozigose após

correção sequencial de Bonferroni ( $p < 0,006$ ) (Tabela 3). Todas as populações amostradas apresentaram alelos exclusivos, sendo nove para a população de SM, oito para SBO e 12 para a população da EEI (Anexo 1).

**Tabela 3:** Caracterização dos *loci* microssatélites para cada uma das populações estudadas. *Loci*, número de alelos (NA), heterozigose esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ) e probabilidade de déficits heterozigotos (P). O valor P corrigido após a correção de Bonferroni é 0,006.

<i>Loci</i>	Áreas de amostragem														
	SM					SBO					EEI				
	NA	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$	P	NA	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$	P	NA	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$	P
Sma20	4	0,49	0,04	0,913	<0,006	5	0,71	0,33	0,503	<0,006	6	0,49	0,24	0,511	<0,006
Sma21	7	0,50	0,52	-0,043	0,756	5	0,54	0,40	0,321	0,013	5	0,54	0,55	-0,019	0,656
Sma22	9	0,74	0,74	0,001	0,588	6	0,69	0,62	0,149	0,238	9	0,69	0,59	0,147	0,050
Sma25	16	0,89	0,83	0,072	0,213	20	0,93	0,90	0,029	0,319	14	0,84	0,62	0,268	<0,006
Sma29	6	0,68	0,57	0,176	0,125	7	0,66	0,62	0,052	0,306	7	0,62	0,69	-0,111	0,931
Sma31	10	0,84	0,78	0,067	0,344	8	0,64	0,55	0,072	0,081	9	0,80	0,69	0,142	0,056
Sma32	8	0,73	0,83	-0,136	0,919	9	0,78	0,83	-0,035	0,838	11	0,84	0,93	-0,105	0,963
Sma33	5	0,73	0,43	0,409	<0,006	7	0,76	0,31	0,619	<0,006	7	0,75	0,24	0,68	<0,006
Média	8,13	0,70	0,59	0,59		8,38	0,71	0,57	0,59		8,50	0,70	0,57	0,59	
desvio padrão	3,76	0,14	0,27	0,27		4,90	0,12	0,22	0,27		2,93	0,14	0,23	0,27	

#### 6.4. Identificação de híbridos

Foram obtidas 79 sequências do gene mitocondrial COI-1 com qualidade suficiente para realizar as análises (32 para SBO, 26 para EEI e 21 para SM), resultando em um produto de PCR de 633 pb. Considerando-se os animais aqui amostrados e 10 amostras de *S. pileata* e oito amostras de *S. bouvreuil* disponíveis no GenBank, foram encontrados 28 haplótipos de *S. pileata* e oito haplótipos para *S. bouvreuil*. Excluindo-se os indivíduos do GenBank, foram identificados 25 haplótipos distintos, sendo 23 de *S. pileata* e apenas dois para *S. bouvreuil* (Anexo 2). Os produtos da amplificação foram certificados como sendo de origem mitocondrial, pois geraram produtos de PCR únicos por indivíduo, sem a presença de picos duplos e as sequências foram condizentes aos produtos homólogos depositados no GenBank.

A análise filogenética bayesiana revelou dois clados distintos com alto suporte de bootstrap. As sequências homólogas depositadas no GENBANK, identificadas como *S. pileata* e *S. bouvreuil*, ficaram dentro dos respectivos clados (Campagna et al. 2013), reforçando o potencial desta região do DNAmT para identificar estas duas espécies. A única exceção foi a sequência KF316369, pertencente a um indivíduo que ficou no clado *pileata* mas havia sido identificada no trabalho de Campagna et al. 2013 como pertencente a *S. bouvreuil* (Figura 9). As figuras 10 e 11 mostram as variações de plumagem para os machos adultos encontradas dentro de cada clado.



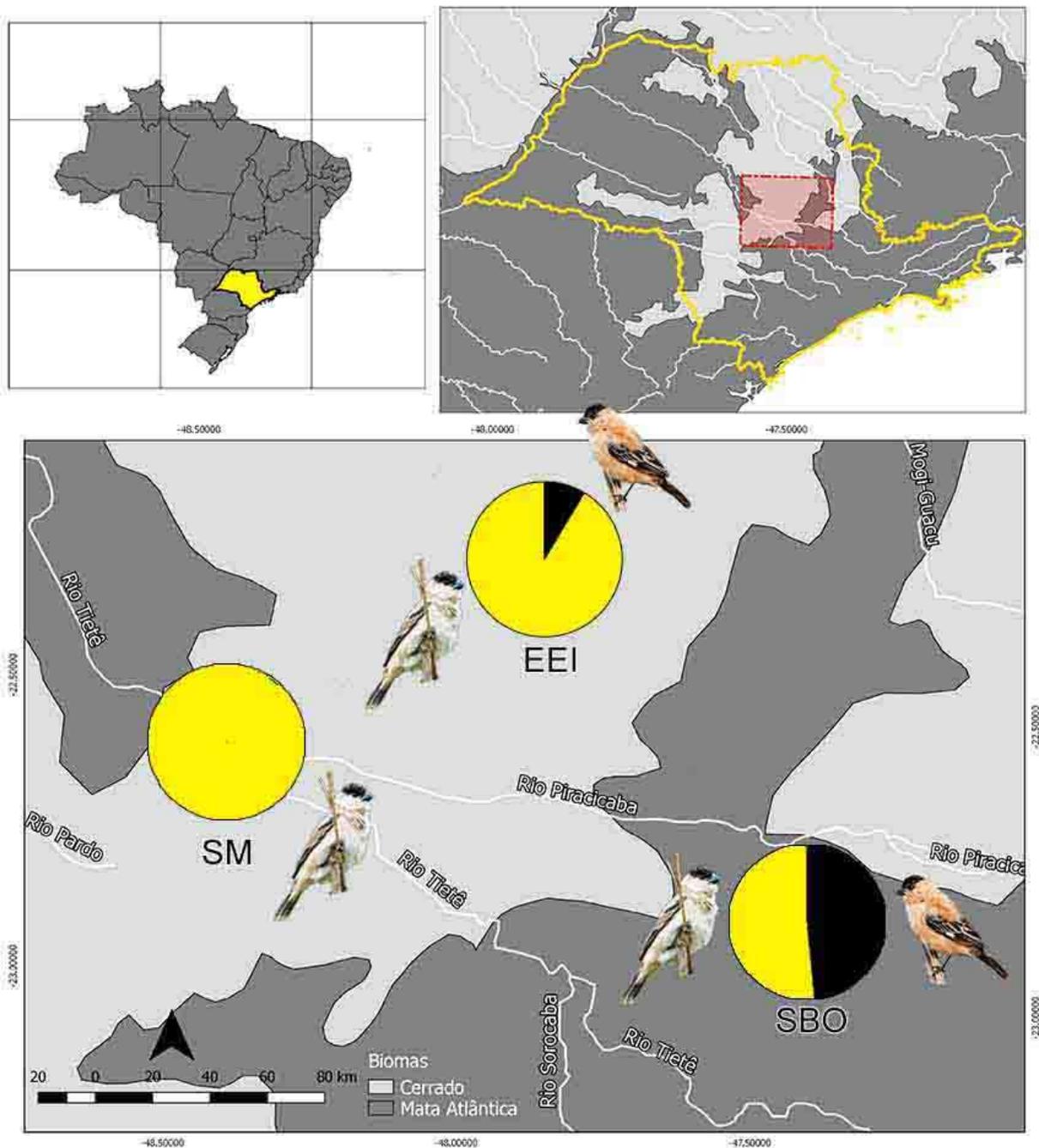


**Figura 10:** Gradiente de coloração da plumagem em indivíduos machos com plumagem reprodutiva que foram identificados com DNAmT de *S. pileata*.



**Figura 11:** Gradiente de coloração da plumagem em indivíduos machos com plumagem reprodutiva que foram identificados com DNAm<sub>t</sub> de *S. bouvreuil*.

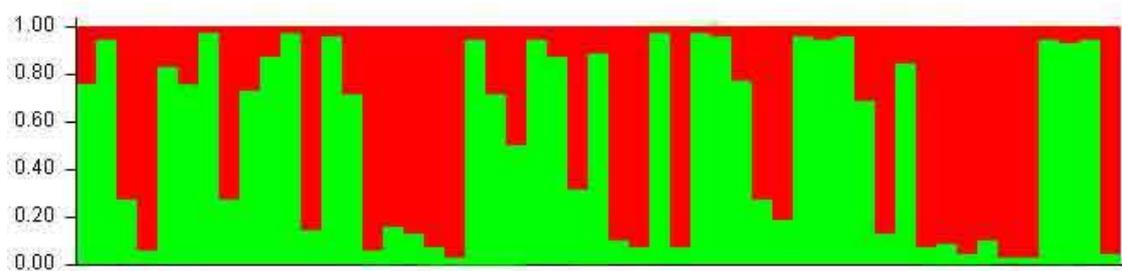
Em SBO, dos sete indivíduos machos adultos identificados como *S. bouvreuil* com base na coloração da plumagem, três apresentaram haplótipos condizentes com o clado de *S. pileata*. Todos os cinco indivíduos com fenótipo de *S. pileata* apresentaram haplótipo condizente com a espécie. Já dos indivíduos com plumagem intermediária, quatro agruparam com *S. bouvreuil* e quatro com *S. pileata*. No total de 33 indivíduos capturados nesta área, que incluem machos adultos, fêmeas e indivíduos sub-adultos sem plumagem definida, 16 deles (48%) apresentaram haplótipos de *S. pileata* e 17 (52%) apresentaram haplótipos de *S. bouvreuil*, mostrando que os haplótipos dos dois clados estão homoganeamente distribuídos na população. Na EEI, todos os 18 machos com fenótipo de *S. pileata*, bem como as duas fêmeas, apresentaram haplótipos condizentes com esta espécie. Haplótipos de *S. bouvreuil* foram encontrados apenas em três dos 15 machos que apresentaram padrão de plumagem intermediário. Em SM, nenhum indivíduo apresentou haplótipo de *S. bouvreuil*, embora quatro dos 19 machos capturados tenham apresentado padrão de plumagem intermediário (Figura 12).



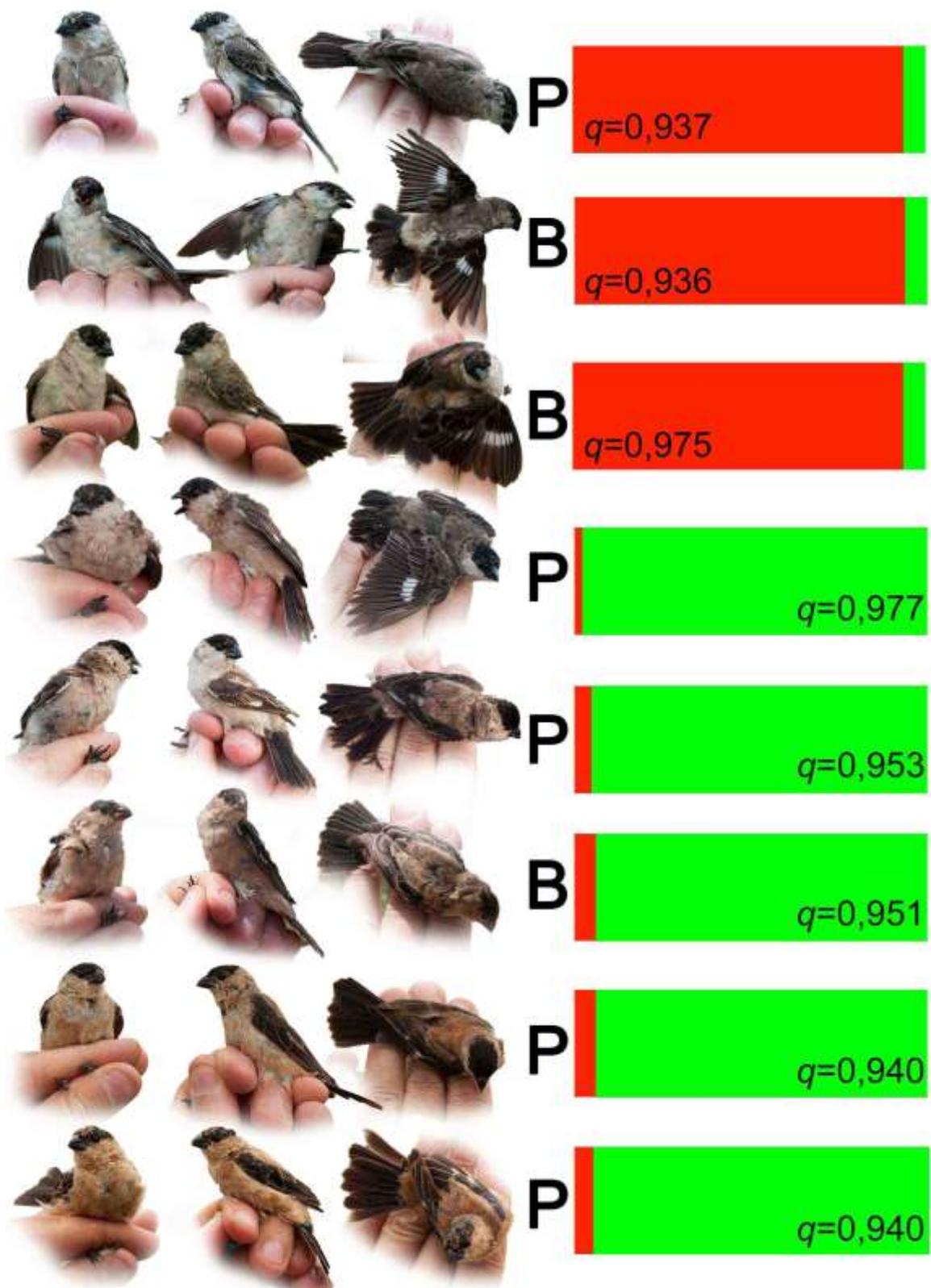
**Figura 12:** Mapa com a proporção de ocorrência dos haplótipos de DNAm<sub>t</sub> de *S. pileata* (em amarelo) e de *S. bouvreuil* (em preto) nas três áreas estudadas incluindo machos em plumagem definitiva, machos em plumagem de eclipse e fêmeas.

O Anexo 3 mostra os valores de atribuição de cada indivíduo a cada um dos dois taxa (valores de  $q$ ) obtidos através da análise de marcadores de microssatélites com o software STRUCTURE para a população SBO. Ao longo de três corridas independentes os valores de  $q$  foram bastante consistentes. Foram identificados 15 indivíduos com valor de  $q \geq 0,90$  para o

grupo A (potenciais *S. bouvreuil*) e 14 para o grupo B (potenciais *S. pileata*), dentro da população (Figura 13). A Figura 14 traz o fenótipo, o haplótipo mitocondrial e o valor de  $q$  para os indivíduos machos adultos com valores de  $q \geq 0.90$ . Dos indivíduos do grupo A, 50% (n=6) possuem haplótipo de DNAm de *S. pileata*. Já para os indivíduos do grupo B, 93% (n=13) apresentaram haplótipo mitocondrial para *S. bouvreuil*. Ambos os grupos apresentaram alelos de microssatélites exclusivos, sendo 17 para o grupo A e oito para o grupo B (Anexo 4).

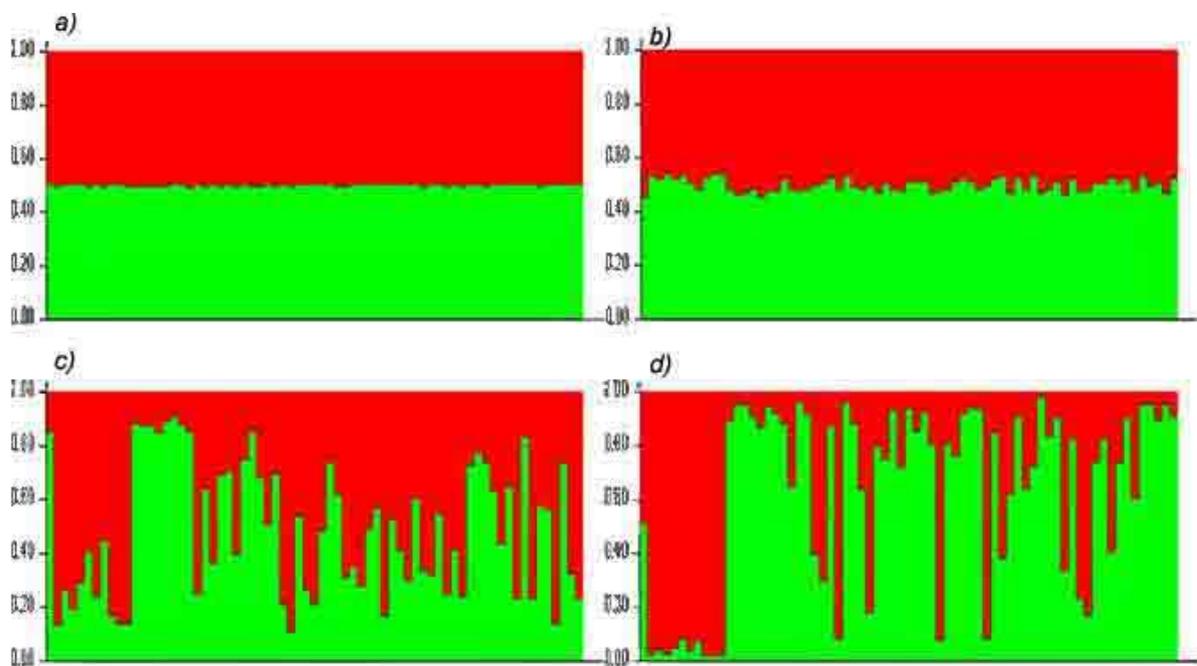


**Figura 13:** Gráfico de saída do software STRUCTURE assumindo-se a presença de dois conjuntos gênicos para a população SBO. As cores indicam a proporção genética que cada indivíduo possui de cada um dos grupos. A cor vermelha representa *S. pileata* e a verde representa *S. bouvreuil*.



**Figura 14:** Fenótipos, haplótipos de DNAm<sub>t</sub> (P: *S. pileata*; B: *S. bouvreuil*) e o valor de  $q$  para os indivíduos machos adultos com plumagem reprodutiva da área SBO. A coloração vermelha representa *S. pileata* e a verde *S. bouvreuil*.

Para um nível de confiança de 90%, nas análises realizadas com dados simulados de gerações de híbridos ( $n = 50$ ), quando comparados com os indivíduos indicados como puros da população sob pela análise anterior do STRUCTURE, 100% dos F1 foram identificados como híbridos, com  $q$  variando de 0,49 a 0,51 ( $0,50 \pm 0,01$ ) (Figura 15). Da mesma forma, os F2 foram todos identificados como híbridos, com  $q$  entre 0,47 e 0,54 ( $0,50 \pm 0,02$ ). Para os retrocruzados 1, com o grupo A (potenciais *S. bouvreuil*), não foi possível a identificação, pois 20 indivíduos obtiveram valor de  $q > 0,9$  (40%). Para os retrocruzamentos com o grupo B (potenciais *S. pileata*), nenhum indivíduo apresentou  $q > 0,9$ , entretanto os valores de  $q$  variam de 0,14 a 0,89 ( $0,51 \pm 0,25$ ) indicando que os *loci* utilizados não permitem distinguir híbridos F1 dos retrohíbridos, e para *S. bouvreuil*, não permitem separar com precisão também os retrohíbridos dos animais puros (Tabela 4).



**Figura 15:** Gráficos de saída do software STRUCTURE indicando a proporção genética dos 50 indivíduos híbridos simulados quando comparados com os indivíduos potencialmente puros da população de SBO. a) F1; b) F2; c) Retrohíbrido com Grupo A; d) Retrohíbrido com Grupo B.

**Tabela 4:** Análises Bayesianas de microsatélites com 50 genótipos simulados de cada classe híbrida, indicando os percentuais de indivíduos simulados corretamente designados como potencialmente híbridos, para os diferentes níveis de corte. Retro A representa retrocruzamentos dos híbridos F1 simulados com animais potencialmente puros de *S. boubreuil* e Retro B com *S. pileata*.

Classes simuladas	Níveis de confiança		
	90%	95%	99%
F1	100%	100%	100%
F2	100%	100%	100%
Retro A	60%	90%	100%
Retro B	100%	100%	100%

### 6.5. Testes de paternidade

Dos nove casais com paternidade dos filhotes testada, quatro foram compostos por indivíduos com haplótipos de DNAm<sub>t</sub> pertencentes a clados diferentes (*S. boubreuil* e *S. pileata*) e os filhotes tiveram a paternidade confirmada em dois destes casos, corroborando-se os método de observação direta e as análises de verossimilhança do software ML-Related, que indicou PO (parent-offspring) ou FS (full-sib) para todos os casos. Além disso, foi indicada pelas análises do programa ML-Related, a paternidade de um filhote com o macho de um território vizinho, que possui DNAm<sub>t</sub> diferente da fêmea. Em relação ao valor de  $q$  entre os membros dos casais com paternidade comprovada, apenas em um dos casos, ambos os pais apresentaram  $q > 0,90$  para o mesmo grupo. Mesmos nos ninhos com evidências de cópulas extra-par, onde foram identificados 2 ou mais loci em discordância com o macho ou indicados como *half-sib* ou *unrelated* pelas análises de verossimilhança, a relação de parentesco com as fêmeas foi confirmada através de ambos os métodos. Os valores de  $q$  variaram de 0,875 a 0,975 nos machos com paternidade confirmada, e nas fêmeas estes valores variaram de 0,68 a 0,94

(Tabela 5). A tabela com os genótipos dos casais e dos ninhegos utilizada para as análises de observação direta encontra-se no Anexo 5.

**Tabela 5:** Machos e fêmeas de cada casal, seus respectivos haplótipos mitocondriais (B = *bouvreuil* e P = *pileata*) e valores de  $q$  para cada grupo de possíveis puros. Ninhegos de cada casal e sua relação com o Macho e Fêmea: PO (*Parent-offspring*); FS (*Full-sib*), HS (*Half-sib*) e U (*unrelated*).

		$q$					
Casal	DNAmt	A	B	Ninhego	Relação Macho	Relação Fêmea	
M	B	0,025	0,975	Ninhego 1	PO	PO	
				Ninhego 2	PO	FS	
F	B	0,067	0,933	Ninhego 3	PO	PO	
				Ninhego 4	PO	PO	
				Ninhego 5	PO	FS	
M	P	0,764	0,236	Ninhego	U	FS	
F	P	0,943	0,057				
M	B	0,866	0,134	Ninhego	HS	FS	
F	B	0,32	0,68				
M	P	0,977	0,023	Ninhego	U	PO	
F	B	0,145	0,855				
M	P	0,937	0,063	Ninhego 1	FS	PO	
F	B	0,171	0,829	Ninhego 2	U	FS	
M	B	0,047	0,953	Ninhego	PO	FS	
F	B	0,68	0,32				
M	B	0,125	0,875	Ninhego	PO	PO	
F	B	0,145	0,855				
M	B	0,718	0,282	Ninhego	U	PO	
F	P	0,874	0,126				
M	B	0,125	0,875	Ninhego	PO	PO	
F	P	0,874	0,126				
M	P	0,975	0,025	Ninhego*	PO*	PO*	
F	B	0,145	0,855				

\*Indivíduo de cópula extra-par indicado pelas análises de verossimilhança através do programa ML-Related.

Dos 50 indivíduos adultos capturados e anilhados na temporada 2016-2017 que foram observados se reproduzindo ou defendendo território, 36% (n=18) foram observados novamente na temporada 2017-2018, no mesmo local ou próximo ao sítio reprodutivo utilizado

na temporada anterior. Destes, 56% (n=10) apresentaram valor de  $q < 0,9$ , enquanto que 44% (n=8) foram identificados como possivelmente puros para um dos grupos.

## 6.6. Estruturação populacional

A diferenciação genética entre as populações apresentou valores semelhantes tanto para os marcadores de microssatélites, quanto para a frequência de haplótipos de DNAm<sub>t</sub> nas populações. Entre as populações de EEI e SM foi observado um  $F_{ST}=0,000$  ( $P=0,02$ ) entre os marcadores de microssatélites e  $\Phi_{ST}=0,006$  ( $p=0,411$ ) indicando uma baixa estruturação. A população de SBO apresentou diferenciação gênica altamente significativa em relação as outras áreas estudadas. Considerando os marcadores de microssatélites, foi observado  $F_{ST}=0,013$  ( $P < 0,000$ ) em relação a EEI e  $F_{ST}=0,019$  ( $P < 0,000$ ) em relação a SM. Para a frequência de haplótipos de DNAm<sub>t</sub> foi observado o mesmo padrão, sendo  $\Phi_{ST}=0,1$  ( $P < 0,000$ ) em relação a EEI e  $\Phi_{ST}=0,163$  ( $P < 0,000$ ) em relação a São Manuel (Tabela 6).

**Tabela 6:** Valores  $F_{ST}$ ,  $\Phi_{ST}$  e de  $p$  entre as áreas estudadas, obtidos através da utilização os marcadores de microssatélites e de frequências haplotípicas de DNAm<sub>t</sub>, respectivamente. As áreas de estudo são Santa Bárbara d'Oeste (SBO), Estação Ecológica de Itirapina (EEI) e São Manuel (SM). Os valores entre parênteses representam a distância em quilômetros entre as áreas.

Área de estudo	Microssatélites		DNAm <sub>t</sub>	
	$F_{ST}$	$P$	$\Phi_{ST}$	$P$
SBO X EEI (83 km)	0,013	<0,000	0,100	<0,000
SBO X SM (104 km)	0,019	<0,000	0,163	<0,000
EEI X SM (70 km)	0,001	0,026	0,006	0,411

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Identificação da hibridização

O presente estudo traz o primeiro registro de hibridização entre os caboclinhos na natureza, o que pôde ser evidenciado: i) pela presença de machos com fenótipos não condizentes com seus haplótipos de DNAm<sub>t</sub>, ii) pelos níveis de hibridização de diversos indivíduos indicados pelas análises de microssatélites e iii) pela confirmação de casais reprodutivos com haplótipos de DNAm<sub>t</sub> representativos dos dois taxa envolvidos. Os valores de  $q$  observados nos machos, com pelo menos um filhote confirmado por paternidade, e nas fêmeas que se reproduziram sugerem que em ambos os sexos não apenas os híbridos F1 e F2, mas também os retro-híbridos com ambas as espécies parentais podem ser férteis. A maior frequência de machos com fenótipos intermediários e as frequências similares de haplótipos de DNAm<sub>t</sub> de *S. bouvreuil* e *S. pileata* em SBO, bem como a presença de animais puros de ambas as espécies sugere que esta área seja representativa de uma zona de hibridização. Por outro lado, a existência de haplótipos de DNAm<sub>t</sub> de *S. bouvreuil* e de indivíduos com plumagem intermediária em frequências decrescentes em EEI e SM, apesar da inexistência do fenótipo de *S. bouvreuil* nestas áreas, sugere que estas populações de *S. pileata* estejam dentro da zona de introgressão de *S. bouvreuil*, cuja influência parece diminuir em função da distância em relação à zona de hibridização.

Os valores médios de  $q$  simulados para as classes híbridas F1 e F2 estão próximos do que seria teoricamente esperado (Väli et al. 2010), entretanto, a alta sobreposição de intervalos de valores e o alto número de retrohíbridos com  $q > 0,90$  indicam que nossos marcadores poderiam falhar em atribuir os híbridos às suas categorias. Isso pode ser decorrente do número e características dos *loci* utilizados no estudo, além do fato da população de SBO ter características do que é conhecido como enxames híbridos (*hybrid swarm*) (Forbes e Allendorf

1991, Allendorf et al. 2001). O termo “enxames híbridos” refere-se a populações, nas quais todos os indivíduos têm algum grau de hibridização, devido ao extenso acasalamento entre híbridos e retrocruzamentos. Podem se formar mesmo se houver seleção contra híbridos porque toda a progênie de híbridos será híbrida e à medida que essas gerações vão se acumulando, a proporção de indivíduos de origem híbrida aumenta progressivamente, enquanto a proporção de indivíduos parentais diminui progressivamente até o ponto no qual as diferenças seletivas entre os indivíduos parentais e os híbridos tornam-se irrelevantes (Allendorf et al. 2001). Entretanto, esta variação na capacidade de identificação das diferentes classes híbridas não interfere em no objetivo principal do presente estudo que visa identificar a hibridização e reprodução dos indivíduos resultantes de cruzamentos heteroespecíficos.

Estes dados também sugerem que, apesar de os cruzamentos entre indivíduos de origem haplotípica das duas espécies ocorrerem aleatoriamente e aparentemente sem nenhum tipo de barreira ecológica ou comportamental na zona de contato entre as espécies, a zona de hibridização está contida. Mesmo envolvendo taxa com divergência muito recente, e na ausência de mecanismos de isolamento reprodutivo pré- e pós-copulatórios e pré- e pós-zigóticos na zona de hibridização, e mesmo tratando-se de organismos com amplo poder de dispersão, ainda assim não existem indícios de miscigenação entre os dois taxa.

## **7.2. Mecanismos de contenção da zona de hibridização**

As hibridizações entre *S. bouvreuil* e *S. pileata* indicam uma maior proximidade filogenética e um menor tempo de divergência entre estes dois taxa do que entre os demais caboclinhos, bem como diferentes mecanismos de isolamento das espécies. Espécies como *S. palustris*, *S. hypoxantha*, *S. melanogaster*, *S. ruficollis* e mesmo *S. pileata* se reproduzem em simpatria em regiões do sul do Brasil e na Argentina e Paraguai e ainda assim não existem registros de híbridos entre estas espécies na natureza (Campagna et al. 2018). Entre estas espécies, o desenvolvimento de mecanismos de isolamento pré-copulatórios parecem ter sido

fundamentais para o isolamento reprodutivo, uma vez que mecanismos de isolamento relacionados à seleção de habitats parecem não existir, já que podem se reproduzir em simpatria, nas mesmas áreas úmidas e formam bandos mistos durante as migrações e nas áreas de invernada, comumente se alimentando lado a lado dos mesmos recursos (Maurício et al. 2013, Benites et al. 2015, Cavarzere et al. 2015). Ao que parece, pelo menos para *S. hypoxantha* e *S. palustris*, o canto é um dos principais mecanismos de identificação de rivais (Benites et al. 2015) e em aves, esses mesmos mecanismos são utilizados pelas fêmeas para a identificação e seleção dos parceiros reprodutivos (Baker e Baker 1990, Baker 1991, Searcy et al. 1997, Patten et al. 2004). Os machos de caboclinhos estudados pelos autores apresentaram um comportamento agonístico superior em resposta à reprodução da vocalização de sua própria espécie, em comparação a *playbacks* de vocalizações da outra espécie de caboclinho e de uma terceira espécie de *Sporophila* mais distante em relação ao grupo (*S. collaris*) (Benites et al. 2015). Essa resposta diferencial não foi observada entre *S. pileata* e *S. bouvreuil*, em SBO, visto que no presente trabalho indivíduos de todos os fenótipos foram capturados utilizando *playbacks* de *S. pileata*.

As análises de estruturação populacional podem contribuir para a avaliação da filopatria como uma potencial hipótese para explicar a contenção da zona de hibridização. Esta hipótese foi levantada principalmente porque organismos que habitam áreas úmidas tendem a apresentar altos níveis de estruturação genética, uma vez que os brejos, por exemplo, são ambientes naturalmente fragmentados (Camargo et al. 2015). No presente estudo existem evidências que corroboraram esta hipótese, principalmente os altos graus de estruturação genética observadas tanto em marcadores nucleares quanto mitocondrial entre a população de SBO e EEI e SM. Apesar da não existência de estruturação em nível de DNAm entre EEI e SM, para os marcadores nucleares de microssatélites a estruturação foi pequena, mas significativa, mesmo diante de uma distância geográfica tão pequena entre estas áreas (70 km). Além disso, vários

indivíduos foram observados frequentemente nas três áreas, no mesmo sítio reprodutivo, em diferentes temporadas, sugerindo uma alta fidelidade ao sítio reprodutivo. Para passeriformes migratórios, a dispersão reprodutiva é frequentemente mais restrita que a dispersão de indivíduos jovens, resultando em maior filopatria reprodutiva do que filopatria natal, e isso está muitas vezes relacionado à estrutura e disponibilidade do habitat, já que as características de cada área podem influenciar o sucesso reprodutivo de possíveis indivíduos migrantes de outras populações e contribuem para a estruturação populacional (Hansson et al. 2002, Cline et al. 2013). No entanto, estes mecanismos não criam uma barreira completa, uma vez que existem níveis de introgressão gênica. Dado que as populações de Itirapina e São Manuel se encontram fora da zona de distribuição de *S. bouvreuil*, a presença de haplótipos de DNAm de *S. bouvreuil* nestas populações possivelmente se deva à imigração de indivíduos híbridos, que possam ter complexos adaptativos que os permitem dispersar para o interior da zona de distribuição de *S. pileata*. Isto sugere a existência de barreiras ecológicas entre os dois taxa parentais. As áreas estudadas têm particularidades quanto à formação vegetal. Os ambientes amostrados na EEI e SM estão dentro do domínio do Cerrado, enquanto a distribuição de *S. bouvreuil* abrange principalmente brejos de domínio da Mata Atlântica, estando SBO em uma região de transição entre estes dois biomas.

De acordo com a regra de Haldane (Haldane 1922) o sexo heterogâmico tende a sofrer mais com inviabilidade e esterilidade, devido a incompatibilidades nos cromossomos sexuais (Mallet 2005). No caso das aves, onde as fêmeas são o sexo heterogâmico, esse fato tende a evitar a transmissão mitocondrial como acontece nas zonas híbridas entre *Phylloscopus collybita* e *P. brehmii*, na Espanha e França, onde a proporção de fluxo gênico entre genes nucleares é 75 vezes maior do que dos mitocondriais, indicando que ocorre uma seleção contra as fêmeas híbridas (Helbig et al. 2001). Já no caso dos híbridos entre *Milvus milvus* e *M. migrans* não foi observada nenhum indivíduo com haplótipo mitocondrial de uma espécie e

fenótipo da outra, com exceção dos híbridos F1 (Henenberg et al. 2016). No presente estudo haplótipos de ambas as espécies foram encontrados em todos os fenótipos em SBO e cinco fêmeas com valor de  $q < 0,9$  se reproduziram e seus filhotes foram observados meses depois de deixar o ninho. Por se tratar de um grupo com diferenciação recente, estimado para o Pleistoceno (Campagna 2011, 2013), talvez as diferenciações gênicas entre os caboclinhos não comprometam a viabilidade dos híbridos, se concentrando principalmente nos genes ligados a pigmentação (Campagna et al. 2017). No entanto, estudos futuros deverão analisar se diferentes classes de híbridos podem diferir no sucesso reprodutivo. Outro mecanismo que deve ser testado no futuro diz respeito ao *fitness* dos indivíduos oriundos de cruzamentos heteroespecíficos, que podem sofrer com a seleção sexual por parte dos parentais puros (Coyne e Orr 2004, Price 2007).

Quando se trata de espécies migratórias, a habilidade de geolocalização dos indivíduos oriundos de cópulas heteroespecíficas pode ser outro fator que pode influenciar o sucesso durante a fase adulta (Rohwer e Manning 1990, Helbig 1991, Ruegg 2007, Rohwer e Irwin 2011, Ilieva et al. 2012), uma vez que os indivíduos frutos de cruzamentos heteroespecíficos podem ter seus movimentos alterados em relação à direção ou distância (Delmore et al. 2014). Delmore et al. 2014 verificaram que, em comparação com as formas parentais os indivíduos híbridos de *Catharus ustulatus* e *C. swainsoni* exibem variabilidade nas rotas migratórias empregadas. As espécies parentais se hibridizam nas montanhas a Oeste da América do Norte e cada uma migra para o sul em diferentes rotas, com um grupo migrando ao longo da costa oeste da América do Norte para o México, Guatemala e Honduras e outro grupo migrando através do centro-leste da América do Norte para Columbia e Venezuela. Já os híbridos usaram rotas intermediárias ou mistas durante a migração, e também alguns indivíduos exibiram mudanças nos locais de invernada, que abrangeram quase toda a extensão das longitudes entre os locais de invernada das espécies parentais. Em SBO, com exceção de um casal, todos os

indivíduos que foram observados se reproduzindo ou defendendo território na temporada 2017-2018, foram capturados e anilhados na área na temporada 2016-2017. Além disso, as proporções de indivíduos potencialmente puros e híbridos que retornaram à área na última estação reprodutiva se mostraram semelhantes. Esse fato pode ser um indicativo de que a hibridização não afeta a capacidade de localização ou então, como ocorre com os *Catharus*, isso não tem grande impacto sobre os híbridos. Muitas espécies de caboclinhos são observadas migrando e se alimentando em simpatria fora da estação reprodutiva, e embora ainda desconhecidas, as rotas migratórias e os pontos de parada dessas espécies podem ser convergentes, não tendo grandes impactos nos indivíduos híbridos (Toews et al. 2017). Isso pode explicar o fato de um dos indivíduos de *S. bouvreuil* cuja sequência de DNAm se encontra depositada no GENBANK (KF316369), ter sido identificado com haplótipo de *S. pileata*. Segundo Campagna et al. 2013, esse indivíduo foi capturado no Município de Santana do Araguaia, estado do Pará. Essa área compreende um ecótono de Cerrado e Floresta Amazônica, onde foram observados bandos mistos de cerca de 1000 indivíduos, compostos 90% de *S. bouvreuil* e *S. plumbea*, além de outras espécies de caboclinhos como *S. palustris*, *S. ruficollis* e *S. hypoxantha*, se alimentando de sementes de *Brachiaria decumbens* presentes nas fezes de gado bovino (Cavarzere et al. 2015, Silveira LF, comun. pess.). Por se tratar de uma área de invernada com grande concentração de aves, é possível que indivíduos de diferentes populações se agrupem nesse local.

Poucos estudos envolvendo hibridização de espécies conseguem acessar os casais bem como os filhotes, devido às dificuldades logísticas para a coleta desse tipo de informação. Dois estudos com Acciptriformes na Europa, foram capazes de identificar a composição dos casais a ponto de verificar que apenas machos F1 eram capazes de se reproduzir, devido a inviabilidade das fêmeas (Regra de Haldane) (Helbig 2005, Heneberg 20016). Já com Passeriformes, Walsh et al. (2018) monitorou 348 indivíduos adultos e 342 ninhos em uma zona de hibridização de

*Ammodramus caudacutus* e *A. nelsoni*, observando um forte acasalamento seletivo por partes dos indivíduos puros e um menor sucesso reprodutivo em ninhos com pais F1 e F2. Acasalamento seletivo também foi observado, principalmente, por parte das fêmeas em uma zona de contato entre *Phylloscopus collybita* e *P. brehmii* (Helbig et al. 2001). Aliado a isso, os autores também observaram um menor fluxo de gênico nos marcadores mitocondriais em relação aos microssatélites. Nos trópicos, esse tipo de estudo foi realizado apenas com os tentilhões de Galápagos. Assim, as duas espécies de cruzamento apresentaram padrões de aptidão um pouco diferentes sob o mesmo conjunto de condições ambientais. Grant e Grant (2001) verificou que a hibridização entre *Geospiza scandens* e *G. fortis* pode melhorar a aptidão em diferentes graus, diminuindo os efeitos da endogamia. Recentemente, Lamichhaney et al. 2018 descreveram o surgimento de uma nova linhagem genética residente na Ilha de Daphne Maior. Um indivíduo jovem de *Geospiza conirostris* imigrante da Ilha de Española reproduziu-se com *G. fortis*, nativa da Ilha Daphne Maior. Após 6 gerações de intensa endogamia os híbridos tronaram-se uma linhagem ecologicamente bem-sucedida e distinta, devido a adaptações favoráveis como o tamanho do bico e o som distinto da espécie residente.

### **7.3. Importância de estudos de zonas híbridas e implicações para conservação**

Algumas zonas híbridas são naturais e estáveis, no entanto, as alterações antrópicas no ambiente podem resultar no aumento da taxa temporal e da escala geográfica da hibridização através da fragmentação do habitat, mudança climática e introdução de espécies, revertendo processos evolutivos que resultaram em divergências ao longo de milhões de anos em algumas gerações (Rhymer e Simberloff 1996, Taylor et al. 2014). O resultado dessa ruptura nos processos evolutivos pode levar ao declínio populacional das espécies envolvidas ou até no desaparecimento de uma das espécies parentais (Henenberg et al. 2016). Na Nova Zelândia, a introdução de *Anas platyrhynchos* passou gerar indivíduos híbridos com espécie nativa *A. superciliosa*, cujas populações já se encontravam em declínio devido à perda de habitat,

colocando a espécie em risco de desaparecer em sua forma pura Rhymer et al. (1994). Nas aves, um dos casos mais estudados no que se refere a contato secundário de espécies, promovido pela fragmentação e perda de habitat, e consequente hibridização (Gill 1980, Confer et al. 2010, Patton et al. 2010, Moulton et al. 2017) envolve as espécies *Vermivora chrysoptera* e *V. cyanoptera* (*V. pinus*). Ambas têm preferência por habitats reprodutivos ambientes em estágio inicial de sucessão, porém *V. chrysoptera* era distribuída originalmente em maiores latitudes e altitudes do que a *V. cyanoptera*, separadas por grandes contínuos de floresta. Com o intenso desmatamento leste da América do Norte, nos últimos 150 anos, as populações alópatricas entraram em contato e na maioria dos casos, a simpatria resultou em hibridização e introgressão genética. Com exceção de poucas áreas, onde as zonas híbridas parecem em equilíbrio (Confer et al. 2010, Patton et al. 2010), as demais zonas de contato parecem estar se expandindo (Moulton et al. 2017).

Identificar e entender a dinâmica das zonas híbridas nos permite compreender os fatores que levam a esse fenômeno e, mais importante, a influência dos impactos antrópicos na dinâmica dessas áreas (Figarski e Kajtoch 2018). Uma das principais demandas atuais é entender como as mudanças climáticas afetam os processos ecológicos das espécies e o monitoramento de zonas híbridas, através do seu deslocamento, expansão ou retração, pode uma ferramenta importante nesse diagnóstico (Buggs et al. 2007). Nesse sentido, La Morgia e Venturino (2017) discutem a respeito do equilíbrio existente entre três populações de lebres na Europa. As espécies de *Lepus europaeus* e *L. timidus* ocorrem em habitats distintos e as populações híbridas, em regiões de ecótono entre esses ambientes, onde não apresentam desvantagens competitivas em relação as espécies parentais, mantendo as três populações em equilíbrio. Entretanto, através de modelagens, os autores concluem que intervenções humanas no ambiente, ou até mesmo mudanças climáticas, podem vir a colocar as espécies em contato direto, ocasionando a homegeinização.

Zonas híbridas podem ser parte importante na história evolutiva das espécies, inclusive, explicando a sua origem (Mavarez e Linares 2008, Abbott et al. 2013, Schumer et al. 2014, Lamichhaney et al. 2018). Introgressões gênicas podem gerar troca de material genético entre espécies, resultando em um ganho na capacidade adaptativa e evolutiva das mesmas, ou em alguns casos, gerar novas radiações adaptativas, ou seja, a evolução da diversidade ecológica e fenotípica dentro de uma linhagem de multiplicação rápida (Seehausen 2004). Em outras palavras, se uma população que contém variação suficiente em regiões gênicas funcionais chega em uma paisagem adaptativa que compreende múltiplos nichos subutilizados, várias populações de genótipos funcionais podem emergem rapidamente por múltiplos eventos de especiação ecológica, resultando muitas vezes em novas espécies, como no caso dos ciclídeos do Lago Victoria, na África (Johnson et al. 2000, Nagl et al. 2000). Mais tardiamente, após a radiação progredir para um estágio com duas ou mais espécies incipientes, a hibridização ocasional ou localizada entre essas espécies facilitaria a diversificação ecológica, através da rápida geração, por hibridização, de novas combinações de características adaptativas, a hibridização manteria e prolongaria o momento de radiação adaptativa (Seehausen 2004). A probabilidade de genótipos híbridos recombinantes encontrarem nichos subutilizados, que podem incluir fenótipos ou traços de seleção sexual, nos quais eles desfrutam de uma aptidão igual ou superior à de seus pais diminuiria, assim como a frequência de hibridização interespecífica e menos populações de genótipos híbridos seriam estabelecidas como novas espécies, enquanto incompatibilidades genômicas começariam a se acumular entre as espécies existentes (Seehausen 2004). Tal mecanismo foi recentemente sugerido para explicar a rápida evolução dos anéis de mimetismo nas borboletas *Heliconius* (Kronforst 2008) e nos tentilhões de Galápagos (Grant e Grant 1996, Freeland e Boag 1999). No caso dos caboclinhos Campagna et al. (2017) sugere que a diferenciação do grupo pode ter se dado a partir de uma abundante população ancestral que possibilitou uma grande variação genética e, posteriormente, em

alopatria, essas diferenças teriam se acumulado entre as espécies e em um terceiro momento foram trocadas via hibridização, dando origem as variações na plumagem dos machos, entretanto, a hibridização na natureza ainda não havia sido confirmada para o grupo e considerando essa hipótese, os mecanismos envolvidos na evolução das espécies de caboclinhos podem ser semelhantes aos dos tentilhões de galápagos, evidenciando a importância de preservar essa zona de contato entre as espécies, para futuros estudos.

Além de auxiliar no diagnóstico de possíveis alterações ambientais, a identificação e conhecimento a respeito das zonas híbridas podem ser umas das ferramentas a serem utilizadas em planos de recuperação de áreas degradadas, de estabelecimento de unidades de conservação, e na escolha das áreas para a reintrodução de indivíduos na natureza. No caso dos caboclinhos, particularmente, por pertencer a um gênero muito procurado por caçadores, e frequentemente apreendido pelas autoridades, a identificação de uma zona híbrida deve ser considerada durante a destinação e soltura dessas aves na natureza, principalmente quando se trata de fêmeas, que são indistinguíveis morfologicamente, resultando na soltura de indivíduos de espécies diferentes em áreas onde a introgressão é menor ou inexistente, podendo resultar no aumento da zona de hibridização. Somado a isso, se tratam de espécies que se reproduzem em áreas úmidas que estão entre os ambientes mais ameaçados do mundo por conta da expansão da agricultura e urbanização (Semlitsch e Bodie 1998, Mitsch e Gosselink 2000), além de já possuírem características próprias por serem naturalmente isoladas (Gibbs 2000, Vermaat et al. 2008). Apesar dos dados aqui apresentados não permitiram concluir se existem adaptações locais e se a estrutura de cada área influencia na aptidão dos indivíduos, a manutenção de cada uma dessas áreas, com suas características particulares bem como a destinação correta de indivíduos para a reintrodução são as estratégias mais corretas para a conservação dos caboclinhos que reproduzem no Estado de São Paulo, até que futuros trabalhos possam elucidar essas relações.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresenta o primeiro registro de uma zona híbrida para o gênero *Sporophila* e está entre os poucos estudos em zonas híbridas com aves a monitorar ninhegos e casais. Os resultados aqui obtidos, mostram que *S. pileata* e *S. bouvreuil* se reproduzem livremente na zona de contato, produzindo híbridos viáveis e férteis. Os indivíduos com plumagem intermediária e apresentando haplótipo mitocondrial de *S. bouvreuil*, registrados nas áreas onde a espécie não foi observada, sugerem uma possível existência de fluxo gênico da zona de contato em direção à área de ocorrência de *S. pileata*, pelo menos na escala estudada.

Assim como outros caboclinhos, *S. pileata* encontra-se ameaçado de extinção e conhecer a extensão dessa zona de introgressão gênica entre as espécies bem como entender os mecanismos envolvidos na sua manutenção podem fornecer subsídios para compreender melhor a história evolutiva do grupo e ajudar a traçar programas de conservação mais eficazes, principalmente em uma matriz fragmentada como encontrada no Estado de São Paulo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott R, Albach D, Ansell S, et al.(2013). Hybridization and speciation. *J Evol Biol* 26: 229–246.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16: 613–622.
- Alvares CA, JL Stape JL, Sentelhas, PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol Z* 22: 711–728.
- Anderson BW, Daugherty RJ. (1974) Characteristics and reproductive biology of grosbeaks (*Pheucticus*) in the hybrid zone in South Dakota. *WilsonBull* 86:1–11.
- Areta JI (2008) The Entre Rios Seedeater (*Sporophila zelichi*): A species that never was. *J. Field Ornithol.* 79: 352–363.
- Areta JI, Almirón D (2009) Comentarios sobre la presencia, voces y alimentación Del Corbatita Overo *Sporophilalineaola* a orilla de los rios Paraná e Iguazú em Misiones, Argentina. *Cotinga*, 31:59-62.
- Areta JI, Dornas T, Kirwan GM, Araújo-Silva LE, Aleixo A (2017) Mixing the waters: a linear hybrid zone between two riverine Neotropical cardinals (*Paroaria baeri* and *P. gularis*), *Emu - Aust Ornithol* 117:40-50, DOI: 10.1080/01584197.2016.1266447.
- Areta JI, Noriega JI, Pagano L, Roesler I. (2011) Unravelling the ecological radiation of the capuchinos: Systematics of Dark-throated Seedeater *Sporophila ruficollis* and description of a new dark-collared form. *Bull Br Ornithol Club* 131: 4–23.
- Areta JI, Repenning M. Systematics of the Tawny-bellied Seedeater (*Sporophila hypoxantha*). (2011) Taxonomy and evolutionary implications of the existence of a new tawny morph. *Condor* 113: 678–690.

- Areta JI1, Piacentini VQ, Haring E, Gamauf A, Silveira LF, Machado E, Kirwan GM (2016) Tiny Bird, Huge Mystery-The Possibly Extinct Hooded Seedeater (*Sporophila melanops*) Is a Capuchino with a Melanistic Cap. PLoS One. 11;11(5):e0154231. doi: 10.1371/journal.pone.0154231.
- Arnold ML (2006) Evolution through genetic exchange. Oxford University Press, Oxford.
- Arnold ML, Bennett BD (1993) Natural hybridization in Louisiana irises: genetic variation and ecological determinants. Biosci 72a: 115–39.
- Arnold ML, Martin NH (2009) Adaptation by introgression. J Biol 8: 82.
- Arnold, ML (1997) Natural hybridization and evolution. New York: Oxford University Press.
- Barrera-Guzmán AO, Aleixo A, Shawkey MD, Weir JT (2018) Hybrid speciation leads to novel male secondary sexual ornamentation of an Amazonian bird. Proc Natl Acad Sci U S A.;115(2):218-225. doi: 10.1073/pnas.1717319115. Epub 2017 Dec 26.
- Barton NH, Gale KS (1993) Genetic analysis of hybrid zones. Pp. 13–14. in R. G. Harrison, ed. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford Univ Press, Oxford, U.K.
- Barton NH, Hewitt GM (1985). Analysis of hybrid zones. Annu Rev Ecol Syst 16:113–148.
- Barton NH, Hewitt GM (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. Nature 341: 497–503.
- Benites P, Eaton MD, Lijtmaer DA, Loughheed SC, Tubaro PL (2010) Analysis from avian visual perspective reveals plumage colour differences among females of capuchino seedeaters (*Sporophila*). J Avian Biol 41:597–602.
- Benites P, Campagna L, Tubaro PL (2015) Song-based species discrimination in a rapid Neotropical radiation of grassland seedeaters. J Avian Biol 46(1): 55–62.

- Biagolini-Jr C, Costa MC, Perrella, DL F, Zima PVQ, Ribeiro-Silva, L, Francisco MR (2016) Extra-pair paternity in a Neotropical rainforest songbird, the White-necked Thrush *Turdus albicollis* (Aves: Turdidae). *Zoologia* 33:e20160068.
- Birkhead TR, Brilliard JP (2007) Reproductive isolation in birds: postcopulatory prezygotic barriers. *Trends Ecol Evol*: 22:266–272. [PubMed: 17306413].
- Bronson CL, Grubb TC Jr, Braun MJ (2003) A test of the endogenous and exogenous selection hypotheses for the maintenance of a narrow avian hybrid zone. *Evolution*. 57(3):630–7.
- Bronson CL, Grubb TC, Braun MJ (2003) A test of the endogenous and exogenous selection hypotheses for the maintenance of a narrow avian hybrid zone. *Evolution*. 57: 630–637.
- Brumfield RT (2010). Speciation genetics of biological invasions with hybridization. *Mol. Ecol*. 19: 5079–5083.
- Buggs RJA (2007) Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity* 99:301–312.
- Burns KJ, Hackett SJ, Klein NK (2002) Phylogenetic relationships and morphological diversity in Darwin's finches and their relatives. *Evolution* 56: 1240-1252.
- Burns KJ, Shultz AJ, Title PO, Mason NA, Barker FK, Klicka J, Lanyon SM, Lovette IJ (2014) Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Mol Phylogenet Evolution*. 75:41–77 doi: 10.1016/j.ympev.2014.02.006.
- Campagna L, Benites P, Loughheed SC, Lijtmaer DA, Digiacomio AS, Eaton MD, Tubaro PL (2012). Rapid phenotypic evolution during incipient speciation in a continental avian radiation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 279:1847–1856.

- Campagna L, Gronau I, Silveira LF, Siepel A, Lovette IJ (2015) Distinguishing noise from signal in patterns of genomic divergence in a highly polymorphic avian radiation. *Mol. Ecol.* 24: 4238–4251. <https://doi.org/10.1111/mec.13314> PMID: 26175196.
- Campagna L, Repenning M, Silveira LF, Fontana CS, Tubaro PL, Lovette IJ (2017) Repeated divergent selection on pigmentation genes in a rapid finch radiation. *Sci. Adv.* 3: e1602404. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602404> PMID: 28560331.
- Campagna L, Silveira LF, Tubaro PL, Loughheed SC (2013) Identifying the sister species to the rapid capuchino seedeater radiation (*Sporophila*, Passeriformes). *Auk* 130: 645–655.
- Campagna, L., L. F. Silveira, P. L. Tubaro, and S. C. Loughheed. 2013. Identifying the sister species to the rapid capuchino seedeater radiation (Passeriformes: *Sporophila*). *Auk* 130:645–655.
- Castoe TA, Poole AW, Koning APJ, Jones KL, Tomback DF, Oyler-McCance SJ, Fike JA, Lance SL, Streicher JW, Smith EN, Pollock DD (2012). Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS One* 7:e30953.
- Cavarzere V, Del-Rio GC, Schunck F, Piacentini VQ, Rêgo MA, Somenzari M, Silveira LF (2015) Wintering *Sporophila* seedeaters in an Amazonian-Cerrado ecotone in central Brazil. *Cotinga* 37: 57–58.
- Čížková D, Javurková V, Champagnon J, Kreisinger J (2012) Duck's not dead: Does restocking with captive bred individuals affect the genetic integrity of Wild Mallard (*Anas platyrhynchos*) population? *Biol Cons* 152: 231–240.
- Cline MH, Strong AM, Sillett TS, Rodenhouse NL, Holmes RT (2013) Correlates and consequences of breeding dispersal in a migratory songbird. *Auk* 130:742–752.
- Comincini S, Leone P, Redaelli L, Giuli L, Zhang Y, Ferretti L (1995) Characterization of bovine microsatellites by silver staining. *J An Breed Gen* 112:415–420.

- Confer JL, Barnes KW, Alvey EC (2010) Golden- and Blue-winged Warblers: distribution, nesting success, and genetic differences in two habitats. *Wilson J Ornithol* 122:273–278.
- Coyne, J.A. and Orr, H.A. (2004) *Speciation*, Sinauer Associates.
- Davidson BS, Sattler GD, Via S, Braun MJ (2013) Reproductive isolation and cryptic introgression in a sky island enclave of Appalachian birds. *Ecol Evol* 3(8): 2485–2496. <https://doi.org/10.1002/ece3.604>.
- del Hoyo J, Collar N (2018) Ibera Seedeater (*Sporophila iberaensis*). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E (eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Disponível em: <https://www.hbw.com/node/1344182>. Acesso em: 21 de julho de 2018.
- del Hoyo J, Collar N (2018) Pearly-bellied Seedeater (*Sporophila pileata*). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E (eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Disponível em: <https://www.hbw.com/node/1344183> on 3 August 2018. Acesso em: 21 de julho de 2018.
- del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E. (eds.) (2018). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Disponível em: <http://www.hbw.com/>. Acesso em: 30 de junho de 2018.
- Delmore KE, Irwin DE (2014) Hybrid songbirds employ intermediate routes in a migratory divide. *Ecol Lett* 17: 1211–1218.
- Di Giacomo AS, Kopuchian C (2016) Una nueva especie de capuchino (*Sporophila*: Thraupidae) de los Esteros del Iberá, Corrientes, Argentina. *Nuestras Aves* 61: 3–5.
- Dornas T, Pacheco JF, Olmos F (2013) Ocorrência de caboclinhos austrais (Emberizidae, *Sporophila* sp.) no Cerrado Norte, Brasil: extensão da distribuição geográfica e implicações para conservação. *Atual Ornitol On-line*, 176: 58–63.

- Durigan G, Franco GADC, Siqueira MF (2004) A vegetação dos remanescentes de Cerrado no estado de São Paulo [The vegetation of Cerrado remnants in São Paulo State]. In: Bitencourt MD, Mendonça RR (eds.) Annablume, Fapesp, São Paulo.
- Endler JA (1977) Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press; Princeton, NJ.
- Excoffier L, LischerHEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-567.
- Felsenstein J (1981). Evolutionary trees from dna sequences: A maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368–376.
- Figarski T, Kajtoch Ł (2018) Hybrids and mixed pairs of Syrian and Great-spotted Woodpeckers in urban populations *J Ornithol* 159: 311. <https://doi.org/10.1007/s10336-017-1513-0>.
- Fleischer RC, Tarr CL, Morton ES (1997) Mating system of the Dusky Antbird, a tropical passerine, as assessed by DNA fingerprinting. *The Condor* 99: 512-514. doi: 10.2307/1369957
- Fontana CS, Bencke GA, Reis RE (2003) Livro Vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Edipucrs, Porto Alegre.
- Forbes SH, Allendorf FW (1991) Associations between mitochondrial and nuclear genotypes in cutthroat trout hybrid swarms. *Evolution* 45: 1332–1349.
- Francisco MR (2006) Breeding biology of the Double-collared Seedeater (*Sporophila caerulescens*). *Wilson J of Ornithol* 118:85–90.
- Francisco MR (2009). First description of nests and eggs of the White-bellied Seedeater (*Sporophila leucoptera*). *Wilson J of Ornithol* 121:628–630.

- Franz I, Fontana CS (2013) Breeding biology of the Tawny-Bellied Seedeater (*Sporophila hypoxantha*) in Southern Brazilian upland grasslands. *Wilson J of Ornithol* 125:280–292.
- Freeland JR, Boag PT (1999) The mitochondrial and nuclear genetic homogeneity of the phenotypically diverse Darwin's ground finches. *Evolution* 53: 1553–1563.
- Freitas MS, Medolago CAB, Costa MC, Telles M, Francisco MR, Motta-Junior JC (2018) First description of nests, eggs, and nestlings of the Pearly-bellied Seedeater (*Sporophila pileata*). *The Wilson Journal of Ornithology* In-Press.
- Gelman A, Rubin D (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.* 7:457–472.
- Gibbs JP (2000) Wetland Loss and Biodiversity Conservation. *Conserv Biol* 14: 314–317.
- Godinho R, Llana L, Blanco JC, Lopes S, Álvares F, García EJ, et al (2011) Genetic evidence for multiple events of hybridization between Wolves and Domestic Dogs in the Iberian Peninsula. *Mol Ecol* 20: 5154–5166.
- Gompert Z, Lucas LK, Nice CC, Buerkle CA (2013) Genomic divergence and the genetic architecture of barriers to gene flow between *Lycaeides Idas* and *L. Melissa*. *Evolution*. 67: 2498–514.
- Grant BR, Grant PR (1996) High survival of Darwin's finch hybrids: effects of beak morphology and diets. *Ecology* 77:500–509.
- Grant PR, Grant BR (1992) Hybridization of bird species. *Science* 256(5054):193–7.
- Grant PR, Grant BR, Keller LF, Markert JA, Petren K (2003) Inbreeding and interbreeding in Darwin's Finches. *Evolution* 57: 2911–2916.
- Haffer J (1997). Contact zones between birds of southern Amazonia. *Ornithol Mon* 48: 281–305. doi:10.2307/40157539.

- Haldane JBS (1922) Sex-ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J Genet* 12: 101–109.
- Hansson B, Bensch S, Hasselquist D, Nielsen B (2002) Restricted dispersal in a long-distance migrant bird with patchy distribution, the Great Reed Warbler. *Oecol* 130:536–542.
- Harrison RD (1993) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, New York.
- Harvey MG et al (2014) The avian biogeography of an Amazonian headwater: the Upper Ucayali River, Peru. *Wilson J Ornithol* 126: 179–191.
- Hedrick PW (2013) Adaptive introgression in animals: examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Mol Ecol* 22:4606–4618. doi:10.1111/mec.12415.
- Helbig AJ (1991) Inheritance of migratory direction in a bird species: a cross-breeding experiment with SE- and SW-migrating blackcaps (*Sylvia atricapilla*). *Behav Ecol Sociobiol* 28:9–12.
- Heneberg P, Dolinay M, Matušík H et al (2016) Conservation of the Red Kite *Milvus milvus* (Aves: Accipitriformes) Is Not Affected by the Establishment of a Broad Hybrid Zone with the Black Kite *Milvus migrans migrans* in Central Europe. *PLoS One* 27(7):e0159202. doi: 10.1371/journal.pone.0159202.
- Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22: 4673–4680.
- Ilieva M, Toews DPL, Bensch S, Sjöholm C, Åkesson S (2012) Autumn migratory orientation and displacement responses of two willow warbler subspecies (*Phylloscopus trochilus trochilus* and *P. t. acredula*) in South Sweden. *Behav Processes* 91:253–261 DOI 10.1016/j.beproc.2012.09.005.

- IUCN 2018. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-1. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 05 de julho de 2018.
- Jaramillo A (2018) Copper Seedeater (*Sporophila bouvreuil*). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA, de Juana E (eds.). Handbook of the Birds of the World Alive. Lynx Edicions, Barcelona. Disponível em: <https://www.hbw.com/node/62128>. Acesso em 3 de agosto de 2018).
- Jiggins CD, Mallet J (2000) Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends Ecol Evol* 15: 250–255.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099–1106.
- Kerr KCR, Lijtmaer DA, Barreira AS, Hebert PDN, Tubaro PL (2009) Probing evolutionary patterns in Neotropical birds through DNA Barcodes. *Plos One* 4: e4379.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111–120.
- Klicka J, Zink RM (1997) The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science* 277:1666–1669.
- Kronforst MR (2008) Gene flow persists millions of years after speciation in *Heliconius* butterflies. *BMC Evol Biol* 8:98 doi:10.1186/1471-2148-8-98.
- Kroodsma RL (1974) Hybridization in grosbeak (*Pheucticus*) in North Dakota. *Wilson Bull* 86:230–236.
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874.

- La Morgia V, Venturino E (2017) Understanding hybridization and competition processes between hare species: Implications for conservation and management on the basis of a mathematical model, *Ecolog Model* 364: 13–24 doi:10.1016/j.ecolmodel.2017.09.002.
- Lamichhaney S, Han F, Webster MT, Andersson L, Grant BR, Grant PR (2018) Rapid hybrid speciation in Darwin's finches. *Science* 359(6372):224–228 doi: 10.1126/science.aao4593. Epub 2017 Nov 23.
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution formolecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol.* doi: dx.doi.org/10.1093/molbev/msw260.
- Lawson AM, Weir JT (2014) Latitudinal gradients in climatic-niche evolution accelerate trait evolution at high latitudes. *Ecol Lett* 17: 1427–1436. doi:10. 1111/ele.12346.
- Lijtmaer DA, Sharpe NM, Tubaro PL, Lougheed SC (2004) Molecular phylogenetics and diversification of the genus *Sporophila* (Aves: Passeriformes). *Mol Phylogenet Evol* 33: 562–579https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.011.
- Liu IA, Johndrow JE, Abe J, Lüpold S, Yasukawa K, Westneat DF, Nowicki S (2015) Genetic diversity does not explain variation in extra-pair paternity in multiple populations of a songbird. *J Evol Biol*28: 1156–1169.
- Luo SJ, Johnson WE, Martenson J, Antunes A, Martelli P, Uphyrkina O, et al (2008) Subspecies genetic assignments of worldwide captive tigers increase conservation value of captive populations. *Curr Biol.* 18: 592–596. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.053 PMID: 18424146.
- Machado E, Silveira LF (2010) Geographical and seasonal distributions of the seedeaters *Sporophila bouvreuil* and *Sporophila pileata* (Aves: Emberizidae). *Pap Avulsos Zool* 50:517–533.
- Machado E, Silveira LF (2011) Plumage variability and taxonomy of the Capped Seedeater *Sporophila bouvreuil* (Aves: Passeriformes: Emberizidae). *Zootaxa* 2781:49–62.

- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol* 20: 229–237.
- Martin P R, Montgomerie R, Lougheed SC (2010) Rapid sympatry explains greater color pattern divergence in high latitude birds. *Evolution* 64:336–347.
- Martin TE, Geupel GR (1993) Nest-monitoring plots: methods for locating nests and monitoring success. *J Field Ornithol* 64:507–519.
- Mason NA, Burns KJ (2013) Molecular phylogenetics of the Neotropical Seedeaters and Seed-finches (*Sporophila*, *Oryzoborus*, *Dolospingus*). *Ornitol Neotrop* 24: 139–155.
- Mavarez J, Linares M (2008) Homoploid hybrid speciation in animals. *Mol Ecol* 17: 4181–4185.
- Mayr E (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- Medolago CAB, Ubaid FK, Francisco MR, Silveira LF (2016) Description of the nest and eggs of the Great-billed Seed-Finch (*Sporophila maximiliani*). *Wilson J Ornithol* 128 (3), 638–642. doi.org/10.1676/1559-4491-128.3.638.
- Mettler RD, Spellman GM (2009) A hybrid zone revisited: Molecular and morphological analysis of the maintenance, movement, and evolution of a Great Plains avian (Cardinalidae: *Pheucticus*) hybrid zone. *Mol Ecol* 18:3256–3267.
- Ministério Do Meio Ambiente (MMA) (2014) Portaria no. 444, de 17 de dezembro de 2014. *Diário Oficial da União, Seção 1* 245:121–126.
- Mitrus J, Mitrus C, Rutkowski R, Sikora M (2014) Extra-pair paternity in relation to age of the Red-breasted Flycatcher *Ficedula parva* males. *Avian Biol Res* 7: 111–116. doi: 10.3184/175815514X13948188185179.
- Mitsch WJ, Gosselink JG (2000) *Wetlands*, 3 ed. Wiley Inc, New York.

- Moore WS (1977) An Evaluation of Narrow Hybrid Zones in Vertebrates. *Q Rev Biol.* 52:263–277.
- Moore WS, Price JT (1993) Nature of selection in the northern flicker hybrid zone and its implications for speciation theory. In: Harrison RG, ed. *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 196–225.
- Moulton LL, Vallender R, Artuso C, et al. (2017) The final frontier: early-stage genetic introgression and hybrid habitat use in the northwestern extent of the Golden-winged Warbler breeding range. *Conserv Genet* 18: 1481. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0989-8>.
- Naka LN, Bechtoldt CL, Henriques LMP, Brumfield RT (2012) The role of physical barriers in the location of avian suture zones in the Guiana Shield, northern Amazonia. *Am. Nat.* 179, E115–E132. doi:10.1086/664627.
- Oliveira LS, Sousa LMS, Davanço PV, Francisco MR (2010) Breeding behavior of the Lined Seedeater (*Sporophila lineola*) in southeastern Brazil. *Ornitol Neotrop* 21:251–261.
- Ortiz D, Capllonch P (2007) Distribución y migración de *Sporophila c. caerulescens* en Sudamérica. *Rev Bras Ornitol* 15(3): 377–385.
- Ouellet H (1992) Speciation, zoogeography and taxonomic problems in the Neotropical genus *Sporophila* (Aves: Emberizidae). *Bull Br Orn Club* 112a:225–235.
- Patton LL, Maehr DS, Duchamp JE, Fei S, Gassett SJW, Larkin JL (2010) Do the Golden-winged Warbler and Blue-winged Warbler exhibit species-specific differences in their breeding habitat use? *Avian Cons Ecol* 5:2.
- Pearson SF, Manuwal DA (2000) Influence of niche overlap and territoriality on hybridization between Hermit Warblers and Townsend's warblers. *Auk*, 117: 175–183.
- Pearson SF, Rohwer S (2000) Asymmetries in male aggression across an avian hybrid zone. *Behav Ecol* 11: 93–101.

- Price T, Bouvier M (2002) Evolution of F1 postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* 56: 2083–2089.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 67: 170–181.
- Pulido-Santacruz P, Aleixo A, Weir JT (2018) Morphologically cryptic Amazonian bird species pairs exhibit strong postzygotic reproductive isolation. *Proc Biol Sci.* 14:285(1874). pii: 20172081. doi: 10.1098/rspb.2017.2081.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:9–10.
- Regueira RFS, Bernard E (2012). Wildlife sinks: Quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. *Biol Conserv* 149:16–22.
- Repenning M, Rovedder C, Fontana CS (2010) Another color morph of *Sporophila* seedeater from capuchinos group (Aves, Emberizidae). *Iheringia, Zool.* 100: 369–378.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu Rev Ecol Syst* 27:83–109.
- Rhymer, J.M. and Simberloff, D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 83–109.
- Ridgely RS, Tudor G (1989) *The birds of South America. Volume II. The oscine passerines.* University of Texas Press, Austin, USA.
- Rising J, Jaramillo A, Copete JL, Madge S, Ryan P (2011) Family Emberizidae (Buntings and New World Sparrows). In: del Hoyo J, Elliott A, Christie DA (Eds.), *Handbook of the Birds of the World. Vol. 16.* Lynx Editions, Barcelona, pp. 428–683.
- Roda MA, López-Lánus B (2007) Range of Rufous-rumped Seedeater *Sporophila hypochroma* extends to the Pampas region of Argentina, with the first nests of the species. *Cotinga* 30:61–62.

- Rohwer S, Bermingham E, Wood C (2001) Plumage and mitochondrial DNA haplotype variation across a moving hybrid zone. *Evolution* 55: 405–422.
- Rohwer S, Irwin DE (2011) Molt, orientation, and avian speciation. *Auk* 128:419–425 doi 10.1525/auk.2011.10176.
- Rohwer S, Wood C (1998). Three hybrid zones between Hermit and Townsend's warblers in Washington and Oregon. *Auk* 115:284–310.
- Rohwer SA, Manning J (1990) Scheduling differences in timing and number of molts for Baltimore and Bullock's orioles: Implications to hybrid fitness and theories of delayed plumage maturation. *Condor* 92: 125–140.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rovedder CE, Fontana CS (2012) Nest, eggs, and nest placement of the Brazilian endemic Black-bellied Seedeater (*Sporophila melanogaster*). *Wilson J Ornithol* 124:173–176.
- Ruegg K (2007). Genetic, morphological, and ecological characterization of a hybrid zone that spans a migratory divide. *Evolution* 62:452–466 doi 10.1111/j.1558-5646.2007.00263.x.
- Schumer M, Rosenthal GG, Andolfatto P (2014) How common is homoploid hybrid speciation? *Evolution* 68: 1553–1560.
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol Evol* 19:198–207.
- Seehausen O (2006) Conservation: losing biodiversity by reverse speciation. *Curr Biol* 16:334–337.
- Semlitsch RD, Bodie JR (1998) Are small, isolated wetlandsexpendable? *Conserv Biol* 12:1129–1133. doi:10.1046/j.1523-1739.1998.98166.x.

- Sibley CG, Monroe BL (1990) *Distribution and Taxonomy of Birds of the World*. Yale New Haven & London: University Press.
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Silva JMC (1995) Seasonal distribution of the Lined Seedeater *Sporophila lineola*. *Bull Br Orn Club* 115(1): 14–21.
- Silva JMC (1999) Seasonal movements and conservation of seedeaters of the genus *Sporophila* in South America. *Stud Avian Biol* 19: 272–280.
- Silveira LF, Straube FC (2008) Aves. In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (eds.). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Brasília, Ministério do Meio Ambiente; Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas. Série Biodiversidade 2:378-679.
- SMA - Secretaria de Meio Ambiente (2014) Decreto nº 60.133, de 7 de fevereiro de 2014. Declara as espécies da fauna Silvestre ameaçadas de extinção, as quase ameaçadas e as deficientes de dados para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. *Diário Oficial do Poder Executivo* 124 (27), São Paulo, Seção 1, p. 25-32.
- Price T (2007) *Speciation in Birds*. Roberts and Company Publishers. Greenwood Village.
- Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial dna in humans and chimpanzees. *Mol Biol and Evol* 10: 512–526.
- Taylor SA, White TA, Hochachka WM, Ferretti V, Curry RL, Lovette I (2014) Climate-mediated movement of an avian hybrid zone. *Curr Biol* 24:671–676.
- Toews DPL, Delmore KE, Osmond MM, Taylor PD, Irwin DE (2017) Migratory orientation in a narrow avian hybrid zone. *PeerJ* 5:e3201 <https://doi.org/10.7717/peerj.3201>.
- Turelli M, Begun DJ (1997) Haldane's rule and X-chromosome size in *Drosophila*. *Genetics* 147: 1799–1815.

- Ubaid FK, Silveira LF, Medolago CAB, Costa TV, Francisco MR, Barbosa KVC, Silveira, LF (2018) Taxonomy, natural history, and conservation of the Great-billed Seed-Finch *Sporophila maximiliani* (Cabanis, 1851) (Thraupidae, Sporophilinae). *Zootaxa* 4442(4) doi:<http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4442.4.4>.
- Väli Ü, Saag P, Dombrovski V, Meyburg BU, Maciorowski G, Mizera T, et al (2010) Microsatellites and single nucleotide polymorphisms in avian hybrid identification: a comparative case study. *J Avian Biol* 41: 34–49.
- Vermaat JE, Goosen H, Omtzigt N (2007) A multivariate analysis of biodiversity patterns in Dutch wetlandmarsh areas: urbanisation, eutrophication or fragmentation? *Biodiv Conserv* 16:3585–3595. doi:10.1007/s10531-006-9128-4.
- Vizentin-Bugoni J, Areta JI, Di Giacomo AG, Di Giacomo AS, Jacobs FP, Coimbra MAA, Dias RA (2013) Breeding biology and conservation of the Marsh Seedeater (*Sporophila palustris*). *Bird Conserv Intern* 23:147–158.
- Walsh J, Olsen BJ, Ruskin KJ, Shriver WG, O'Brien KM, Kovach AI (2016b) Extrinsic and intrinsic factors influence fitness in an avian hybrid zone, *Biol J Linnean Soc* 119: 4, 890–903 <https://doi.org/10.1111/bij.12837>.
- Walsh J1, Rowe RJ1, Olsen BJ2, Shriver WG3, Kovach AI (2015a) Genotype-environment associations support a mosaic hybrid zone between two tidal marsh birds. *Ecol Evol.* 29 (1):279–94. doi: 10.1002/ece3.1864.
- Weir B, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- Weir JT, Wheatcroft DJ (2011) A latitudinal gradient in evolutionary rates of bird song complexity and length. *Proc. R. Soc. Lond. B. Sci* 78:1713–1720.
- Weir JT, Wheatcroft DJ, Price TD (2012) The role of ecological constraint in driving the evolution of avian song frequency across a latitudinal gradient. *Evolution* 66(9):2773–83. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01635.x. Epub 2012 Apr 9.

Westneat DF , Mays HL (2005) Tests of spatial and temporal factors influencing extra-pair paternity in red-winged blackbirds. *Mol Ecol* 4: 2155–2167.

Zhao Y, Yin G, Pan Y, Gong X (2018). Ecological and Genetic Divergences with Gene Flow of Two Sister Species (*Leucomeris decora* and *Nouelia insignis*) Driving by Climatic Transition in Southwest China. *Front Plant Sci* 9: 31. <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.00031>.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1:** Alelos encontrados em cada loci, em cada área estudada. Os alelos exclusivos para cada área encontram-se destacados em negrito.

SM							SB							EEI									
<i>Loci</i>							<i>loci</i>							<i>loci</i>									
Sma20	Sma21	Sma22	Sma25	Sma29	Sma31	Sma32	Sma20	Sma21	Sma22	Sma25	Sma29	Sma31	Sma32	Sma33	Sma20	Sma21	Sma22	Sma25	Sma29	Sma31	Sma32	Sma33	
207	255	400	216	179	161	355	205	255	402	216	<b>171</b>	161	353	<b>364</b>	205	255	400	216	179	<b>163</b>	353	<b>366</b>	
209	257	404	220	181	165	359	207	257	406	220	179	165	355	368	207	257	404	220	181	165	355	368	
213	261	406	224	185	167	361	209	261	408	224	181	167	357	370	209	261	406	226	183	167	359	370	
215	263	408	226	187	169	363	213	263	410	226	185	169	359	372	<b>211</b>	263	408	228	185	169	363	372	
	<b>265</b>	410	228	189	171	365	<b>388</b>	215	<b>287</b>	416	228	187	171	361	374	213	<b>279</b>	410	232	187	171	365	374
	<b>275</b>	412	232	<b>191</b>	173	367			418	230	189	175	363	<b>396</b>	215			412	234	189	173	367	<b>380</b>
	<b>277</b>	<b>414</b>	234		175	371				232	<b>195</b>	177	365	<b>398</b>				416	236	<b>197</b>	175	<b>369</b>	<b>386</b>
		416	236		177	383				234		181	367					418	238		177	371	
		418	238		181					236			371					420	240		181	<b>373</b>	
			242		<b>191</b>					238									244			<b>379</b>	
			<b>246</b>							242									252				383
			248							244									254				
			254							248									<b>260</b>				
			258							250									<b>270</b>				
			262							254													
			<b>264</b>							256													
										258													
										262													
										<b>272</b>													
										<b>278</b>													



Haplótipos	n	Sítios																																													
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4					
<i>S. pileata</i> 1	21	G	A	A	T	C	C	T	C	T	C	C	A	C	T	T	C	C	T	T	A	C	T	C	G	T	T	T	G	C	A	G	G	T	C	G	C	A	T	C	G	C	C	C			
<i>S. bouvreuil</i> 2	1	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>S. bouvreuil</i> 3	1	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>S. bouvreuil</i> 4	1	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>S. bouvreuil</i> 5	1	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>S. bouvreuil</i> 6	1	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>S. bouvreuil</i> 7	1	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>S. bouvreuil</i> 8	1	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>S. bouvreuil</i> 9	1	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

**Anexo 3:** Tabela de saída do programa STRUCTURE com os valores de q (inferred clusters) para cada amostra (labels), em cada uma de três corridas para os indivíduos da população de SOB, excluindo-se os ninhegos, utilizando-se K=2.

Label	Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
	Inferred clusters					
93	0,764	0,236	0,774	0,226	0,766	0,234
94	0,943	0,057	0,941	0,059	0,940	0,060
96	0,272	0,728	0,273	0,727	0,270	0,730
98	0,063	0,937	0,063	0,937	0,064	0,936
99	0,829	0,171	0,832	0,168	0,843	0,157
100	0,750	0,250	0,768	0,232	0,765	0,235
103	0,977	0,023	0,977	0,023	0,977	0,023
105	0,266	0,734	0,254	0,746	0,255	0,745
107	0,730	0,270	0,718	0,282	0,706	0,294
114	0,874	0,126	0,870	0,130	0,876	0,124
117	0,965	0,035	0,964	0,036	0,964	0,036
119	0,145	0,855	0,158	0,842	0,169	0,831
120	0,951	0,049	0,949	0,051	0,950	0,050
127	0,718	0,282	0,707	0,293	0,705	0,295
129	0,064	0,936	0,067	0,933	0,067	0,933
131	0,163	0,837	0,162	0,838	0,161	0,839
132	0,125	0,875	0,132	0,868	0,132	0,868
133	0,067	0,933	0,065	0,935	0,067	0,933
134	0,025	0,975	0,026	0,974	0,027	0,973
137	0,940	0,060	0,941	0,059	0,942	0,058
138	0,721	0,279	0,732	0,268	0,743	0,257
140	0,507	0,493	0,521	0,479	0,515	0,485
142	0,940	0,060	0,938	0,062	0,938	0,062
143	0,866	0,134	0,861	0,139	0,863	0,137
144	0,320	0,680	0,331	0,669	0,324	0,676
185	0,886	0,114	0,884	0,116	0,883	0,117
186	0,094	0,906	0,093	0,907	0,093	0,907
187	0,068	0,932	0,071	0,929	0,076	0,924
188	0,966	0,034	0,966	0,034	0,966	0,034
189	0,065	0,935	0,071	0,929	0,076	0,924
190	0,970	0,030	0,969	0,031	0,969	0,031
191	0,956	0,044	0,956	0,044	0,956	0,044
192	0,770	0,230	0,770	0,230	0,764	0,236
193	0,274	0,726	0,276	0,724	0,277	0,723
196	0,187	0,813	0,199	0,801	0,194	0,806
197	0,951	0,049	0,948	0,052	0,952	0,048
198	0,944	0,056	0,941	0,059	0,945	0,055
199	0,953	0,047	0,953	0,047	0,952	0,048
200	0,680	0,320	0,676	0,324	0,695	0,305
201	0,127	0,873	0,135	0,865	0,133	0,867

Label	Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
	Inferred clusters		Inferred clusters		Inferred clusters	
202	0,841	0,159	0,840	0,160	0,843	0,157
203	0,066	0,934	0,072	0,928	0,074	0,926
204	0,087	0,913	0,092	0,908	0,091	0,909
205	0,041	0,959	0,044	0,956	0,045	0,955
206	0,096	0,904	0,104	0,896	0,107	0,893
207	0,024	0,976	0,025	0,975	0,025	0,975
208	0,023	0,977	0,024	0,976	0,023	0,977
95	0,936	0,064	0,933	0,067	0,933	0,067
139	0,935	0,065	0,932	0,068	0,930	0,070
209	0,946	0,054	0,947	0,053	0,946	0,054
210	0,047	0,953	0,048	0,952	0,050	0,950

**Anexo 4:** Alelos encontrados em cada loci, para cada grupo identificado como possíveis híbridos através do programa STRUCTURE. Os alelos exclusivos encontram-se destacados em negrito.

Grupo	<i>Loci</i>								
	Sma20	Sma21	Sma22	Sma23	Sma24	Sma25	Sma26	Sma27	
A	207	255	<b>402</b>	<b>226</b>	<b>171</b>	<b>165</b>	359	<b>364</b>	
	209	<b>261</b>	406	216	179	167	<b>361</b>	368	
	213	263	408	<b>228</b>	181	171	363	370	
			<b>410</b>	230	185	<b>175</b>	365	372	
			416	<b>234</b>	<b>189</b>		367	374	
				<b>236</b>	<b>195</b>		371		
				258					
				<b>262</b>					
				<b>278</b>					
	B	205	255	406	216	179	167	<b>355</b>	368
		<b>205</b>	263	408	<b>224</b>	181	<b>169</b>	359	370
207			416	230	185	171	363	372	
209			418	<b>232</b>	<b>187</b>		365	374	
213				<b>234</b>			371		
				<b>238</b>					
				<b>248</b>					
				258					

**Anexo 5:** Dados genotípicos de microssatélites para oito famílias analisados através do método de observação direta (Fleischer 1996). Alelos discordantes entre filhotes e os dois os pais estão em negrito. Dados faltantes são indicados por 0.

Indivíduos	Loci															
	Sma20		Sma21		Sma22		Sma25		Sma29		Sma31		Sma32		Sma32	
Macho	205	213	255	255	406	406	232	238	179	185	167	169	363	365	370	372
Fêmea	205	207	263	263	408	418	216	248	185	187	167	169	359	363	372	372
Ninhego	205	207	255	263	406	408	238	248	185	187	167	167	359	363	370	372
Ninhego	<b>213</b>	<b>213</b>	255	263	406	418	232	248	179	185	167	167	359	363	372	372
Ninhego	205	205	255	263	406	418	238	248	185	187	169	169	363	365	370	372
Ninhego	205	205	255	263	406	418	216	232	185	185	167	169	363	365	370	372
Ninhego	205	207	255	263	406	408	216	232	179	185	169	169	359	363	372	372
Macho	213	213	255	263	406	406	238	272	185	185	167	177	355	357	364	364
Fêmea	207	207	255	263	406	416	230	262	181	189	167	167	365	371	370	370
Ninhego	<b>207</b>	207	255	<b>261</b>	406	416	<b>232</b>	<b>232</b>	185	189	167	167	363	371	370	<b>370</b>
Ninhego	213	<b>213</b>	263	<b>263</b>	406	406	230	244	181	185	167	167	365	365	370	<b>374</b>
Macho	207	207	263	263	406	408	232	256	179	181	167	167	365	367	374	374
Fêmea	205	207	263	263	406	408	232	258	185	185	167	167	363	365	368	370
Ninhego	205	207	263	263	406	408	232	232	185	<b>185</b>	167	167	363	365	368	<b>368</b>
Macho	215	215	287	287	408	408	234	242	179	185	165	167	359	363	396	398
Fêmea	213	213	263	263	406	418	230	254	185	185	167	167	361	363	374	374
Ninhego	213	213	000	000	<b>406</b>	406	<b>232</b>	254	185	185	167	167	000	000	000	000
Ninhego	205	213	<b>255</b>	263	<b>406</b>	406	230	<b>238</b>	179	185	167	167	361	<b>365</b>	370	<b>370</b>
Macho	205	213	261	263	406	406	232	244	185	185	167	167	355	363	372	374
Fêmea	213	213	255	263	408	408	234	234	179	185	167	171	359	365	368	368
Ninhego	205	213	255	<b>255</b>	406	408	232	234	185	185	167	167	355	365	000	000
Ninhego	205	213	255	263	406	408	234	<b>234</b>	185	185	167	171	000	000	374	374
Macho	209	213	261	263	408	408	234	278	179	185	165	171	357	363	370	370
Fêmea	207	213	263	263	408	408	234	234	179	185	167	177	359	365	372	372
Ninhego	209	213	263	263	408	408	234	278	179	185	167	171	363	365	000	000
Macho	209	213	255	263	406	406	216	232	179	185	167	171	365	365	374	374
Fêmea	213	213	263	263	406	418	230	254	185	185	167	167	361	363	374	374
Ninhego	213	213	255	263	406	418	216	254	179	185	167	167	363	365	374	374
Macho	213	213	255	263	406	406	228	244	179	181	169	169	363	367	370	370
Fêmea	213	213	255	263	406	406	228	244	181	181	165	167	359	367	374	374
Ninhego	213	213	263	263	406	<b>410</b>	228	<b>232</b>	179	181	<b>167</b>	171	359	<b>365</b>	<b>368</b>	374