

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

SANDRA ELOISA BÜLAU

ASPECTOS POPULACIONAIS E CITOGENÉTICOS EM *ZONOTRICHIA CAPENSIS*
(AVES:PASSERIFORMES): DIVERSIDADE GENÉTICA E CARIOTÍPICA

Porto Alegre – RS
Junho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Aspectos populacionais e citogenéticos em *Zonotrichia capensis*
(Aves: Passeriformes): diversidade genética e cariotípica

Sandra Eloisa Bülau

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

Porto Alegre, Junho de 2019

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pelo: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Ao concluir os anos de estudo até o doutorado muitas são as pessoas e coisas pelas quais tenho a agradecer.

Agradeço primeiro à minha família por me ensinar com tanta ternura o que só se aprende nos laços de uma família. Pelos valores transmitidos que permearam a formação de meu caráter e ajudaram a me tornar o ser que hoje sou. Também agradeço por todo amor, momentos intensos de alegria e por todo apoio moral que recebi durante esses anos de vocês. E sem dúvidas, pelo apoio financeiro sem ele tudo teria sido muito mais difícil, vocês foram as mãos que não se cansaram e sempre se alegraram em trabalhar por mim. À vocês meu amor e gratidão!

Agradeço pelas pessoas que passaram em minha vida escolar desde o início de minha alfabetização até a conclusão do doutorado. Lembro-me que no final do ensino médio, meu objetivo de vida era fazer um doutorado e ser uma professora tão boa quanto as que eu tive e que me motivaram a estudar, em especial a Clair Dahmer, que já não está mais entre nós, com ela aprendi a diferença entre ter em sala de aula alguém que passa conteúdos e um professor.

Já na graduação agradeço ao Zé Flávio que me ensinou a gostar das aves e me fez pensar em conservação. Você me salvou da botânica. Muito obrigada!

Durante minha primeira experiência na pós-graduação, conheci o Claiton Martins-Ferreira que me auxiliou muito aqui na UFRGS e colocou no meu caminho o cardeal-amarelo. Muito obrigada!

Sou imensamente grata à meu orientador, Thales Renato Ochotorena de Freitas. Obrigada por esses mais de seis anos de convivência! Obrigada por me permitir trabalhar com os passarinhos durante o mestrado e o doutorado. Obrigada pelas aulas de história. Tua orientação sempre foi muito além da acadêmica.

Muitos foram os colegas que tive durante todos esses anos, alguns tenho orgulho em chamar de amigos. Dizem que quanto mais complicado está o trabalho mais se deve manter contato com os amigos, endosso esse pensamento. Vocês amigos e colegas fizeram e fazem minha vida ficar mais leve, muito obrigada.

Agradeço a todas as pessoas que conheci durante esses anos de lab. tucão, com carinho à Borges, Brenda, Bruna, Bruninha, Bruno, Carol, Carol Espinosa, Cristina,

Daniel, Fabrício, Fernando, Gi, Léo, Luiz, Luiza, Marcelo, Mayara, Rafa, Rafa2, Renan, Thaís, Thamara e Sir Willian entre outros... mas preciso fazer umas linhas a três pessoas em especial. A Gi (Gisele Oliveira de Souza) que me apoiou em momentos extremamente difíceis no final do mestrado e agora no final do doutorado e me deu sua amizade, a qual é muito importante para mim. À Carol (Caroline Charão Sartor), por sua generosidade e amizade, que ao ver meu desespero não mediu esforços em sair estrada fora comigo atrás de tico-tico. E ao Rafa (Rafael Kretschmer) pela amizade, pela convivência, pela ajuda com os cromossomos e por todo apoio tanto no trabalho quanto em casa. Muito obrigada!

Agradeço a meus irmãos Martin e Tiago, ao Tiago Mendes, Caroline Sartor, Bruna Szynewski e Thamara Almeida pelos dias que passaram comigo “caçando” tico-ticos. A ajuda de vocês foi essencial para este trabalho e a companhia a melhor que poderia ter! Agradeço ao William Peçanha pelo auxílio nos artigos.

Agradeço à Lucia, por desburocratizar nossa vida, e ao Luciano por facilitar o trabalho no laboratório. Sem vocês o trabalho de todos nós com certeza seria bem maior. Obrigada também pelo carinho e momentos descontraídos que tivemos!

Agradeço aos professores e coordenação do PPGBM, em especial ao Elmo Cardoso, por todo suporte recebido.

Agradeço à Capes pelo bolsa de doutorado.

Agradeço ao SISBIO/ICMbio, Cemave e CEUA da UFRGS pelas licenças necessárias.

E por fim a todos os tico-ticos, dos quais me utilizei para alcançar os objetivos deste trabalho.

“Quando os animais readquirirem o dom de falar, que perderam, como rezam tradições imemorais, a primeira ave que nos vai dirigir a palavra, é por certo o tico-tico. Nenhum, como ele, se mostra tão desejoso de entrar em relações amistosas com o homem. Onde se implante uma choupana, onde se instale um jardim, onde haja um quintalejo, lá está o gentil tico-tico, pipilando amabilidades...

... Em geral os grupos vivem em boa paz, paz europeia: cada qual pensando no momento da briga. E o momento chega com a época de escolher a esposa. Cada tico-tico transforma-se num desordeiro; rebentam rixas, de instante a instante, e os valentões, atracados, rebolam do cimo das árvores ao chão, empenhados em luta corporal. Passada a grande crise de amores, vêm as preocupações da família e aqueles bravos de outrora transformam-se em criaturinhas pacíficas, entregues de todo à criação dos filhos.

Em matéria de canto, o nosso amigo tico-tico é de uma simplicidade absoluta. Pela manhã e pela tarde, às vezes já ao anoitecer, ele nos assevera que a sua vida não é lá grande coisa, e naturalmente, podia ser bem melhor, se não houvesse tanto gato nesse mundo e se as crianças não fossem tão ruinzinhas. E assim ele nos diz, muito francamente, como de amigo para amigo: “minha vida é assim, assim, assim”.

Eurico Santos, 1979, Pássaros do Brasil.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO UM	9
Introdução Geral	9
1.1. Estrutura da Tese	10
1.2. Introdução	11
1.3. O tico-tico - <i>Zonotrichia capensis</i>	13
1.3. Domínios Geomorfoclimáticos do Rio Grande do Sul - a área de estudo	19
1.4. Citogenética em aves	24
1.5 Genética populacional e processos históricos	25
JUSTIFICATIVA	27
OBJETIVOS	29
CAPÍTULO DOIS	30
Chromosomal polymorphism and comparative chromosome painting in the rufous-collared sparrow (<i>Zonotrichia capensis</i>)	30
CAPÍTULO TRÊS	38
Avaliação da Variação Genética em <i>Zonotrichia capensis</i> (Aves: Passeriformes): ausência de estruturação genética em um ambiente heterogêneo no sul do Brasil.....	38
CAPÍTULO QUATRO	70
Conclusão Geral	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICES	83
Apêndice1. Licença de coleta SISBIO	83
Apêndice 2. Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS	86
Apêndice 3. Figuras 1 e 2. Imagens obtidas durante as atividades de campo desenvolvidas para a realização dessa tese.....	87

RESUMO

O tico-tico, *Zonotrichia capensis*, é um pequeno passeriforme que habita paisagens abertas da região Neotropical. Sua história evolutiva é marcada pelos eventos biogeográficos do Pleistoceno e as variações observadas em seu comportamento, morfologia e genética estão relacionados aos diferentes habitats que ocupam. No Rio Grande do Sul a espécie ocupa tanto os campos do Bioma Pampa, como os Campos de Altitude, da Mata Atlântica, presentes na região norte do estado. O cariótipo da espécie é composto por 80 cromossomos, e são relatados polimorfismos cromossômicos envolvendo os pares autossômicos dois e quatro, provavelmente decorrentes de rearranjos intracromossômicos. Neste estudo foi investigada a organização cariotípica de *Z. capensis* (ZCA) em três espécimes com técnicas de citogenética molecular, hibridização *in situ* fluorescente e pintura cromossômica, através da aplicação de sondas ribossomais (18S rDNA) e sondas cromossômicas correspondentes aos dez primeiros pares de *Gallus gallus* (GGA) e sondas derivadas de *Leucopternis albicollis* (LAL). Uma investigação populacional foi adotada para acessar, através dos genes D-loop (mitocondrial) e Fib-5 (nuclear), a variabilidade genética de populações naturais de *Z. capensis* no estado do Rio Grande do Sul e a partir da variação genética testar a influência dos diferentes habitats ocupados sobre a distribuição da diversidade genética entre essas populações. A aplicação da sonda 18S rDNA demonstrou que os genes ribossomais estão localizados em um par de microcromossomos assim como em *G. gallus* e na maioria das espécies de aves basais. Pela citogenética clássica, foi confirmada a presença de quatro dos nove citótipos relatados na literatura no segundo e quarto pares autossômicos. A pintura cromossômica comparativa indicou que o cromossomo ZCA2 corresponde a GGA1q e que ZCA4 corresponde a GGA4q. Foi observada a conservação sintênica da maioria dos macrocromossomos, pela pintura cromossômica comparativa, com os dois conjuntos de sondas aplicados (GGA e LAL). Também foi identificada uma inversão no cromossomo ZCA3, observada até o momento somente em uma espécie de passeriforme, *Z. albicollis*, espécie-irmã de *Z. capensis*. Ainda, foi descrita pela primeira vez uma inversão envolvendo um segmento do braço curto do cromossomo ZCA2 que corresponde ao GGA1q. Para as análises genéticas foram coletadas 138 amostras de 14 localidades distribuídas nos dois biomas que ocorrem no estado. Foram obtidas 114 sequências para D-

loop que resultaram em 27 haplótipos e 124 sequências para Fib-5 que após a definição de fase corresponderam a 29 haplótipos. Para ambos os marcadores os haplótipos mais frequentes estão presentes em todas as localidades amostradas. As análises genéticas realizadas indicam eventos de expansão, seguidos de um período de estabilidade populacional e ausência de estruturação genética entre as localidades amostradas no estado. A ausência de estruturação genética sugere que a população de *Z. capensis* manteve fluxo gênico contínuo mesmo com as mudanças ocorridas na paisagem ao final do Último Máximo Glacial responsáveis pela redução e fragmentação das formações campestres na área de estudo.

ABSTRACT

The rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*, is a small Passeriforme that inhabit grasslands of the Neotropical region. Its evolutionary history was marked by biogeographic events of the Pleistocene. The variations observed in its behavior, morphology and genetics seems to be related to different habitats it that occupies. In Rio Grande do Sul state, the species inhabit both grasslands of Pampa biome and campos de altitude of Atlantic Forest biome, present in the northern region of the state. The karyotype of the species is composed of 80 chromosomes, and was reported in the literature polymorphisms involving autosomal pairs two and four, probably due to intrachromosomal rearrangements. This study investigated the karyotypic organization of *Z. capensis* (ZCA) in three specimens, with molecular cytogenetic techniques, fluorescence *in situ* hybridization and chromosome painting, through the application of ribosomal probes (18S rDNA), chromosome probes corresponding to the first ten pairs of *Gallus gallus* (GGA) and probes derived from *Leucopternis albicollis* karyotype's (LAL). We used a population genetics approach to access the genetic variability of *Z. capensis* natural populations in Rio Grande do Sul state through the molecular markers D-loop (mitochondrial) and Fib-5 (nuclear). The information obtained allowed us to test the influence of the different habitats occupied by this species on the distribution of genetic diversity among *Z. capensis* populations. 18S r DNA probes showed that ribosomal genes are located on one pair of microchromosomes as well as on *G. gallus* and in most basal bird species. By classical cytogenetics, we confirmed the presence of four of the polymorphisms reported in previous studies on the second and fourth autosomal pairs. Comparative chromosome painting indicated that ZCA2 corresponds to GGA1q and ZCA4 corresponds to GGA4q. We observed the syntenic conservation of most macrochromosomes by comparative chromosome painting through the two sets of probes applied (GGA and LAL). With the two sets of probes applied (GGA and LAL) we observed the syntenic conservation of most macrochromosomes by comparative chromosome painting. We also identified an inversion in ZCA3 chromosome, present in Passeriformes only in *Z. albicollis*, considered its sister species. In addition, we described for the first time an inversion involving a segment of the

short arm of chromosome ZCA2 that corresponds to GGA1q. For the genetic analyzes we collected 134 samples in 14 localities distributed in the two biomes occurring in the state. We obtained 114 D-loop sequences that resulted in 27 haplotypes and 124 sequences for Fib-5 that after phase definition correspond to 29 haplotypes. The most frequent haplotypes, for both markers, are distributed in all sampled localities. The genetic analyses carried in this study indicated the occurrence of expansion events followed by a period of population stability and absence of genetic structure among the localities. This indicates that the population of *Z. capensis* maintained a continuous gene flow even with changes in landscape at the end of Last Glacial Maximum responsible for reductions and fragmentation of the grasslands in the study area.

CAPÍTULO UM

Introdução Geral



Ilustração do tico-tico (*Zonotrichia capensis*). Fonte: HandBook of the Birds of the World Alive.

1.1. Estrutura da Tese

A tese foi estruturada em forma de capítulos. O primeiro capítulo traz uma introdução geral e os dois capítulos seguintes (em formato de artigo) abordam diferentes questões envolvendo aspectos genéticos sobre *Zonotrichia capensis*, conhecido popularmente como tico-tico, cada qual com objetivos específicos. O último capítulo traz a conclusão geral.

Capítulo Um – Introdução: Esse capítulo tem por objetivo apresentar a espécie foco desta tese, *Z. capensis*, e contextualizar a área de estudo, o Estado do Rio Grande do Sul. Esse capítulo também traz as motivações da tese.

Capítulo Dois – Primeiro artigo: Esse capítulo foi apresentado durante o exame de qualificação e está publicado na revista *Genetics and Molecular Biology*, a caracterização e a organização do cariótipo de *Z. capensis* baseados em pintura cromossômica comparativa.

Capítulo Três – Segundo artigo: Este capítulo tem como objetivo apresentar a história demográfica de *Z. capensis* no estado do Rio Grande do Sul baseada em marcadores nuclear e mitocondrial. Artigo à ser submetido a revista *The Condor*.

Capítulo Quatro – Conclusão: Este capítulo traz uma síntese sobre os resultados obtidos nesta tese, ressaltando as contribuições deste trabalho para o aprofundamento do conhecimento a respeito dos tico-ticos e também sobre a influência do ambiente no processo de diferenciação populacional de espécies de aves.

1.2. Introdução

A história das aves modernas iniciou no final do Cretáceo, mas foi o Eoceno, na Era Cenozóica, o período de maior diversificação (Pough et al. 2008). Atualmente a Classe Aves é composta por mais de 10.700 mil espécies existentes (Gill e Donsker 2019) que exibem uma profusa variação na morfologia, ecologia e comportamento. Estão distribuídas em todas as regiões biogeográficas do globo e adaptadas aos mais diversos ambientes. Devido à grande diversidade, abundância e facilidade de observação é um dos grupos de animais mais conhecidos e estudados (Sibley e Monroe 1990, Sick 1997, Gill 2006).

Dentre as ordens existentes de aves a Ordem Passeriformes se destaca por ser a mais diversa dentro da Classe Aves, com cerca de 5.740 espécies, o que representa 60% da diversidade existente (Sibley e Monroe 1990, Ericson et al. 2003). Os passeriformes são em geral aves pequenas, estão presentes em todos os continentes, com exceção das ilhas Antárticas (Raikow e Bledsoe 2000). A Ordem é dividida em dois grupos: Suboscines e Oscines, distintos principalmente pela estrutura da siringe, órgão responsável pela produção de sons (Ames 1971, Sibley e Ahlquist 1990).

Os Suboscines correspondem a cerca de 10% da diversidade total de aves. Esse grupo de pássaros é dividido geograficamente nos clados do Novo Mundo, amplamente distribuído na região Neotropical e o clado do Velho Mundo, que possui poucas famílias (Ricklefs 2002). Na região Neotropical eles irradiaram de forma impressionante e são ecológica e socialmente diversos, apresentam dimorfismo sexual extremo, e geralmente os machos são muito ornamentados. Muitas espécies apresentam comportamentos reprodutivos elaborados, realizados por machos, sozinho, em pares ou em sistemas cooperativos, para atração de fêmeas (Tobias et al. 2012).

Os Oscines estão adaptados a quase todos os tipos de habitat e representam cerca de 80% das espécies de Passeriformes (Ericson et al. 2002). Na região Neotropical habitam frequentemente paisagens abertas (Sick 1997). Possuem uma grande diversidade morfológica e adaptações para se alimentarem de uma vasta diversidade de recursos que vão desde insetos até sementes, frutos e néctar (Barker et al. 2013). O canto tem funções sociais entre as aves, nos pássaros desse grupo os machos jovens aprendem os sons de seus coespecíficos adultos (Eriksen 2011) e pode ser usado tanto na defesa de territórios, atração das fêmeas e ainda como barreira reprodutiva (Catchpole e Slater 2008). As espécies de Oscines são classificadas atualmente em 16 famílias, dentre estas a família Passerellidae, com 25 gêneros incluindo o gênero *Zonotrichia*, que compreende os pardais do novo mundo (Barker et al. 2013).

O gênero *Zonotrichia* é composto por cinco espécies, *Zonotrichia albicollis*, *Z. atricapilla*, *Z. leucophrys* e *Z. querula* e *Z. capensis* que especiaram no Pleistoceno a cerca de 140 mil anos (Zink et al. 1991). Os representantes desse gênero se distribuem em uma ampla faixa latitudinal e altitudinal de formações abertas desde o Alasca até a Terra do Fogo. As espécies *Z. albicollis*, *Z. atricapilla*, *Z. leucophrys* e *Z. querula* ocorrem na América do Norte enquanto que na região Neotropical apenas *Z. capensis* está presente. As populações de aves desse gênero são abundantes e tidas como residentes na maior parte de suas distribuições, mas todas as espécies possuem populações migratórias (Morton 2002). Buscas em bases de dado *online*, como *Web of Science* e *Scielo*, usando o termo “*Zonotrichia*” retornam mais de 2.000 correspondências e demonstram que as espécies desse gênero têm sido alvos recorrentes de investigações de laboratório e de campo que envolvem morfologia, comportamento e caracteres genéticos. Nesse estudo investigaremos aspectos genéticos da espécie neotropical *Z. capensis*.

1.3. O tico-tico - *Zonotrichia capensis*

O tico-tico, *Zonotrichia capensis* (Müller, 1776) (**Figura 1**), é uma das espécies de aves mais populares no Brasil. Na literatura são encontrados as sinonímias *Fringilla capensis* e *Brachyospiza capensis* (Ridgway 1898). É o único representante neotropical do gênero monofilético *Zonotrichia* (Zink 1982), sendo considerada a espécie mais basal entre suas congêneres, *Z. albicollis*, *Z. atricapilla*, *Z. leucophrys* e *Z. querula* (Zink et al. 1991). A origem do gênero provavelmente tenha sido na América do Norte, seguido de uma diferenciação entre as congêneres e a expansão da linhagem ancestral de *Z. capensis* para o sul das Américas a partir da América Central (Chapman 1940, Loughheed et al. 2013).



Figura 1. Indivíduos adultos de *Z. capensis*. A: vista dorsal (imagem cedida por Thales R. O. de Freitas); B: vista lateral de indivíduo adulto capturado em Santo Antônio da Patrulha; C: vista lateral de indivíduo adulto capturado em São José dos Ausentes.

Esse pequeno passeriforme apresenta aproximadamente 15 cm de tamanho quando adulto, é facilmente identificado pelo topete e desenho estriado preto em um fundo cinza

na cabeça e pela presença de um colar ferrugíneo no pescoço (Sick 1997). Esses pássaros não apresentam dicromatismo sexual. Os adultos se caracterizam pela coloração do dorso, que é rajado em tons de marrom-avermelhado e preto, do peito acinzentado com o papo mais claro e extremidades das coberteiras das asas com manchas brancas (Santos 1979, Ridgely e Tudor 1989). A alimentação é baseada em pequenos insetos, sementes, frutos e brotos. Têm como hábito característico esgravatar o alimento no solo com pequenos pulos (Sick 1997).

Em geral os tico-ticos vivem em pares isolados e o macho defende ativamente seu território (Sick 1997). Entretanto, estudos indicam taxas elevadas de cópula extra par (Eikenaar et al. 2013). A reprodução ocorre geralmente entre a primavera e o verão quando ocorre a postura de dois a quatro ovos por ninhada. Seus ninhos são alvo frequente do chupim (*Molothrus bonariensis*), que em algumas estações reprodutivas parasita 60% dos ninhos, reduzindo fortemente o sucesso reprodutivo do tico-tico (Sick 1997).

Os tico-ticos são tolerantes à presença humana e ocupam a beira de lavouras e de estradas e jardins em zonas urbanas arborizadas. No Brasil, a opinião popular é de que a espécie foi expulsa das cidades após a introdução do pardal, porém Sick (1997) afirma que ele se torna ausente em centros urbanizados pela falta de seus requisitos biológicos básicos, tais como locais adequados para a nidificação. Bellocq e colaboradores (2011), ao avaliarem gradientes de intensidade de atividade humana, indicam que a abundância da espécie é negativamente afetada com o aumento da urbanização.

Zonotrichia capensis é uma espécie amplamente distribuída nas paisagens abertas subtropicais e tropicais do continente americano (Chapman 1940). Ocorre desde Chiapas no México, ocorrendo inclusive nas Ilhas do Caribe, até a Terra do Fogo, na Argentina. Nas áreas do domínio Amazônico ocupa apenas áreas campestres e regiões serranas

(Figura 2). Pode ser encontrada habitando desde terras em nível do mar até montanhas a 5.000 metros de altitude. (Sick 1997, BirdLife International 2019, Rising, J. & Jaramillo 2019). É considerada residente na maior parte de sua distribuição, mas migrações de inverno são registradas nas populações patagônicas, no extremo sul de sua distribuição (Chapman 1940, Sick 1997).

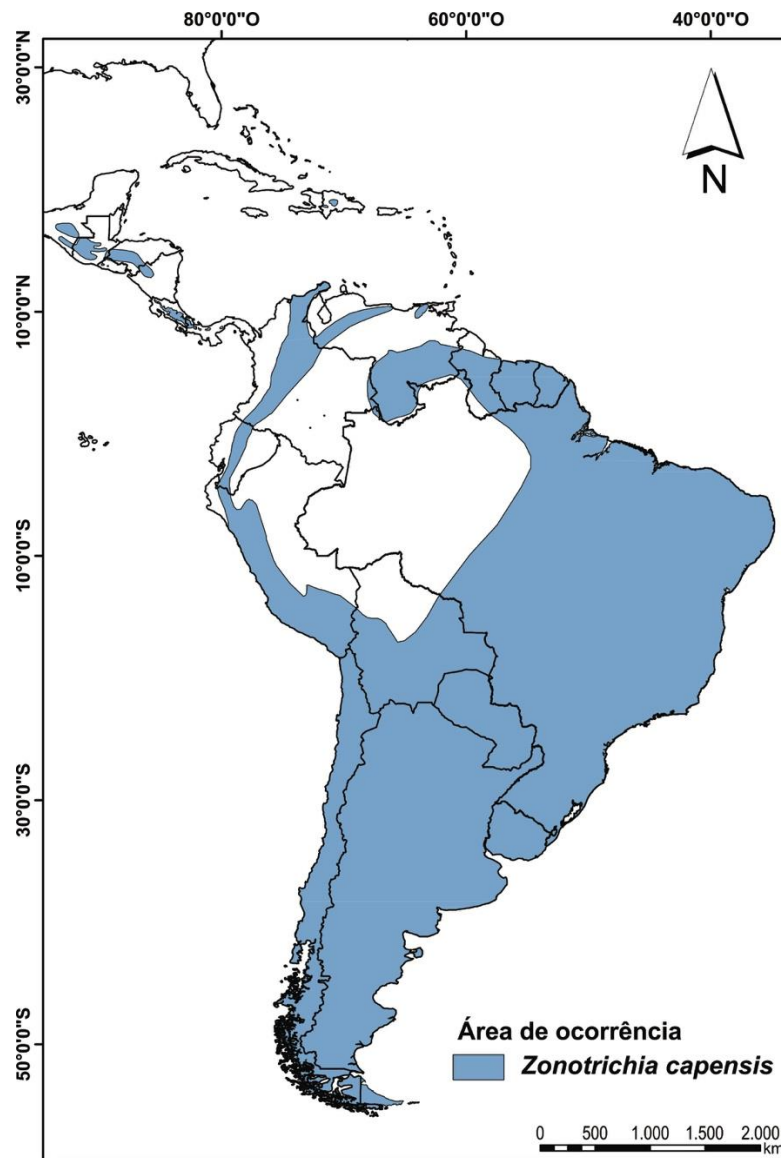


Figura 2. Distribuição geográfica de *Zonotrichia capensis*. Fonte: BirdLife International 2018.

A amplitude e a heterogeneidade dos ambientes ocupados pelo tico-tico cria um cenário para a adaptação local (Cheviron et al., 2008). As populações apresentam variações

morfológicas no tamanho e coloração, sendo as diferenças mais pronunciadas observadas nos extremos da distribuição, e a partir destes morfotipos são propostas mais de vinte subespécies (Chapman 1940, Handford 1983, 1985). Embora os caracteres morfológicos diferenciem fracamente as populações é possível observar uma marcada variação no comportamento vocal correlacionada à vegetação (Nottebohm 1975, Handford 1981, Handford e Loughheed 1991, Lijtmaer e Tubaro 2007). Seu canto doce e melancólico, descrito como simples, é composto de uma série de assobios e um trinado no final e já foi alvo de diversos estudos visando a descrição da estrutura do som (Nottebohm 1969), correlação entre variação no som e vegetação (Nottebohm 1975, Handford 1981, Handford e Loughheed 1991, Lijtmaer e Tubaro 2007) e a associação entre canto, morfologia e genética (Nottebohm e Selander 1972, Cheviron et al. 2008, Cheviron e Brumfield 2009), entre outros.

Os estudos envolvendo o canto de *Z. capensis* indicam que algumas populações exibem repertórios individuais (Fotheringham 1995), enquanto outras possuem estereótipos individuais e dialetos geográficos. Os dialetos tem relação com os diferentes tipos de vegetação, mas não com as subespécies designadas (Nottebohm 1969, Handford 1983, Handford e Loughheed 1991, Lijtmaer e Tubaro 2007). As populações vizinhas de tico-ticos frequentemente diferem nas características de seu canto, mas quando essas diferenças são marcadas e sistemáticas dão origem a dialetos (Nottebohm 1969). Populações que ocupam extensas áreas com ambientes similares apresentam o mesmo dialeto. Quando a área de vida muda a curtas distâncias, por exemplo em um transecto altitudinal, os dialetos também mudam em curtas distâncias, o que sugere que os dialetos divergentes na espécie podem ter evoluído para reduzir o fluxo gênico entre populações vizinhas que experienciam diferentes pressões seletivas (Nottebohm e Selander 1972).

Muitos outros estudos se voltaram para a caracterização genética da espécie. O cariótipo do tico-tico, descrito com técnicas de citogenética clássica, é composto por 80 cromossomos (de Lucca 1974), sendo 13 pares macrocromossomos, incluindo o par sexual, e o restante são microcromossomos (de Lucca e Rocha 1985). Foram identificados polimorfismos cromossômicos, envolvendo dois pares autossômicos, ocasionados provavelmente pela ocorrência de rearranjos intracromossômicos tais como inversões (de Lucca e Rocha 1985, Rocha et al. 1990).

Os polimorfismos cromossômicos descritos para *Z. capensis*, ocorrem nos pares autossômicos dois e quatro. O par dois pode apresentar-se nas formas acrocêntrica e submetacêntrica (2^A e 2^{Sm}), enquanto o par quatro pode ser encontrado nas formas acrocêntrica e metacêntrica (4^A e 4^M) (de Lucca e Rocha 1985, Rocha et al. 1990). A presença destes dois pares polimórficos, com ocorrência de quatro formas cromossômicas, possibilita a combinação de nove citótipos diferentes. Todos esses possíveis citótipos já foram amostrados e analisados, e não foi encontrada uma distribuição cariotípica estruturada geograficamente, embora tenha sido relatada uma correlação significativa entre o aumento da frequência da forma 4^M a altas latitudes e também a baixas temperaturas (Carvalho e Erdtmann 1987, Souza e de Lucca 1988, 1991).

Além das análises citogenéticas, vários estudos moleculares foram desenvolvidos e sugerem a existência de correlação entre o ambiente e a diferenciação populacional. Estudos realizados na Argentina mostram diferenciação entre populações residentes no topo dos Andes e de terras baixas nas frequências alozímicas (Lougheed e Handford 1992), e em polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição no DNA mitocondrial (mtDNA) (Lougheed et al. 1993). Divergências nas frequências haplotípicas de mtDNA foram observadas entre populações da Costa Rica e da Bolívia (Zink et al. 1991, Zink e

Blackwell 1996), e também em populações estudadas em um transecto altitudinal no Peru, evidenciando uma forte relação com as mudanças nas variáveis climáticas ao longo do transecto altitudinal, sugerindo uma adaptação local aos diferentes ambientes (Cheviron e Brumfield 2009).

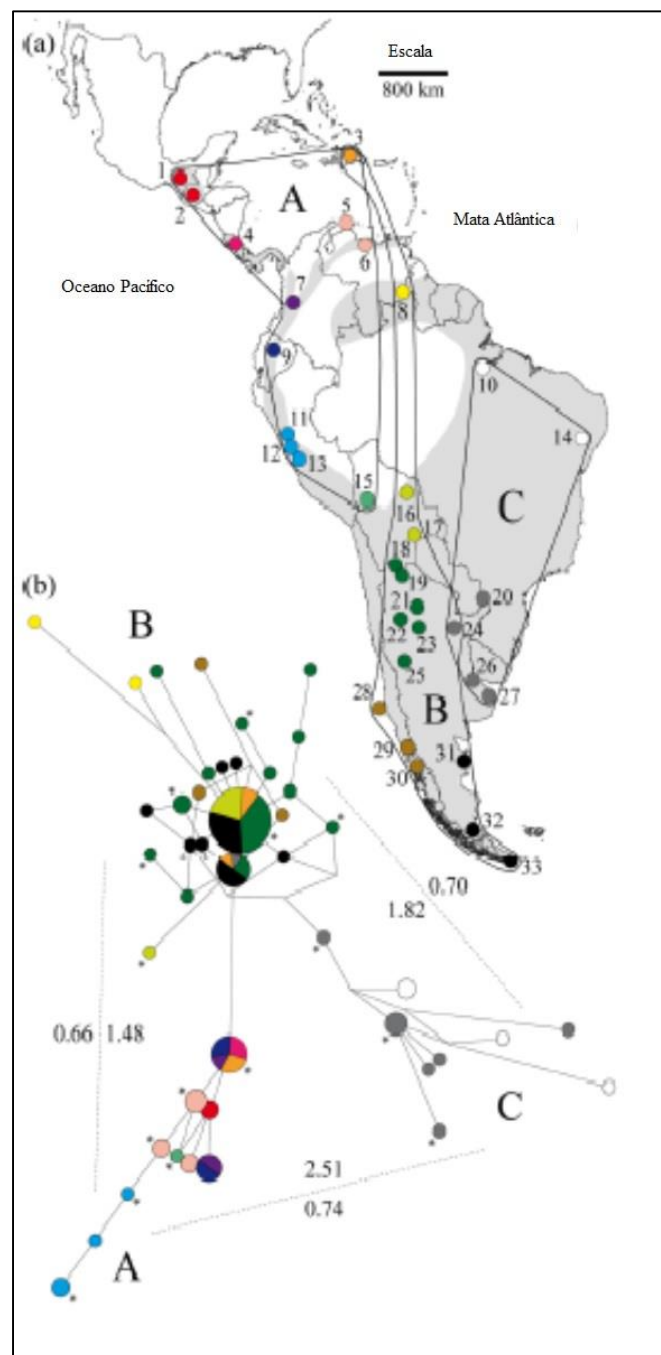


Figura 3. Linhagens genéticas de *Z. capensis*. a) as três linhagens A; B; e C de acordo com suas distribuições geográficas; b) rede haplotípica. Mapa adaptado de Loughheed e colaboradores (2013)

Estudos filogeográficos demonstram que ao longo de sua distribuição *Z. capensis* é dividido em três linhagens genéticas, denominadas A, B e C, que divergiram rapidamente no Pleistoceno (Lougheed et al. 2013, Campagna et al. 2014). Uma linhagem (A) abrange a América Central, a República Dominicana e o noroeste da América do Sul; a segunda linhagem (B) inclui haplótipos da República Dominicana, da Venezuela, da Bolívia, do Chile e das porções noroeste, central e patagônica da Argentina. A terceira linhagem (C) é composta por haplótipos do nordeste da Argentina e da porção oriental do Brasil (Lougheed et al. 2013). Existem dois pontos de contato entre as linhagens, um na República Dominicana entre as linhagens A e B, e outro em Corrientes, Argentina entre B e C (Lougheed et al. 2013, Campagna et al. 2014). Entretanto a estrutura filogeográfica de *Z. capensis* não reflete sua taxonomia subespecífica nem sua diversidade fenotípica, indicando assim como os demais estudos genéticos realizados que as variações morfológicas e comportamentais observadas sejam resultantes das condições locais do espaço ocupado pela espécie (Lougheed et al. 2013, Campagna et al. 2014).

1.3. Domínios Geomorfoclimáticos do Rio Grande do Sul - a área de estudo

As paisagens do Rio Grande do Sul foram moldadas por eventos geológicos e fenômenos físicos que formaram diferentes unidades de relevo com variadas altitudes e formas (Moreira 2003, Vieira 2012). Podem ser identificadas quatro unidades morfológicas, os Planaltos, a Depressão Central, o Escudo Sul-Rio-Grandense e a Planície Costeira. As altitudes variam desde o nível do mar a mais de 1.000 metros de altitude, sendo que mais de 50% da área do estado não ultrapassa os 300 metros de altitude (Vieira 1984, Villwock e Tomazelli 1995). Dois domínios morfoclimáticos atuam no estado, o

Domínio dos Planaltos Úmidos Subtropicais de Matas de Araucárias, na porção centro-setentrional com predomínio de vegetação florestal e o Domínio das Coxilhas Úmidas Subtropicais da Campanha Gaúcha abrangendo a porção meridional com predomínio de gramíneas (Ab'Saber 1970).

No Domínio Morfoclimático dos Planaltos Úmidos Subtropicais de Matas de Araucárias está o Planalto das Araucárias, que no Rio Grande do Sul é composto pelo Planalto dos Campos Gerias e o Planalto Dissecado do Rio Uruguai (Viero e Silva 2010). O Planalto dos Campos Gerias, situado no nordeste do estado, tem sua base formado por rochas basálticas decorrentes de um grande derrame de lavas, compreendendo as terras mais altas do Estado. Caracteriza-se por uma superfície ondulada, com altitudes de aproximadamente 1.300 metros que decrescem no sentido leste-oeste (Vieira 1984, 2012; Moreira 2003). O Planalto Dissecado do Rio Uruguai, situado no norte-noroeste, corresponde a porção mais rebaixada do Planalto das Araucárias. É constituído principalmente por derrames vulcânicos do Cretáceo (Viero e Silva 2010). A Escarpa da Serra Geral forma o relevo de transição entre os Planaltos e a Planície Costeira, ao leste e com a Depressão Central ao norte. Nas porções leste e sudeste, o Planalto das Araucárias termina em descidas bruscas e muito acidentadas, nessa área se encontram as escarpas mais íngremes e os cânions, como o Fortaleza e o Itaimbézinho, no Planalto Dissecado do Rio Uruguai as escarpas separam o Planalto da Depressão Central e são mais baixas e erodidas (Viero e Silva 2010).

Os Planaltos de Uruguaiana e Sul-Rio-Grandense estão inseridos no Domínio das Coxilhas Úmidas Subtropicais da Campanha Gaúcha (Ab'Saber 1970). O Planalto de Uruguaiana, no sudoeste do Estado, é formado por basaltos e andesitos, as cotas altimétricas variam entre 70 e 300 metros, formando terrenos planos ou colinas amplas e

suaves. No Escudo Sul-Rio-Grandense está o Planalto Sul-Rio-Grandense, situado no centro-sul, com substrato de origem complexa embasado por rochas cristalinas do pré-cambriano, a paisagem é predominada por colinas e morros com esparsas superfícies planas. As altitudes não ultrapassam os 600 metros, e os principais desníveis que ocorrem na área do escudo formam uma região de serras, reconhecidas como as serras do Sudeste. (Delgado et al. 2003, Viero e Silva 2010, Vieira 2012).

No que concerne a vegetação, na área do Planalto das Araucárias estão presentes formações florestais do domínio Mata Atlântica, com a presença da Floresta com Araucária, que foram gradualmente reduzidas pela ação antrópica e hoje representam apenas formações residuais. Em meio às florestas estão disseminados os campos, conhecidos como Campos de Cima da Serra ou Campos de Altitude, formados por uma grande variedade de gramíneas (Rambo 1942, Viero e Silva 2010). Mais para o sudoeste no Planalto de Uruguaiana, sob o domínio do Bioma Pampa, domina a vegetação campestre, semelhante a que ocorre nos campos de cima da serra, formada por gramíneas com a presença de matas de galeria e capões isolados. No extremo sudoeste encontra-se uma mata em forma de parque com duas espécies dominantes o nhanduvaí (*Acacia farnesiana*) e o algarrobo (*Prosopis algarobilla*) (Rambo 1942, Vieira 1984, 2012). No Planalto Sul-Rio-Grandense a vegetação é composta de amplas áreas com gramíneas formando os campos limpos, e campos sujos, ocorrem ainda manchas de vegetação arbustiva, touceiras de capinzal. Ainda nesta região ocorre a floresta estacional semidecidual, principalmente na porção leste (Vieira 1984, 2012; Moreira 2003).

A Depressão Central é formada por rochas sedimentares que dão origem a um extenso corredor em forma de arco. Este corredor liga o oeste ao leste do estado, separando os planaltos do Bioma Pampa e da Mata Atlântica. Corresponde a áreas colinosas de pouca

altitude, que não ultrapassam os 400 metros (Magnoli et al. 2001, Viero e Silva 2010, Vieira 2012). Nessa zona rebaixada estão instalados os principais sistemas de drenagem do estado (Viero e Silva 2010). A vegetação é composta em sua maior parte por campos nativos, nas partes mais areníticas ocorrem matos arbustivos, nas áreas mais úmidas ocorrem os prados e nas margens de rios aparecem as matas ciliares (Rambo 1942, Viero e Silva 2010).

A Planície Costeira se estabelece em toda Costa Atlântica do território do estado e apresenta baixas altitudes. É a mais recente formação de terra, ocorrida no período Quaternário (Villwock e Tomazelli 1995, Vieira 2012). Corresponde a uma faixa arenosa, com grande ocorrência de lagoas e lagoas, entre as quais destacam-se a Laguna dos Patos e a Lagoa Mirim. Está em constante mutação devido a sedimentação marinha e flúvio-lacustre. Na planície costeira o solo é extremamente pobre, altamente permeável a água e com acúmulo de sal marinho. A vegetação é formada por espécies adaptadas ao terreno, de porte rasteiro ou baixo, composto principalmente por gramíneas arenícolas, ciperáceas e mirtáceas (Rambo 1942, Vieira 1984, Tomazelli et al. 2000).

Estudos paleoambientais mostram que durante o Quaternário extensas áreas de campos predominaram nas paisagens do Rio Grande do Sul (Behling 1997, 2002; Behling et al. 2004). As vegetações arbóreas restringiam-se a alguns setores na encosta do Planalto das Araucárias (Ab'Saber 1970). Com as mudanças climáticas ocorridas após o término do Último Máximo Glacial, uma rápida fase de mudança vegetal se iniciou com a expansão das florestas, na porção norte do estado, resultando no mosaico composto pela Floresta com Araucária e os Campos, que forma a paisagem atual do Planalto das Araucárias (Behling 1997, 2002; Behling et al. 2004). As transformações ocorridas ao longo do Quaternário resultaram na distribuição das formações vegetacionais no Recente,

sendo o estado o limite meridional das matas tropicais do Bioma Mata Atlântica, e o limite setentrional das formações campestres no Bioma Pampa (Behling et al. 2004, Bauermann 2009).

No Rio Grande do Sul encontra-se o limite entre duas sub-regiões zoogeográficas, a região Brasileira que corresponde a porção tropical e a Patagônica que incorpora elementos temperados da paisagem, dividindo-o no sentido leste-oeste (Morrone 2010). Ao norte desta divisão encontram-se elementos típicos da região Brasileira compreendendo a unidade morfológica do Planalto das Araucárias, e ao sul são encontrados os elementos típicos da Patagônica, esta sub-região incorpora as unidades morfológicas Depressão Central, Escudo Sul-Rio-Grandense e Planície Costeira. As escarpas da Serra Geral atuam como separador das sub-unidades Brasileira e Patagônica, porém no extremo oeste a fisionomia é comum as duas sub-unidades (Dantas et al. 2010).

Diferentes estudos realizados nessa região de transição evidenciam a influência das particularidades da paisagem do Rio Grande do Sul na composição e distribuição de várias linhagens encontradas em cada sub-região. As escarpas da Serra Geral são apontadas como potencial barreira para a dispersão de espécies como observado em roedores, como por exemplo *Oxymycterus nasutus* (Peçanha et al. 2017), e também em processos de diversificação, em *Scapteromys tumidus* e *S. meridionalis* (Quintela et al. 2014), *Deltamys kempfi* e *D. araucária* (Quintela et al. 2017), *Akodon reigi* e *A. paranaensis* (Christoff et al. 2000), composição e riqueza de formigas e cupins (Diehl et al. 2014). Tal barreira possivelmente também atue na diversificação de plantas adaptadas a áreas abertas (em campos) do gênero *Petunia* e *Calibrachoa* (Mäder et al. 2013), presentes tanto nas planícies do bioma Pampa, como nos campos de altitude, regiões de altitude elevadas dentro da Mata Atlântica.

1.4. Citogenética em aves

As análises citogenéticas permitem acessar o número, forma e tamanho dos cromossomos de uma espécie. Os cariótipos típicos para as Aves são compostos por um alto número diploide (aproximadamente $2n=80$) e são caracterizados pela presença de um grupo de cromossomos chamados de microcromossomos, geralmente pequenos e numerosos (Griffin et al. 2007). Este padrão de cariótipo está presente em todas as aves Paleognatas (Aves basais) [exceto em *Casuaris casuaris* ($2n=92$)] e na maioria das Aves Neognatas (Aves modernas) (Gunki et al. 2000, Nishida-Umehara et al. 2007, Nanda et al. 2011). Embora exista uma alta percentagem de espécies com cariótipos típicos, existem espécies com cariótipos atípicos, seja pelo alto número diploide, tais como os Piciformes ou pelo baixo número diploide, tais como os Falconiformes (Kretschmer et al. 2018a). Geralmente cada espécie de ave é caracterizada pela constância do número diploide e morfologias cromossômicas entre as populações, entretanto, alguns casos de polimorfismos cromossômicos foram descritos em espécies de Aves. Um dos casos mais completos foi observado em *Zonotrichia albicollis*, onde polimorfismos do segundo par cromossômico foram associados com variações na plumagem e comportamento (Thomas et al. 2008).

A citogenética molecular associa a citogenética clássica com a biologia molecular através da técnica de Hibridização *in situ*. A hibridização é realizada pela aplicação de sondas que permitem a marcação de cromossomos inteiros ou sequências dentro dos cromossomos, essa técnica é conhecida como pintura cromossômica. A pintura cromossômica em aves tem permitido a detecção de rearranjos cromossômicos de forma mais precisa do que com as técnicas de citogenética clássica (coloração convencional com

giemsa e bandeamentos cromossômicos) (Kretschmer et al. 2018b). A utilização desta técnica em diferentes espécies mostrou que na maioria das linhagens de Aves, os dez primeiros pares de *Gallus gallus* (GGA), mais o Z, encontram-se conservados como grupos sintênicos, com exceção do par 4, que aparece fissionado em dois elementos (par 4 e par 11, que correspondem ao braço curto e braço longo do par 4 de *Gallus gallus*, respectivamente) (Shetty et al. 1999, Griffin et al. 2007, Nanda et al. 2008). Este resultado levou à proposição de que o cariótipo ancestral das Aves (PAK) teria $2n=80$, e contaria com os grupos sintênicos semelhantes aos de *Gallus gallus* ($2n=78$), com exceção do par 4, que estaria fissionado no cariótipo ancestral. Em todas as espécies de Passeriformes analisadas até o momento foi encontrada a fissão do cromossomo 1 e a manutenção do cromossomo PAK4 e PAK10 separadamente (exceto *Sylvia atricapilla*, a qual apresenta a mesma característica derivada observada em GGA: PAK4 + PAK11). Além disso, com a utilização de sondas cromossômicas de *Leucopternis albicollis* foi identificada uma complexa reorganização do cromossomo 1q ancestral (GGA1q), envolvendo inversões paracêntricas e pericêntricas em espécies de Oscines e Suboscines (Kretschmer et al. 2014, 2015, 2018b; dos Santos et al. 2015, 2017). A utilização de técnicas de citogenética molecular portanto, tem possibilitado a obtenção de informações detalhadas sobre a evolução cariotípica entre as Aves.

1.5 Genética populacional e processos históricos

A estrutura genética de uma população e a forma como a diversidade genética está distribuída entre as populações é resultado da combinação de processos históricos e contemporâneos (Brown 1978, Templeton et al. 1995). A estruturação descreve como a variação genética está distribuída dentro e entre as populações enquanto a diversidade

genética mede a quantidade de variação presente numa população (Lowe et al. 2004). A similaridade entre as populações depende do nível de fluxo gênico existente entre elas, o qual é dependente da taxa de migração entre as populações (Futuyma 1997). O fluxo gênico é responsável pela homogeneização da variação genética entre as populações.

Os eventos históricos podem propiciar, reduzir ou interromper o fluxo gênico entre as populações. Esses eventos históricos, como os ocorridos durante o Pleistoceno, podem influenciar nos processos de retração e expansão das populações, e portanto, seu estudo permite entender os padrões de estruturação genética contemporâneos dos táxons (Hewitt 2000), e também testar hipóteses sobre os fatores que promoveram essas divergências (McDonald 2003).

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para acessar a estruturação genética das populações. Os marcadores moleculares correspondem à locos gênicos que apresentem variabilidade adequada para estudar um problema biológico (Avice 1994). Esses marcadores permitem, portanto o acesso aos dados da composição genética das espécies. Além de permitir o acesso a informações sobre a diversidade e estruturação genética, podem traçar a distribuição da variação genética das populações e a história evolutiva de espécies (Templeton et al. 1995).

JUSTIFICATIVA

O tico-tico ocorre em formações abertas Neotropicais. No Rio Grande do Sul ele é encontrado nas áreas do Bioma Pampa, nos Campos de Altitude da Mata Atlântica e em áreas abertas pela atividade humana. A história evolutiva da espécie foi influenciada pelos eventos climáticos do Pleistoceno. Vários estudos foram conduzidos com a espécie e sugerem que as variações comportamentais, morfológicas e genéticas observadas ao longo de sua distribuição sejam resultantes das variadas condições ambientais das áreas que ocupam (Nottebohm 1975, Lijtmaer e Tubaro 2007, Loughheed et al. 2013, Campagna et al. 2014).

O cariótipo da espécie ($2n=80$) foi descrito através de uso de técnicas de citogenética clássica (de Lucca 1974) e polimorfismos nos cromossomos 2 e 4 foram identificados (de Lucca e Rocha 1985, Rocha et al. 1990). Apesar dos estudos cariotípicos já realizados, ainda se desconhece a origem dos rearranjos responsáveis pelos polimorfismos observados no cariótipo de *Z. capensis*, portanto, a aplicação de técnicas de citogenética molecular, como a pintura cromossômica, possibilitaria o entendimento dos rearranjos e auxiliaria na compreensão da evolução do cariótipo nessa espécie. Vários estudos utilizando a citogenética molecular, principalmente a pintura cromossômica, permitiram a construção de análises comparativas entre os cariótipos das aves devido à maior acurácia desta técnica em relação à citogenética clássica na detecção de rearranjos (Shetty et al. 1999, Griffin et al. 2007, Kretschmer et al. 2018a).

Em relação a estruturação da variabilidade genética, os estudos realizados indicam que as populações de tico-tico dividem-se em três grandes linhagens (denominadas A; B e C) ao longo de sua distribuição (Loughheed et al. 2013, Campagna et al. 2014). A linhagem C, segundo os autores, corresponde as populações que ocorrem no nordeste da Argentina e Brasil, porém populações do Rio Grande do Sul não foram incluídas nessa análise. Os estudos populacionais avaliaram a diversidade genética da espécie através de frequências alozímicas (Loughheed e Handford 1992), polimorfismos de comprimento de fragmentos no DNA mitocondrial

(Lougheed et al. 1993) e com frequências haplotípicas (Chevion e Brumfield 2009). Entretanto, também faltam estudos genéticos populacionais desenvolvidos com as populações do Rio Grande do Sul. Levando em consideração a influência do ambiente sobre a história evolutiva da espécie, como citado acima, a dinâmica vegetacional dos campos do Rio Grande do Sul durante os períodos glaciais e interglaciais (Behling et al. 2004), e a escassez de estudos com aves em áreas de campos (Norambuena et al. 2018), a realização de um estudo populacional permitirá a compreensão da influência desses eventos na estrutura e diversidade genética das populações de *Z. capensis* presentes no estado.

OBJETIVOS

Esta tese tem como objetivo geral caracterizar geneticamente as populações de *Zonotrichia capensis* presentes no estado do Rio Grande do Sul. E como objetivos específicos:

- Entender a organização cromossômica e identificar os rearranjos intercromossômicos e intracromossômicos em *Z. capensis*;
- Comparar o cariótipo de *Z. capensis* com o de *Gallus gallus* e de outras espécies de Passeriformes já estudadas com pintura cromossômica;
- Avaliar os padrões de diversidade genética de populações de *Z. capensis*;
- Verificar a influência do mosaico de habitats formados pelas diferentes fitofisionomias presentes no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) sobre os padrões demográficos da espécie.

CAPÍTULO DOIS

Chromosomal polymorphism and comparative chromosome painting in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*)

Sandra Eloisa Bülau, Rafael Kretschmer, Ricardo José Gunski, Analía del Valle Garnero,
Patricia C. M. O'Brien, Malcom A. Ferguson-Smith, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira e
Thales Renato Ochotorena de Freitas

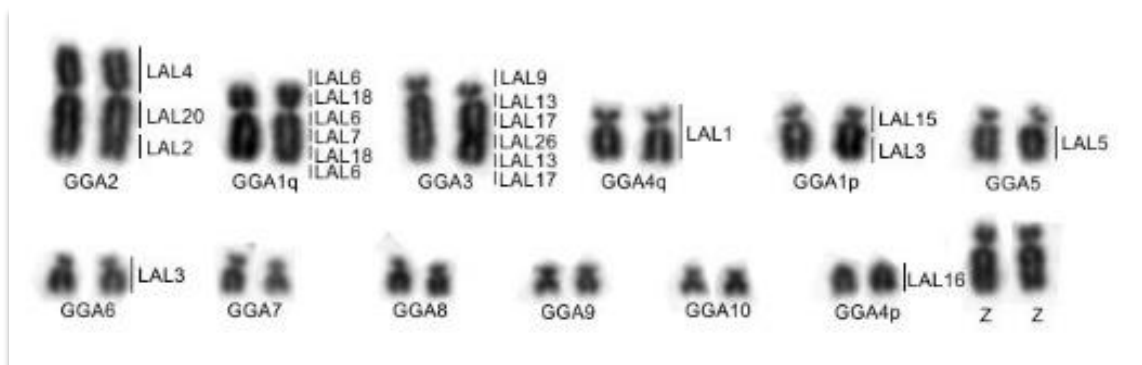
Submetido: 1 de dezembro de 2017

Aceito: 21 de março de 2018

Publicado: dezembro de 2018

Genetics and Molecular Biology, 41, 4, 799-805

Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0367>





Chromosomal polymorphism and comparative chromosome painting in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*)

Sandra Eloisa Bülau¹, Rafael Kretschmer¹, Ricardo José Gunski², Analía del Valle Garnero², Patricia C. M. O'Brien³, Malcolm A. Ferguson-Smith³, Edivaldo Herculano Correa de Oliveira^{4,5} and Thales Renato Ochotorena de Freitas¹

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS, Brazil.

³Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

⁴Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil.

⁵Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (SAMAM), Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brazil.

Abstract

Zonotrichia capensis is widely distributed in the Neotropics. Previous cytogenetic studies demonstrated the presence of polymorphisms in two chromosome pairs (ZCA2 and ZCA4). Here, we report results based on comparative chromosome painting, using probes derived from *Gallus gallus* and *Leucopternis albicollis*, focused on characterizing the chromosome organization of *Z. capensis*. Our results demonstrate the conservation of ancestral syntenies as observed previously in other species of passerine. Syntenies were rearranged by a series of inversions in the second chromosome as described in other Passeriformes, but in this species, by using probes derived from *L. albicollis* we observed an extra inversion in the second chromosome that had not previously been reported. We also report a paracentric inversion in pair 3; this chromosome corresponds to the second chromosome in *Zonotrichia albicollis* and may indicate the presence of ancestral inversions in the genus. The chromosomal inversions we found might be important for understanding the phenotypic variation that exists throughout the distribution of *Z. capensis*.

Keywords: Birds, chromosomal rearrangements, molecular cytogenetics, FISH.

Received: December 1, 2017; Accepted: March 21, 2018.

Introduction

The rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*) is a common small Neotropical passerine. It occurs in open areas from Tierra del Fuego in Argentina to the province of Chiapas in Mexico and from sea level to 5,000 meters above sea level in the Andes Mountains (Sick, 1997; Rising and Jamarillo, 2011; Bird Life International, 2015). It is one of the most polytypic bird species, with more than 20 subspecies described, presenting variations in morphology, migratory behavior, and vocal dialects, which may be due to local adaptation or phenotypic plasticity (Chapman, 1940; Handford, 1983, 1985; Kopuchian *et al.*, 2004; Mo-

ore *et al.*, 2005; Cheviron *et al.*, 2008). However, even with this marked phenotypic variation, *Z. capensis* does not exhibit genetic structuring among its populations, although they present a pattern of different mitochondrial lineages (Lougheed *et al.*, 2013; Campagna *et al.*, 2014).

Classical cytogenetics studies of *Z. capensis* have shown that this species has 80 chromosomes (de Lucca, 1974; de Lucca and Rocha, 1985). Polymorphisms involving two autosomal pairs were also identified, probably due to intrachromosomal rearrangements, such as inversions (de Lucca and Rocha, 1985; Rocha *et al.*, 1990). The polymorphisms described for *Z. capensis* occur in autosomal pairs 2 and 4. Pair 2 can be acrocentric or submetacentric (2^A and 2^{Sm}), while pair 4 can be acrocentric or metacentric (4^A and 4^M) (de Lucca and Rocha, 1985; Rocha *et al.*, 1990). The presence of these two polymorphic pairs, with the occurrence of four chromosomal forms, allows the combination of nine different cytotypes. All possible cyto-

Send correspondence to Thales Renato Ochotorena de Freitas. Laboratório de Citogenética e Evolução, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: thales.freitas@ufrgs.br.

types were found and analyzed, but a geographically structured karyotypic distribution was not found, although there is an apparent positive correlation between the increase in frequency of the 4^M form and high latitudes and low temperatures (Carvalho and Erdtmann, 1987; Souza and de Lucca, 1988, 1991; Rocha *et al.*, 1990).

Chromosomal polymorphisms caused by inversions were identified in other bird species in different macrochromosomes; for example, involving pair 1 in *Vanellus vanellus* (Hammar, 1970), pairs 2 and 5 in species of the genus *Junco* (Shields, 1973) and pair 5 in *Cardinalis cardinalis* (Bass, 1979). The first case of a polymorphism was reported for *Zonotrichia albicollis*, involving both pair 2 and pair 3 (Thornycroft, 1966). Studies performed with bacterial artificial chromosome (BAC) clones indicate that the polymorphism of *Z. albicollis* chromosome 2 was caused by at least two pericentric inversions. In this species, the polymorphism of pair 2 has been correlated with phenotypic and behavioral variations (Thomas *et al.*, 2008).

The vast majority of passerine species have diploid numbers of approximately 80 chromosomes, without substantial variations in genome structure (Christidis, 1990). Fission, fusion and translocation events are rare, but inversions, especially pericentric, are quite common and are regularly found as fixed differences between species and as segregating polymorphisms within species (Hoffmann and Rieseberg, 2008; Faria and Navarro, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

The application of comparative chromosome painting using *Gallus gallus* (GGA) probes allows the identification of homologous syntenic blocks that are conserved in the karyotypes of birds (Griffin *et al.*, 2007). In relation to the presumed ancestral karyotype of birds, the Passeriformes present a fission of the first ancestral chromosome (GGA1) (Guttenbach *et al.*, 2003; Dersujeva *et al.*, 2004; Itoh and Arnold, 2005; de Oliveira *et al.*, 2006; Nanda *et al.*, 2011; Kretschmer *et al.*, 2014, 2015; dos Santos *et al.*, 2015, 2017). The use of GGA probes has proven to be efficient in detecting interchromosomal rearrangements, but they are not very informative regarding intrachromosomal rearrangements and cannot indicate the origin of chromosomal breaks (Guttenbach *et al.*, 2003). On the other hand, the use of probes derived from *Leucopternis albicollis* (LAL) has allowed the identification of sites of evolutionary chromosomal breaks (de Oliveira *et al.*, 2010; Kretschmer *et al.*, 2014) as well as of complex rearrangements of chromosomes corresponding to GGA1q that result in paracentric and pericentric inversions (Kretschmer *et al.*, 2014, 2015; dos Santos *et al.*, 2015, 2017). Therefore, LAL probes can be used to generate hypotheses about the mechanisms responsible for these rearrangements.

Although the chromosomal polymorphisms and the karyotype of *Z. capensis* (ZCA) have been well characterized via classical cytogenetics, the chromosomal mecha-

nisms that caused these rearrangements remain unknown. Thus, in this work, we used molecular cytogenetic techniques to analyze the karyotypes of three individuals of *Z. capensis* with the objective of understanding the chromosomal organization and identifying intrachromosomal rearrangements, as well as comparing the ZCA karyotype with data obtained from other species of Passeriformes.

Material and Methods

Skin biopsies were obtained from three specimens of *Z. capensis* collected in São Gabriel (30°20'45.32" S and 54°19'19.55" W), Rio Grande do Sul State, Brazil. The collections were carried out with the permission of the responsible environmental agency (SISBIO n° 49950-1). The experiments followed protocols approved by the Animal Use Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (project 29745).

The chromosomes were obtained from cell cultures of fibroblasts according to Sasaki *et al.* (1968). The protocol includes treatment with colchicine (0.05%, 1 h, 37 °C), followed by treatment with hypotonic solution (KCL 0.075 M, 15 min, 37 °C) and fixation with methanol/glacial acetic acid (3:1). Metaphases were conventionally stained (5% Giemsa in 0.07 M phosphate buffer, pH 6.8) for observation of the morphology of the macrochromosomes and verification of the polymorphisms of pairs two and four.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with biotin-labeled ribosomal (18S) probes was used for the detection of ribosomal genes, following a protocol described by Daniels and Delany (2003). Chromosome painting was performed with probes of the first ten pairs of GGA chromosomes and with corresponding probes for LAL, GGA1 (LAL3, 6, 7, 15, and 18), GGA2 (LAL2, 4, and 20), GGA3 (LAL9, 13, 17, and 26), GGA4 (LAL1 and 16), GGA5 (LAL5), and GGA6 (LAL3), according to de Oliveira *et al.* (2010). FISH images were photographed through the 63 immersion objective on a Zeiss Imager2 fluorescence microscope and analyzed with AxioVision 4.8 software (Zeiss, Germany).

Results

The *Z. capensis* genome is organized into 80 chromosomes. The first and second pairs are submetacentric, the third and fifth to eighth acrocentric, and ninth and tenth metacentric. The fourth pair is polymorphic, acrocentric or metacentric. The Z sex chromosome is submetacentric, and the W chromosome is metacentric. The remaining chromosome pairs are microchromosomes (Figure 1).

Chromosome painting with *Gallus gallus* probes shows the conservation of ancestral macrochromosomes, with the exception of the chromosome GGA1, which corresponds to two pairs, as in all Passeriformes analyzed to date (Figure 2). *Leucopternis albicollis* probes confirm the results obtained with *G. gallus* probes (Figure 2). 18S rDNA



Figure 1 - Metaphases of three individuals of rufous-collared sparrow showing the occurrence of a polymorphism in pair 4, which has metacentric or acrocentric morphology. (A) Male: metacentric-acrocentric (B) Male: acrocentric-acrocentric, (C) Female: metacentric-metacentric. The arrows indicate the chromosomes of pair 2 (the species shows polymorphisms in this pair, according to the literature, but in the sampled individuals, we observed only the submetacentric morphology) and pair 4.

probes hybridized to one pair of microchromosomes (Figure 2). The homology map is shown in Figure 3.

In addition, *Leucopternis albicollis* chromosome painting allowed the identification of a series of inversions in the chromosome ZCA2 (GGA1q) and one inversion in the chromosome ZCA3 (GGA3). In ZCA2, we observed a break between the fragments of LAL18 and LAL7 and another in the half of LAL6 present in the short arm, leading to a pericentric inversion of the fragment (Figure 4 A,B). In ZCA3 we also observed two breaks, one in LAL13 and one in LAL17 that was followed by a paracentric inversion of the fragment (Figure 4 C,D).

Discussion

The diploid number of *Zonotrichia capensis* is typical of the order Passeriformes, in which the most common number of chromosomes is 76–80, with few macrochromosomes and many microchromosomes (Christidis, 1990; Kretschmer *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015). The chromosomal morphologies are also similar to those from other passerine species described in the literature. It is known that the second and fourth chromosome pairs are polymorphic in this species (de Lucca and Rocha, 1985). However, in the individuals we sampled, we found polymorphisms only in the fourth pair (metacentric or acrocentric).

The ribosomal sites are in only one pair of microchromosomes, as shown by hybridization of the 18S rDNA probe. This is probably an ancestral character, since all paleognath species (Ratites) have this characteristic (Nishida-Umehara *et al.*, 2007). Other passerine species have ribosomal genes in one pair (*Taeniopygia guttata* and *Saltator* genus), two pairs (*Serinus canaria* and *Turdus albicollis*), or three pairs (*Turdus rufiventris*) of microchromosomes (Kretschmer *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2015, 2017). Most likely, in species with more than one pair of microchromosomes with these sequences, duplication of rDNA clusters has occurred with redistribution by translocation (Stitou *et al.*, 1997) or by the action of mobile genetic elements, as reported in plants (Raskina *et al.*, 2008).

Chromosome painting with *Gallus gallus* probes shows the conservation of most of the ancestral macrochromosomes, with the exception of GGA1, which corresponds to two distinct pairs (ZCA2 and ZCA5). The centric fission of the chromosome corresponding to GGA1 has been found in all Passeriformes studied by chromosome painting to date (17 evaluated so far, including ZCA), reinforcing the idea that this was a characteristic present in the last common ancestor of the Passeriformes (Guttenbach *et al.*, 2003; Derjushcheva *et al.*, 2004; Itoh and Arnold, 2005; Nanda *et al.*, 2011; Kretschmer *et al.*, 2014, 2015; dos Santos *et al.*, 2015, 2017).

Like GGA probes, LAL probes confirm the fission of putative avian ancestral chromosome 1 and the conservation of the other macrochromosomes. In addition, these

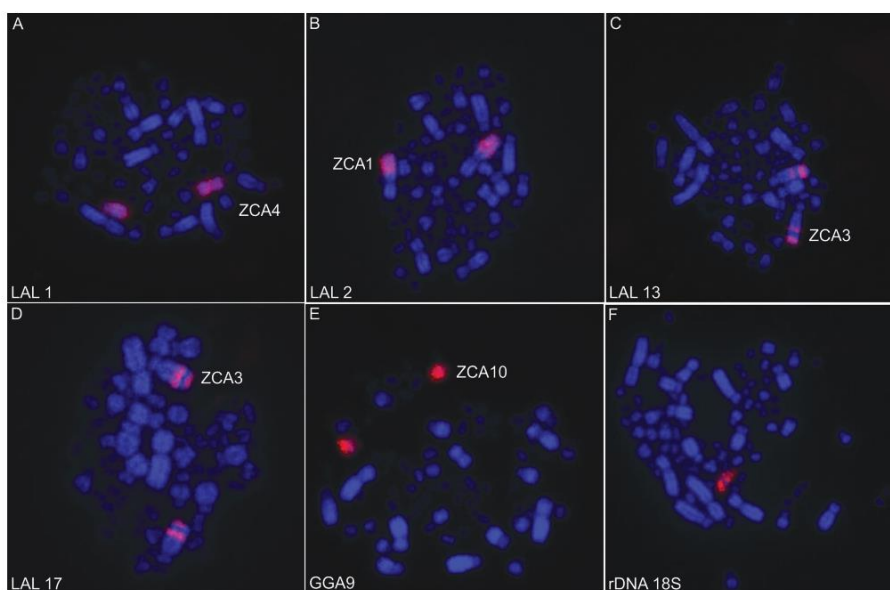


Figure 2 - Chromosome hybridization patterns with *Leucopernis albicollis* (LAL) probes (A: LAL1; B: LAL2; C: LAL13; D: LAL17), *Gallus gallus* (GGA) probes (E: GGA9) and 18S rDNA probes (F) onto rufous-collared sparrow metaphases.

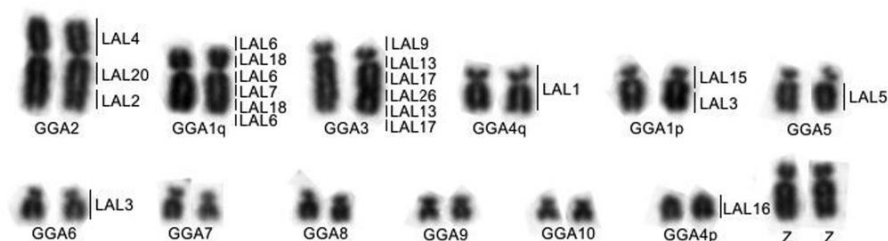


Figure 3 - Partial karyotype of the first 12 autosomal pairs of a male (ZZ) indicating the correspondences with *Gallus gallus* (lower) and *Leucopernis albicollis* (right).

probes revealed inversions (paracentric and pericentric) in the ZCA2 chromosome (GGA1q), as in other Passeriformes (Kretschmer *et al.*, 2014, 2015; dos Santos *et al.*, 2015, 2017). However, the order of LAL segments corresponding to GGA1q was different from those found in the other Passeriformes, probably due to an extra inversion. The main difference observed was the presence of a LAL18 fragment in the short arm in *Z. capensis*, which has not yet been observed in any other passerine (Kretschmer *et al.*, 2014, 2015).

Chromosome ZCA2 is probably homologous to chromosome 3 of *Z. albicollis* (ZAL3) and these two species may share inversions on the same chromosome. It is known that chromosome ZAL2 corresponds to GGA3 (Thomas *et al.*, 2008), but the correspondence between the other ZAL and chicken macrochromosomes is unknown. In all oscine passerines analyzed to date, the first autosomal pair corresponds to GGA2 (Guttenbach *et al.*, 2003; Derjusheva *et al.*, 2004; Itoh and Arnold, 2005; Kretschmer *et al.*, 2014, 2015; dos Santos *et al.*, 2015, 2017), therefore, chromo-

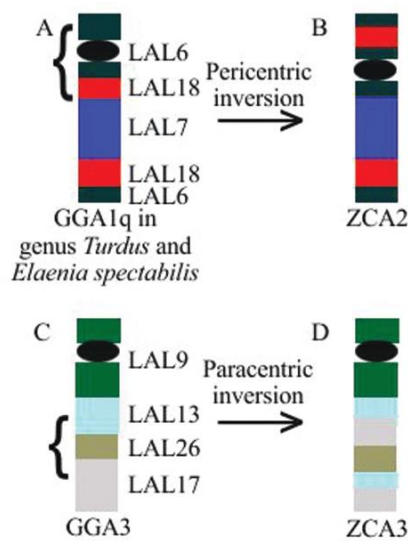


Figure 4 - Inversions on the chromosomes of rufous-collared sparrow demonstrated by the application of probes of *L. albicollis*, compared to other passerines for chromosome ZCA2 and compared to GGA3 for chromosome ZCA3.

some ZAL3 of *Zonotrichia albicollis* probably corresponds to GGA1q. In *Zonotrichia capensis*, we considered chromosome ZCA3 as GGA3 and ZCA2 as GGA1q. Because ZCA2 corresponds to ZAL3, the submetacentric form seems to be ancestral for the genus, as hypothesized by Thorneycroft (1975). The observed inversions may have arisen in the ancestor of these species and been maintained in these two strains. However, more studies are needed to evaluate this hypothesis, mainly by mapping BAC clones. There are currently no studies evaluating the polymorphisms in ZAL3.

Although both *Z. albicollis* and *Z. capensis* have inversions on the chromosome corresponding to GGA3 (ZAL2 and ZCA3, respectively), this inversion in *Z. capensis* does not lead to the observed polymorphism. Interestingly, none of the seven species of passerine analyzed to date with *Leucopternis albicollis* probes (Kretschmer *et al.*, 2014, 2015, dos Santos *et al.*, 2015, 2017) show inversions in the chromosomes corresponding to GGA3. Most probably, further intrachromosomal rearrangements have occurred in this chromosome after the divergence of these species. Alternatively, both species could have shared intrachromosomal rearrangements, because rearrangements on the chromosome that corresponds to GGA3 are not common in passerine species.

With regard to ZCA4, at the moment it is not possible to indicate by chromosome painting alone that the polymorphism on this chromosome was caused by a pericentric inversion or by centromere repositioning, because this chromosome corresponds to an entire chromosome in *Leucopternis albicollis* (LAL1). In avian, intrachromosomal rearrangements are very common and have been identified *in silico* data (Aslam *et al.*, 2010; Volker *et al.*, 2010; Skinner and Griffin, 2012) and by chromosome painting using *L. albicollis* probes (Kretschmer *et al.*, 2014, 2015; dos Santos *et al.*, 2015, 2017). The surprisingly high number of intrachromosomal rearrangements in birds is likely due to the reuse of breakpoints, as previously proposed by Skinner and Griffin (2012). These breakpoint regions show particular enrichment of pseudogenes, long terminal repeats, DNA transposons and long interspersed elements (LINEs) (Skinner and Griffin, 2012; Zhang *et al.*, 2014). However, centromere repositioning has also been reported in birds. The most interesting case is that observed in a comparative study of *G. gallus* and *Alectoris rufa* (ARU), as chromosome 4 is submetacentric in *G. gallus* and acrocentric in *A. rufa*. Previous studies have argued that this difference was due to a pericentric inversion. However, the use of BAC clones for this chromosome showed that the order of the genes is the same in both species, indicating the occurrence of a neocentromere during divergence (Kasai *et al.*, 2003). In *Z. capensis*, chromosome 4 is homologous to GGA4q and ARU4q, so it is possible that there is a similar explanation for the rearrangement in ZCA. Breakpoints on this chromosome may have been reused independently in ZCA and in Galliformes.

In summary, we have demonstrated the occurrence of a series of inversions in ZCA2 (GGA1q), as previously proposed for other species of Passeriformes. However, the order of LAL segments in ZCA is different from those in all other species analyzed so far, mainly due to the presence of a fragment of LAL18 in the short arm, which we report for the first time in Passeriformes. We also observed a paracentric inversion in ZCA3, which was previously described in *Z. albicollis*. The presence of polymorphism of chromosome 2 (homologous to ZCA3) in *Z. albicollis* is associated with phenotypic and behavioral variations (Thomas *et al.*, 2008), although a study of the distribution of the different cytotypes (2^A and 2^{Sm} , 4^A and 4^M) in populations in Brazil did not find a correlation between these polymorphisms and such variations (Souza and de Lucca, 1991). Therefore, further investigations sampling the polymorphism of pair 2 among the numerous subspecies of *Zonotrichia capensis*, as well as using techniques with more refined screening of inversions, such as a BAC cloning map, could shed light on possible relationships between chromosomal polymorphism and the phenotypic differences reported throughout the species distribution.

Acknowledgments

We are grateful to CAPES, CNPq, SISBIO, FAPERGS, UFRGS/PPGBM and Instituto Evandro Chagas for financial and logistic support. We also thank colleagues at the Laboratório de Citogenética e Evolução and Ivanete de Oliveira Furo for technical assistance.

References

- Aslam ML, Bastiaansen JWM, Crooijmans RPMA, Vereijken A, Megens HJ and Groenen MAM (2010) A SNP based linkage map of the turkey genome reveals multiple intrachromosomal rearrangements between the Turkey and Chicken genomes. *BMC Genomics* 11:647.
- Bass RA (1979) Chromosomal polymorphism in Cardinals, *Cardinalis cardinalis*. *Can J Genet Cytol* 21:549-553.
- Campagna L, Kopuchian C, Tubaro PL and Loughheed SC (2014) Secondary contact followed by gene flow between divergent mitochondrial lineages of a widespread Neotropical songbird (*Zonotrichia capensis*). *Biol J Linn Soc* 111:863-868.
- Carvalho MWP and Erdtmann B (1987) Ocorrência de polimorfismo cromossômico em tico-tico (*Zonotrichia capensis*) nos estados do Espírito Santo e Rio Grande do Sul. *Ciênc Cult* 39:782.
- Chapman FM (1940) Post-glacial history of *Zonotrichia capensis*. *Bull Am Mus Nat Hist* 77:381-438.
- Chevireon ZA, Whitehead A and Brumfield RT (2008) Transcriptomic variation and plasticity in rufous-collared sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an altitudinal gradient. *Mol Ecol* 17:4556-4569.
- Christidis L (1990) Animal Cytogenetics 4: Chordata 3 B: Aves. Gebrüder Bornträger, Stuttgart, 116 p.
- Daniels LM and Delany ME (2003) Molecular and cytogenetic organization of the 5S ribosomal DNA array in chicken (*Gallus gallus*). *Chromosome Res* 11:305-317.
- de Lucca EJ (1974) Cariótipos de 14 espécies de aves das ordens Cuculiformes, Galliformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Rev Bras Pesq Med Biol* 7:253-263.
- de Lucca EJ and Rocha GT (1985) Chromosomal polymorphism in *Zonotrichia capensis* (Passeriformes: Aves). *Braz J Genet* 18:71-78.
- de Oliveira EHC, Tagliarini MM, Nagamachi CY and Pieczarka JC (2006) Comparação genômica em aves através de sondas cromossomo-específicas. *Rev Bras Ornitol* 14:47-52.
- de Oliveira EHC, Tagliarini MM, Rissino JD, Pieczarka JC and Nagamachi CY, O'Brien PCM and Ferguson-Smith MA (2010) Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). *Chromosome Res* 18:349-355.
- Derjushva S, Kurganova A, Haberman F and Gaginskaia E (2004) High chromosome conservation detected by comparative chromosome painting in chicken, pigeon and passerine birds. *Chromosome Res* 12:715-723.
- dos Santos MS, Kretschmer R, Silva FAO, Ledesma MA, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Garnero ADV, de Oliveira EHC and Gunski RJ (2015) Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica* 143:535-543.
- dos Santos MS, Kretschmer R, Frankl-Vilches C, Bakker A, Gahr M, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA and de Oliveira EHC (2017) Comparative cytogenetics between two important songbird models: The zebra finch and the canary. *PLoS One* 12:e0170997.
- Faria R and Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol* 25:660-669.
- Griffin DK, Robertson LBW, Tempest HG and Skinner BM (2007) The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetic. *Cytogenet Genome Res* 117:64-77.
- Guttenbach M, Nanda I, Feichtinger W, Masabanda JS, Griffin DK and Schmid M (2003) Comparative chromosome painting of chicken autosomal paints 1-9 in nine different bird species. *Cytogenet Genome Res* 103:173-184.
- Hammar B (1970) The karyotypes of thirty-one birds. *Heredity* 65:29-58.
- Handford P (1983) Continental patterns of morphological variation in a South American sparrow. *Evolution* 37:920-930.
- Handford P (1985) Morphological relationships among subspecies of the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Can J Zool* 63:2383-2388.
- Hoffmann AA and Rieseberg LH (2008) Revisiting the impact of inversions in evolution: From population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Syst* 39:21-42.
- Itoh Y and Arnold AP (2005) Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. *Chromosome Res* 13:47-56.
- Kasai F, Garcia C, Arruga MV and Ferguson-Smith MA (2003) Chromosome homology between chicken (*Gallus gallus domesticus*) and the red-legged partridge (*Alectoris rufa*): Evidence of the occurrence of a neocentromere during evolution. *Cytogenet Genome Res* 102:326-330.
- Kopuchian C, Lijtmaer DA, Tubaro PL and Handford P (2004) Temporal stability and change in a microgeographical pattern of song variation in the rufous-collared sparrow. *Anim Behav* 68:551-559.
- Kretschmer R, Gunski RJ, Garnero ADV, Furo IO, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA and de Oliveira EHC (2014) Molecular cytogenetic characterization of multiple intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS One* 9:e103338.
- Kretschmer R, de Oliveira EHC, dos Santos MS, Furo IO, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Garnero ADV and Gunski RJ (2015) Chromosome mapping of the large elaeinia (*Elaenia spectabilis*): Evidence for a cytogenetic signature for passeriform birds? *Biol J Linn Soc* 115:391-398.
- Loughheed SC, Campagna L, Dávila JA, Tubaro PL, Lijtmaer DA and Handford P (2013) Continental phylogeography of an ecologically and morphologically diverse Neotropical songbird, *Zonotrichia capensis*. *BMC Evol Biol* 13:58.
- Moore IT, Bonier F and Wingfield JC (2005) Reproductive asynchrony and population divergence between two tropical bird populations. *Behav Ecol* 16:755-762.
- Nanda I, Benisch P, Fetting D, Haaf T and Schmid M (2011) Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1-10

- in different Avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. *Cytogenet Genome Res* 132:165–181.
- Nishida-Umehara C, Tsuda Y, Ishijima J, Ando J, Fujiwara A, Matsuda Y and Griffin DK (2007) The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Res* 15:721–734.
- Raskina Q, Barber JC, Nevo E and Belyayev A (2008) Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: Speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 120:351–357.
- Rocha GT, Lucca EJ and Souza EB (1990) Chromosome polymorphism due to pericentric inversion in *Zonotrichia capensis* (Emberizidae-Passeriformes-Aves). *Genética* 80:201–207.
- Sasaki M, Ikeuchi T and Maino S (1968) A feather pulp culture for avian chromosomes with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. *Experientia* 24:1923–1929.
- Shields GF (1973) Chromosomal polymorphism common in the several species of *Junco* (Aves). *Can J Genet Cytol* 15:461–471.
- Skinner BM and Griffin DK (2012) Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: Evidence for regions prone to breakpoints. *Heredity* 108:37–41.
- Stitou S, Burgos M, Zurita F, Jiménez R, Sánchez A and Guardia RD (1997) Recent evolution of NOR-bearing and sex chromosomes of the North African rodent *Lemniscomys barbarus*. *Chromosome Res* 5:481–485.
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 912 p.
- Souza EB and Lucca EJ (1988) Polimorfismo cromossômico em *Zonotrichia capensis*: frequência dos citótipos. *Ciênc Cult* 40:764.
- Souza EB and Lucca EJ (1991) Populational study of chromosome polymorphism in *Zonotrichia capensis* (Emberizidae-Passeriformes-Aves). *Braz J Genet* 14:359–372.
- Thomas JW, Caceres M, Lowman JJ, Morehouse CB, Short ME, Baldwin EL, Maney DL and Martin CL (2008) The chromosomal polymorphism linked to variation in social behavior in the white-throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*) is a complex rearrangement and suppressor of recombination. *Genetics* 179:1455–1468.
- Thornycroft HB (1966) Chromosomal polymorphism in the white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis* (Gmelin). *Science* 154:1571–1572.
- Thornycroft HB (1975) A cytogenetic study of the white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis* (Gmelin). *Evolution* 29:611–621.
- Volker M, Backstrom N, Skinner BM, Langley EJ, Bunzey SK, Ellegren H and Griffin DK (2010) Copy number variation, chromosome rearrangement, and their association with recombination during avian evolution. *Genome Res* 20:503–511.
- Zhang G, Li C, Li Q, Li B, Larkin DM, Lee C, Storz JF, Antunes A, Greenwold MJ, Meredith RW *et al.* (2014) Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science* 346:1311–1320.

Internet Resources

- BirdLife International (2015) Species factsheet: *Zonotrichia capensis*, <http://www.birdlife.org> (accessed 10 March 2015).
- Rising J and Jaramillo A (2011) Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia capensis*). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, Christie DA and de Juana E (eds) *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. <http://www.hbw.com/node/61910> (accessed 10 March 2015).

Associate Editor: Yatiyo Yonenaga-Yassuda

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

CAPÍTULO TRÊS

Variação genética em *Zonotrichia capensis* (Aves: Passeriformes): ausência de estruturação genética em um ambiente heterogêneo no sul do Brasil

Sandra Eloisa Bülau¹, Willian Thomaz Peçanha¹ e Thales Renato Ochotorena de Freitas¹

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15007, Porto Alegre, RS 91501-970, Brasil.

*Correspondência: sbulau@yahoo.com.br

Artigo em preparação: *The Condor*

Texto principal: *The Condor: Ornithological Applications*

Título

Variação genética em *Zonotrichia capensis* (Aves: Passeriformes): ausência de estruturação genética em um ambiente heterogêneo no sul do Brasil

Autores

Sandra Eloisa Bülau¹, Willian Thomaz Peçanha¹ e Thales Renato Ochotorena de Freitas¹

Autor para correspondência

Sandra Eloisa Bülau: sbulau@yahoo.com.br

Afiliações

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 15007, Porto Alegre, RS 91501-970, Brasil.

RESUMO

Neste estudo, foi analisado a estruturação populacional e a demografia histórica do Passeriforme, adaptado a áreas abertas, *Zonotrichia capensis*. Também foi avaliada a influência dos efeitos da dinâmica campo-floresta, ao longo do Pleistoceno superior, no tamanho efetivo e na estrutura populacional presente no sul do Brasil, utilizando simulações coalescentes e rede de haplótipos. Foram abordadas duas questões principais: (1) *Z. capensis*, apresenta estrutura genética populacional congruente com a observada em outros organismos na América do Sul? (2) As diferentes fisionomias presentes no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) influenciaram o tamanho efetivo da população de *Z. capensis*? Para investigar essas questões, foram sequenciados 597 pares de bases do marcador mitocondrial D-loop, e 562 pares de bases do

Intron 5 do gene beta-fibrinogênio de 138 indivíduos de 14 localidades do sul do Brasil. Ambos os marcadores moleculares revelaram ausência de estrutura genética nas populações de *Z. capensis* em áreas com distintas fitofisionomias. Testes de neutralidade baseados em ambos os loci, mostraram significativa expansão demográfica. As análises Bayesianas *Skyline Plot*, realizadas de forma independente com os marcadores, sugerem expansão demográfica entre 40 ~ 10 mil anos (incluindo o período do último máximo glacial), seguida de período de estabilidade populacional. Desta forma, os resultados mostram que a história da diversificação de organismos na região Neotropical é complexa, e que nem todos os táxons, em especial as aves, parecem ter sofrido os efeitos das glaciações (ou dos períodos interglaciais).

Palavras-chave:

Aves; Campos Neotropicais; sul do Brasil; variação genética; tico-tico

INTRODUÇÃO

Os processos geológicos e climatológicos têm participação fundamental na diversificação da biodiversidade e podem explicar os padrões de distribuição e composição das espécies nos ambientes (Turchetto-Zolet et al. 2013, Ali e Aitchison 2014). Os ciclos climáticos do Quaternário tiveram grande importância na dinâmica de expansão e retração das florestas e savanas na América do Sul (Coltrinari 1993). Durante os períodos interglaciais (mais quentes) as florestas expandiram suas distribuições, enquanto nos períodos glaciais (mais frios) as formações abertas tiveram suas maiores distribuições (Behling e Negrelle 2001, Behling et al. 2004, Carnaval e Moritz 2008, Turchetto-Zolet et al. 2013).

As formações abertas estão distribuídas de forma descontínua pelo neotrópico e formam um mosaico de diferentes tipos de campos das regiões temperadas, de altitude e de zonas subtropicais e tropicais (Suttie et al. 2005). Os campos neotropicais foram mais extensos durante

o Último Máximo Glacial (20.000 anos atrás), provavelmente sua fauna esteve conectada durante esse período e começou a ficar isolada apenas recentemente (Haffer 1969), com graus de conectividade variando com a altitude e localização geográfica. Essa dinâmica de expansão e retração dos campos teve influência na história evolutiva das espécies que ocorrem nessas formações abertas, e promoveram eventos de expansões populacionais quando as condições ambientais foram mais favoráveis, seguidos de reduções populacionais ou mesmo extinções quando os habitats adequados foram reduzidos (Hewitt 2000, Carnaval e Moritz 2008, Werneck et al. 2012).

No Brasil os campos estão presentes em todos os biomas e na região sul eles ocupam grande parte da paisagem. No Rio Grande do Sul os campos, presentes em porções com cotas altimétricas de zero a 1.300 metros de altitude, formam uma paisagem heterogênea e estão incluídos em dois biomas, Bioma Pampa na porção sul e Mata Atlântica na porção norte do estado (IBGE 2004, Andrade et al. 2019), onde formam um mosaico com as florestas de Araucária (Overbeck et al. 2007, Andrade et al. 2019). O Rio Grande do Sul ocupa uma zona transicional entre climas temperados e tropicais (Cabrera e Willink 1980) e é o limite entre duas sub-regiões zoogeográficas, a região Brasileira e a Patagônica, dividindo-o no sentido leste-oeste (Morrone 2010).

Estudos paleoambientais mostram que extensas áreas de campos predominavam nas paisagens do Rio Grande do Sul no final do Último Máximo Glacial (Behling 1997, 2002). Essa paisagem começou a mudar entre quatro a três mil anos quando as Matas de Araucária começaram a expandir a partir das florestas de galeria ao longo dos rios (Behling 2002, Behling et al. 2004). Essas transformações vegetacionais e a geomorfologia da região são responsáveis pela configuração da paisagem no Recente (Moreira 2003). Estudos realizados com roedores (Christoff et al. 2000, Quintela et al. 2014, 2017; Peçanha et al. 2017), comunidades de formigas e cupins (Diehl et al. 2014) e espécies de petúnias (Mäder et al. 2013, John et al. 2019) nessa região de transição evidenciam a influência das particularidades da paisagem do Rio Grande do

Sul na composição das populações de espécies encontradas em cada sub-região e em processos de especiação, e apontam as escarpas da Serra Geral como barreira para a dispersão das espécies.

Neste estudo foram realizadas análises genéticas em *Zonotrichia capensis*, sendo este pioneiro em análises populacionais com aves nessa região de transição. Esse pássaro, popularmente conhecido como tico-tico, é amplamente distribuído pelas áreas de formação aberta das Américas, que incluem as regiões desérticas e montanhosas dos Andes, desertos de terras baixas, campos, estepes patagônicas e as áreas campestres e regiões serranas do domínio Amazônico (Chapman 1940, Sick 1997, BirdLife International 2019). Ocorre em um grande gradiente altitudinal e latitudinal desde a Província de Chiapas no México, até a Terra do Fogo na Argentina (Sick 1997, BirdLife International 2019, Rising, J. & Jaramillo 2019). É territorialista e considerado residente na maior parte de sua distribuição (Chapman 1940, Sick 1997). As variações morfológicas observadas ao longo de sua distribuição foram usadas para a denominação de mais de 20 subespécies (Chapman 1940, Handford 1983, 1985).

A diversidade de habitats ocupados por *Z. capensis* propicia um cenário para a adaptação local (Cheviron et al., 2008). Estudos comportamentais indicam que as variações observadas no canto e presença de dialetos estão relacionadas aos diferentes tipos de vegetação e a gradientes altitudinais presentes nos habitats ocupados (Nottebohm 1975, Handford 1981, Handford e Loughheed 1991, Lijtmaer e Tubaro 2007), mas não com as subespécies designadas (Nottebohm 1969, Handford 1983, Handford e Loughheed 1991, Lijtmaer e Tubaro 2007). Ainda, estudos demonstram que os dialetos podem ter evoluído e assim reduzir o fluxo gênico entre populações vizinhas que estão expostas a diferentes pressões seletivas (Nottebohm e Selander 1972). Os estudos genéticos (Zink et al. 1991, Loughheed e Handford 1992, Loughheed et al. 1993, Zink e Blackwell 1996) também indicam que há uma forte relação entre as mudanças nas variáveis climáticas e de vegetação, principalmente em transectos altitudinais, com as variações morfológicas e comportamentais observadas, sugerindo uma adaptação local aos diferentes

ambientes ocupados pela espécie (Cheviron e Brumfield 2009, Loughheed et al. 2013, Campagna et al. 2014).

A história demográfica de *Z. capensis* foi influenciada pelos eventos biogeográficos do Quaternário. A distribuição da variação genética da espécie é estruturada em três grandes linhagens (A, B e C). A linhagem A compreende populações da América Central, noroeste da América do Sul e da República Dominicana. Na linhagem B estão representadas as populações da República Dominicana, Venezuela, Bolívia, Chile e das porções noroeste, central e patagônica da Argentina. E na linhagem C são encontrados haplótipos do nordeste da Argentina e do Brasil. Em duas localidades são observados componentes genéticos correspondentes a duas linhagens, na República Dominicana onde são encontrados haplótipos das linhagens A e B e em Corrientes, Argentina onde são encontrados haplótipos das linhagens B e C. Essas três linhagens se diversificaram rapidamente durante Quaternário, e mostram sinais de expansão com baixo fluxo gênico histórico entre si, e ausência de estruturação genética dentro dos clados (Loughheed et al. 2013, Campagna et al. 2014). Na linhagem C, onde estão os haplótipos das localidades do Brasil, poucos pontos foram amostrados e no Brasil apenas dois locais, um no nordeste e outro no norte, foram avaliados geneticamente por Loughheed e colaboradores (2013). Dessa forma, os objetivos deste estudo foram avaliar (i) os padrões de diversidade genética do tico-tico, e (ii) avaliar a influência do mosaico de habitats formado pelas diferentes fitofisionomias presentes no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) sobre a distribuição da variabilidade genética entre as populações de *Z. capensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Declaração de ética

Os procedimentos adotados durante as coletas seguiram as recomendações presentes no Manual de Anilhamento de Aves Silvestres (IBAMA 1994). As coletas foram realizadas com

licença do ICMBio – SISBio (SISBio 49950-4) e aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto 29745).

Amostragem

Neste estudo foi analisado um conjunto de 138 amostras coletadas em 14 localidades no estado do Rio Grande do Sul - Brasil (Figura 1, Tabela S1). Cinco na região denominada como Mata Atlântica (MA), três na Zona de Transição (ZA) e seis no Pampa. Atividades de campo foram conduzidas em 11 localidades no Estado do Rio Grande do Sul, entre os anos de 2016 e 2018, onde foram coletadas amostras de tecido de 110 espécimes de *Z. capensis*. Os indivíduos foram atraídos por playback e capturados usando redes de neblina. Amostras de sangue foram coletadas da veia braquial com agulha estéril, estocadas em papel filtro e depositadas no banco de tecidos do Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Também foram utilizadas amostras provenientes do Parque Estadual do Espinilho (n=10), cedidas pelo Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS, e amostras das localidades de Dom Pedrito (n=8) e São Gabriel (n=10) cedidas pelo Laboratório de Diversidade Genética Animal da Universidade Federal do Pampa Campus São Gabriel. A amostragem abrange o mosaico formado pelas diferentes fitosisionomias da Mata Atlântica e Pampa presentes no estado. O detalhamento das amostras é fornecido na **Tabela S1**.

Extração e amplificação do DNA

O DNA total foi extraído a partir de amostras de sangue e músculo usando digestão com proteinase K seguida do protocolo de extração com CTAB (Doyle e Doyle 1987). Foram amplificados dois marcadores moleculares, um fragmento mitocondrial e um nuclear: (1) Região Controladora (D-loop) utilizando os primers ZnGluF3 e LCA1-REV271 (Lougheed et al. 2013) ; (2) o Intron 5 do gene do β -fibrinogênio (Fib-5) com os primers Fib5 e Fib6 (Marini e Hackett 2002). O mix para as reações em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reactions – PCR)

para um volume final de 25µl de KCL bufffer continham 50ng de DNA genômico, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 0,5 mM de dNTPs e 1 unidade de Taq DNA polimerase platinun™ (Invitrogen™). Controles negativos foram incluídos em todos os PCRs para verificar a existência de contaminações.

As condições dos PCRs foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 38 ciclos com 30 s a 94°C, 40 s na temperatura de anelamento de cada par de primer (D-loop: 63°C e Fib-5: 55°C), 1 min a 72°C; e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram corados com GelRed-Biotium® e visualizados em gel de agarose a 1%. A purificação foi realizada na Macrogen Inc. (Seoul, South Korea), na qual também os produtos de PCR foram sequenciados em sequenciador automático ABI 3730. Os marcadores nucleares foram sequenciados tanto pela cadeia pesada (*heavy strand*), quanto pela cadeia leve (*light strand*).

Alinhamento, edição das sequencias e fase gamética

Os cromatogramas foram visualizados no programa Chromas Lite v.2.6.5 (<https://technelysium.com.au/wp/>), sendo editados e alinhados usando o algoritmo MUSCLE (Edgar 2004), implementado no programa MEGA X v10.0.3 (Kumar et al. 2018). Todos os alinhamentos foram inspecionados e corrigidos manualmente.

Para o marcador nuclear (Fib-5), os sítios heterozigotos presentes em ambas as sequências, *forward* e *reverse*, foram codificados de acordo com o código IUPAC. A fase gamética dos indivíduos heterozigotos foi resolvida usando o algoritmo PHASE (Stephens et al. 2001) com valores default no DNASP 5. (Librado e Rozas 2009) e 0,7 de probabilidade mínima. Para 15 amostras a fase gamética não foi resolvida, pelo algoritmo PHASE, com no mínimo 0,7 de probabilidade posterior, e estas foram removidas das análises futuras. Todas as sequências obtidas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso: D-loop, **XXXXXX** a **XXXXXX** e Fib-5, **XXXXXX** a **XXXXXX**.

Estatísticas genéticas básicas e estruturação populacional

Para avaliar a diversidade genética das populações foram estimados número de sítios variáveis (S), número de haplótipos (h), diversidade de haplótipos (Hd), diversidade de nucleotídeos (π) e média das diferenças nucleotídicas (k) usando os programas DNASP v5.10 (Librado e Rozas 2009) e ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer 2010) para ambos os marcadores (D-loop e Fib-5).

Redes de haplótipos foram geradas usando o algoritmo *Median-joining* implementado no programa Network 5.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>), para testar a relação entre os haplótipos e a distribuição geográfica presente no estado do Rio Grande do Sul. Foram realizadas Análises Bayesianas de Estruturação Populacional (BAPS) (BAPS 5.3 Corander e Marttinen 2006, Corander et al. 2008) para acessar o número de populações, sem informação a priori da localidade das amostragens, para os conjuntos de dados mitocondrial e nuclear separadamente. As análises foram rodadas assumindo o modelo de mistura para determinar o número mais provável de populações (k) para o conjunto de dados testado.

Uma análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier et al. 1992) foi realizada para checar o nível de estruturação populacional entre localidades, para cada gene separadamente usando o programa ARLEQUIN v3.5. A Significância das análises foi obtida com 1000 permutações. Também foram aplicadas AMOVAs sob três modelos hierárquicos, realizadas para examinar a partição da variância genética para os dados mitocondriais e nucleares: (a) 'entre as localidades' e 'dentro das localidades', (b) 'entre clusters (norte e sul)', 'entre clusters dentro dos clusters norte/sul' e 'dentro dos clusters', (c) 'entre três fitofisionomias (Mata Atlântica [MA], Zona de Transição [ZN] e Pampa)', 'entre clusters dentro das três fitofisionomias' e 'dentro das fitofisionomias'. No cluster norte foram incluídas as localidades de Porto Vera Cruz, Palmeira das Missões, São José dos Ausentes, Tio Hugo e Vacaria; No cluster sul estão as localidades de Cachoeira do Sul, Chuí, Dom Pedrito, Santa Maria, São Gabriel, Santo Antônio da Patrulha, Manoel Viana, Parque Estadual do Espinilho e Pelotas. Já para os três clusters das

fitofisionomias, Porto Vera Cruz, Palmeira das Missões, São José dos Ausentes, Tio Hugo e Vacaria correspondem ao cluster MA; Cachoeira do Sul, Santa Maria e Santo Antônio da Patrulha ao cluster ZN e Chuí, Dom Pedrito, São Gabriel, Manoel Viana, Parque Estadual do Espinilho e Pelotas ao cluster Pampa.

Análises Demográficas

As assinaturas de expansão populacional, equilíbrio ou declínio para os clusters (investigados na subdivisão populacional via AMOVA) e localidades foram inferidas a partir das estatísticas D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu (Fu 1997), computadas no ARLEQUIN v3.5 (EXCOFFIER e LISCHER 2010).

A distribuição *pairwise mismatch* foi realizada no DNASP v.5.10 para inferir a demografia histórica de *Z. capensis* do sul do Brasil, calculada com a frequência esperada com base em um modelo de declínio do crescimento populacional. A soma dos desvios quadrados (SSDs) entre a distribuição de *mismatch* observada e esperada e o índice de irregularidade (r) foram calculados para testar a hipótese nula de expansão espacial usando o ARLEQUIN v3.5. Além disso, foi realizada a análise Bayesiana *Skyline Plot* (BSP), que não pressupõe, *a priori*, nenhum modo de crescimento e infere o tamanho efetivo da população ao longo do tempo com base na teoria coalescente (Heled e Drummond 2008). O análise BSP foi realizada tanto para o marcador mitocondrial (D-loop), como para o nDNA (Fib-5) utilizando o programa BEAST v1.8.4 (Drummond e Rambaut 2007).

Foram realizadas quatro análises independentes executadas por 40×10^7 gerações (amostragem a cada 10.000 e 20% de queima), frequências de bases empíricas, em um modelo de substituição GTR + I em relação as sequências de D-loop, e HKY+G para o Fib-5. Os modelos de substituição foram obtidos no software jModelTest 2 (Posada e Crandall 1998), e escolhidos pelo melhor resultado de substituição baseados no critério de Akaike (AIC). As taxas de substituição e datas estimadas de estudos anteriores foram utilizadas para calibrar o relógio

molecular relaxado e tempos aproximados de divergência para os conjuntos de dados desse estudo. Para o conjunto de dados mitocondrial, foi implementado uma distribuição normal prévia baseado na taxa de substituição aplicada ao grupo-irmão de *Zonotrichia*, o gênero *Junco* com 1.5 Myr⁻¹, e um desvio padrão (SD) de 0.25 Myr⁻¹, para permitir a incerteza da taxa evolutiva (Milá et al. 2007), e para o marcador nuclear 0.37 Myr⁻¹ e SD 0.25 Myr⁻¹ (Axelsson et al. 2004). A reconstrução do método BSP foi realizada de forma independente no programa Tracer v1.7 (Rambaut et al. 2018) e a mediana e o intervalo de credibilidade de 95% foram plotados em função do tempo.

RESULTADOS

Diversidade e estrutura genética populacional

Para o D-loop foram obtidas sequências com 597 pares de base (n=114) e de 562 pares de base para o Fib-5 (n=124). O fragmento de mtDNA (D-loop) apresentou 27 haplótipos distintos, definidos por 24 sítios polimórficos. Após a reconstrução haplotípica realizada para o marcador nuclear (Fib-5), um total de 109 amostras (resultando em 218 haplótipos) apresentaram probabilidade superior a $p > 0,7$. Dessa forma, após a exclusão dos sítios ambíguos, o conjunto de dados reduzidos para o Fib-5 apresentou 29 haplótipos com 20 sítios polimórficos. Não foram verificados indels (deleções ou inserções) em nenhum marcador molecular. O padrão dos índices de diversidade (e.g. diversidade de haplótipos, diversidade nucleotídica e número médio de diferenças de pares) para ambos marcadores é apresentado na **Tabela 1**. As estatísticas para os marcadores em cada localidade são apresentadas na **Tabela S2**.

Diferentes esquemas categóricos foram aplicados para identificar a estruturação genética populacional presente no Rio Grande do Sul. Em relação as redes de haplótipos, tanto as sequências mitocondriais (D-Loop), como nucleares (Fib-5) apresentaram ausência de estruturação genética (**Figura 2c e 2d**). Entre os haplótipos H1-H12 e H12-H9 existem 2 e 3 passos mutacionais respectivamente, os restantes dos haplótipos se diferenciaram por um sítio de

substituição. As redes haplotípicas apresentaram uma relação evolutiva reticulada, mais marcada nas sequências nucleares, embora os haplótipos mitocondriais apresentem mais haplótipos de baixa frequência do que em relação aos nucleares. Os haplótipos mais comuns (H3 e H6 para mtDNA, e H1, H4 e H16 para nDNA) foram encontrados em locais geograficamente distantes, e também nas distintas fitofisionomias e/ou biomas explorados. Ainda, os haplótipos mais frequentes, H3 mtDNA e H1 nDNA, foram amostrados em todas as localidades (**Figura 2, Tabela 2**).

Em relação a distribuição dos haplótipos nos agrupamentos testados, dos 27 haplótipos obtidos para o D-loop (**Figura 2c, Tabela 3**), foram encontrados dez haplótipos de baixa frequência com ocorrência apenas no cluster Pampa, um no cluster ZN e oito haplótipos estavam presentes apenas no cluster MA. Apenas dois haplótipos (H3 e H6) estão compartilhados entre os três clusters. Três são compartilhados entre as localidades dos clusters Pampa e ZN, um entre Pampa e MA e dois entre ZN e MA (**Figura 3a**).

Para o Fib-5, dos 29 haplótipos obtidos, seis são compartilhados em pelo menos uma localidade de cada um dos três clusters (Pampa; MA; ZN). Um haplótipo está presente tanto no cluster Pampa como no ZN; quatro ocorrem em localidades dos clusters Pampa e do MA, e um haplótipo é compartilhado entre as localidades de ZN e MA (**Figura 2d, Tabela 3**). No cluster Pampa foram encontrados 10 haplótipos de baixa frequência que não foram amostrados nos outros clusters. O cluster ZN teve um haplótipo único e seis haplótipos foram amostrados exclusivamente no cluster MA (**Figura 3b**).

Considerando o conjunto de dados não-estruturado, os resultados da AMOVA mostraram que existe mais variação (tanto do mtDNA, como do nDNA) dentro das localidades (> 95%), do que entre as localidades amostradas ($\leq 4,12\%$) (**Tabela 3**), não indicando uma diferenciação genética entre as localidades/populações (mtDNA: $\Phi_{ST} = 0,04117$, $P < 0,05$; nDNA: $\Phi_{ST} = 0,02337$, $P > 0,05$). Ainda, quando aplicados os três níveis hierárquicos da AMOVA, independente dos critérios de agrupamento propostos, seja com clusters (norte e sul) ou com três

fitofisionomias, não encontramos estruturação genética evidente entre os grupos hipotéticos para ambos marcadores. Assim, a AMOVA indicou que a maior porcentagem de variação genética foi observada dentro dos clusters ou fitofisionomias, > 95% ($P < 0,05$) para D-loop, e > 97% ($P > 0,05$) para Fib-5, indicando que a estrutura genética entre localidades é baixa (mtDNA) ou ausente (Fib-5). As análises BAPS (**Figura 2e e 2f**) indicaram a presença de quatro populações para o D-loop e sete para Fib-5. No entanto esses clusters não foram coerentes espacialmente, corroborando a ausência de estruturação genética indicada pela rede de haplótipos e AMOVAs.

Testes de neutralidade e expansão demográfica

Os testes de neutralidade, em relação ao panorama geral, foram negativos e significativos para D de Tajima e F_s de Fu, para o mtDNA e nDNA (exceto o D de Tajima negativo e não significativo para o Fib-5), indicando que *Z. capensis* pode ter experimentado uma expansão populacional recente (**Tabela 1**). Por outro lado, os diferentes critérios de agrupamento aplicados ao Fib-5 apresentou valores positivos para o teste D de Tajima (0.11200 a 2.09579) em diferentes critérios de agrupamento, o que poderia ser um indicador de contração (poucos sítios segregantes/muitas diferenças entre pares).

Os resultados da distribuição *mismatch* para análise de mtDNA e nDNA foram aproximadamente unimodais (**Figura 4**). Para o marcador mitocondrial, a estatística da soma dos desvios quadrados (SSD) foram não significativos (SSD = 0.00037085, $P = 0,942$), e o índice de irregularidade Harpending's (r : 0.02484142, $P = 0,924$) sob os modelos de expansão falharam em rejeitar o modelo de expansão espacial. Padrões semelhantes sugerem expansão demográfica para o nDNA (SSD = 0.01957936, $P = 0,4969$; r : 0.02744524, $P = 0,72790$).

A forte evidência de expansão demográfica veio da análise da BSP. Os resultados mostraram padrões diferentes entre os conjuntos de dados mitocondriais e nucleares. Para o marcador de mtDNA, os resultados mostraram um crescimento relativamente constante no tamanho efetivo da população ao longo do tempo (0.010 – 0.043 Ma), seguido de uma

estabilidade demográfica/declínio suave a partir de dez mil anos atrás (**Figura 4**). Para o nDNA, foi observado um tamanho populacional constante nos últimos 50 mil anos até 20 mil, após uma longa fase de estabilidade demográfica; a população então pareceu ter experimentado uma fase de expansão demográfica acelerada de aproximadamente 0.005 – 0.020 Ma, seguida por uma possível diminuição no tamanho da população há 5 mil anos.

DISCUSSÃO

Estrutura populacional e demográfica em *Zonotrichia capensis*

Nesse estudo foi acessada a variação na diversidade e estrutura genética de *Zonotrichia capensis* em nível populacional. As amostras foram coletadas em áreas de campo de localidades pertencentes aos dois biomas que ocorrem no estado do Rio Grande do Sul, Pampa (na região sul) e Mata Atlântica (na região norte). Os resultados das Análises Bayesianas da Estrutura da População (BAPS), das AMOVAs, juntamente com as redes de haplótipos, baseadas em loci mitocondriais e nucleares, corroboram para um cenário de ausência estruturação genética populacional em *Zonotrichia capensis* na população avaliada. Assim, independente da estratégia aplicada para inferir estruturação populacional, as localidades não formam grupos genéticos distintos considerando que eles não se agrupam em grandes *clusters* exclusivos para cada um dos dois biomas ou fitofisionomias propostos.

As análises das sequências dos marcadores mitocondrial e nuclear indicam ausência de estruturação genética entre as localidades testadas, embora a distribuição dos haplótipos do mtDNA sugira uma fraca estruturação populacional. A presença de haplótipos com baixa frequência em apenas algumas localidades, para esse marcador, diferenciam fracamente os agrupamentos Pampa e MA. A fraca estruturação apresentada pelo mtDNA poderia indicar uma menor taxa de dispersão das fêmeas. Embora estimativas de distância de dispersão não estejam disponíveis para *Z. capensis*, estudos realizados com uma espécie do mesmo gênero, *Z. leucophrys*, indicam que ambos os sexos dispersam, mas que os machos tendem a ser mais

filopátricos do que as fêmeas (Morton 2002). Portanto, um viés de dispersão populacional baseado no sexo, parece não ser a causa das diferenças nos resultados observadas entre os marcadores utilizados.

Cheviron e Brumfield (2009) atribuíram a discrepância encontrada na estruturação da variação genética em populações de *Z. capensis*, nos marcadores mitocondriais e nucleares à importância funcional da mitocôndria. Nesse caso citado pelos autores acima, as populações foram amostradas em gradiente com abrupta variação altitudinal, os haplótipos mitocondriais poderiam estar sendo influenciados por um balanço entre seleção ao ambiente e migração. Os resultados obtidos neste estudo indicam taxas de fluxo gênico de moderadas a altas entre as localidades amostradas, indiferente do ambiente e gradiente altitudinal. E as análises de divergência populacional indicam que o maior percentual de variação genética está dentro das localidades. Assim, a explicação proposta pelos autores citados acima parece não se aplicar a população desse estudo. Por outro lado, a discordância observada em marcadores mitocondriais e nucleares é esperada devido as características de herança desses genomas. O DNA mitocondrial é haplóide e herdado uniparentalmente, e portanto representa um quarto do tamanho efetivo populacional. O que poderia explicar a causa de divergências na estruturação populacional apresentada por esses marcadores em casos onde não existem barreiras ao fluxo gênico (Toews e Brelsford 2012). As diferenças observadas na distribuição dos haplótipos de ambos os marcadores utilizados nesse estudo poderiam então ser atribuídas a maneira como cada marcador reconstrói a história evolutiva da espécie.

Efeitos da dinâmica campo-floresta

Estudos filogeográficos e populacionais ainda são escassos para as formações abertas da América do Sul. Embora alguns estudos realizados evidenciem a influência da heterogeneidade dessas paisagens campestres e dos eventos geoclimáticos ocorridos durante o Pleistoceno, a história evolutiva das espécies que ocupam os campos foram influenciadas de diferentes

maneiras (Felappi et al. 2015, Moreno et al. 2018). Espécies de aves (Norambuena et al. 2018), ou complexo de espécies de aves (Campagna et al. 2013, van Els et al. 2019), que ocorrem nos Campos Neotropicais, com longo tempo de divergência tiveram suas histórias evolutivas afetadas de maneira mais profunda pelos eventos geoclimáticos do Pleistoceno e apresentam clados genéticos estruturados ao longo de suas distribuições. Por outro lado, em aves com história evolutiva mais recente são identificados processos de expansão populacional e maior fluxo gênico (Lima-Rezende et al. 2019). Fato semelhante acontece com aves da Mata Atlântica, onde a história evolutiva das espécies foi afetada de diferentes maneiras pelos eventos do Pleistoceno (Cabanne et al. 2016). Estudos filogeográficos com espécies de aves dessa região, exemplo *Sclerurus scansor cearensis* e *Xiphorhynchus atlanticus* demonstram que suas populações tiveram fortes reduções, e mesmo eventos de gargalos de garrafa (Cabanne et al. 2007, D'Horta et al. 2011), enquanto outras espécies, como *Shiffornis virescens* e *Myiothlypis leucoblephara*, mantiveram populações estáveis durante o período de retração das formações florestais (Batalha-Filho et al. 2012, Cabanne et al. 2013, 2016).

Ao longo de sua distribuição *Z. capensis* apresenta três clados distintos, com sinais de expansão recente e baixo fluxo gênico entre eles (Lougheed et al. 2013, Campagna et al. 2014), embora estudos genéticos tenham indicado diferenciação populacional quando as populações ocorrem em diferentes tipos de vegetação e gradientes altitudinais (Lougheed e Handford 1992, Lougheed et al. 1993, Cheviron e Brumfield 2009). A diversidade genética dentro dos clados é pouco explorada, principalmente no clado C, proposto por Lougheed e colaboradores (2013), que corresponde as populações que ocorrem no Brasil. No estado do Rio Grande do Sul, as escarpas da Serra Geral constituem uma marcada característica geomorfológica entre as paisagens do sul da Mata Atlântica e do Pampa. No ponto de contato oriental entre esses dois biomas as escarpas poderiam ter atuado como barreira para a dispersão entre o Pampa e as atuais áreas abertas da Mata Atlântica. A influência das escarpas é demonstrada em estudos populacionais e/ou filogeográficos em diferentes táxons que associam esta característica geológica com a promoção

de descontinuidades genéticas (Christoff et al. 2000, Mäder et al. 2013, Quintela et al. 2014, Diehl et al. 2014, Peçanha et al. 2017, John et al. 2019). Entretanto, para a população de *Z. capensis* aqui estudada, tal barreira geográfica parece não ter influência sobre a estrutura genética populacional, já que a espécie apresenta ausência de estruturação genética.

Z. capensis é uma espécie recente, seu tempo de divergência e posterior expansão pelo Neotropico é estimado em 140 mil anos (Zink et al. 1991, Loughheed et al. 2013). Os significativos sinais de expansão demográfica, corroborados pelos resultados negativos e não-significativos dos testes de neutralidade, sugerem que a espécie tenha experimentado expansão demográfica iniciada há 50 - 40.000 anos. Essa fase de expansão populacional é concordante com o período de maior expansão dos campos na América do Sul (Behling 1997). Por volta de 10 mil anos se inicia um período de estabilidade que se prolonga até o presente. Este período coincide com o final do Último Máximo Glacial no qual ocorreram mudanças climáticas e transformações vegetacionais rápidas, responsáveis pela diminuição das áreas de campo na região desse estudo (Behling 2002, Behling et al. 2004). Portanto, é provável que a expansão populacional observada, esteja relacionada às mudanças climáticas que ocorreram localmente nesse período.

Ainda, embora a porção norte do estado esteja atualmente sob o domínio Mata Atlântica, a ocupação dessas áreas por formações florestais se iniciou há quatro mil anos (Behling et al. 2004). As áreas abertas do domínio Mata Atlântica, os campos de altitude, formam conexões com os campos do Bioma Pampa, o que permite o fluxo gênico entre essas regiões e a consequente homogeneidade genética observada entre as populações de *Z. capensis*. Estes fatores podem justificar a ausência de estruturação genética da população de tico-tico em um ambiente climático e fitogeográfico heterogêneo como o encontrado no estado do Rio Grande Sul.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a população de *Z. capensis* apresenta uma distribuição homogênea de sua variação genética, apesar da leve tendência à estruturação

demonstrada pelo marcador mitocondrial. A dinâmica demográfica revelou crescimento populacional durante o período glacial (40.000 – 10.000 anos atrás) e estabilidade a partir do início do período interglacial (10.000 anos atrás – presente) para a população presente no extremo sul do Brasil. O período de crescimento populacional deste passeriforme, coincide com o período em que a paisagem da região de estudo era dominada por pastagens (gramíneas) e a fase de estabilidade coincide com o período de mudanças ecológicas ocorridas após o final do Último Máximo Glacial. As escarpas da Serra Geral, indicadas como barreira geográfica ao fluxo gênico para outros táxons, parecem não ter influência sobre a dinâmica populacional dessa espécie. Pode-se considerar, através das taxas de fluxo gênico e os indicativos de expansão populacional encontrados, que ainda não tenha decorrido tempo suficiente para divergências genéticas entre as localidades, tal como proposto para explicar a ausência de estruturação genética na espécie em outros passeriformes (Anjos 2006, Batalha-Filho et al. 2012, Cabanne et al. 2013). Assim, neste estudo de caso com perspectiva populacional, elucidamos parcialmente a trajetória evolutiva desse pássaro, que pode não ter sofrido ainda os efeitos das expansões das formações florestais que moldaram as regiões leste da América do Sul. Esse estudo além de contribuir para explicar a história evolutiva de *Z. capensis*, demonstra que a complexa história biogeográfica da América do Sul afetou as espécies ou grupos de espécies de diferentes formas.

LITERATURA CITADA

- Ali, J. R., e J. C. Aitchison (2014). Exploring the combined role of eustasy and oceanic island thermal subsidence in shaping biodiversity on the Galápagos. *Journal of Biogeography* 41:1227–1241.
- Andrade, B. O., C. L. Bonilha, G. E. Overbeck, E. Vélez-Martin, R. G. Rolim, S. A. L. Bordignon, A. A. Schneider, C. Vogel Ely, D. B. Lucas, É. N. Garcia, E. D. dos Santos, et al. (2019). Classification of South Brazilian grasslands: Implications for conservation. *Applied Vegetation Science* 22:168–184.
- Anjos, L. dos (2006). Bird species sensitivity in a fragmented landscape of the Atlantic Forest in Southern Brazil 1. *Biotropica* 38:229–234.
- Axelsson, E., N. G. C. Smith, H. Sundström, S. Berlin, e H. Ellegren (2004). Male-biased mutation rate and divergence in autosomal, Z-linked and W-linked introns of chicken and turkey. *Molecular Biology and Evolution* 21:1538–1547.
- Batalha-Filho, H., G. S. Cabanne, e C. Y. Miyaki (2012). Phylogeography of an Atlantic Forest

- passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65:892–902.
- Behling, H. (1997). Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). *Review of Palaeobotany and Palynology* 97:109–121.
- Behling, H. (2002). South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: A synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177:19–27.
- Behling, H., e R. R. B. Negrelle (2001). Tropical Rain Forest and Climate Dynamics of the Atlantic Lowland, Southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research* 56:383–389.
- Behling, H., V. D. P. Pillar, L. Orlóci, e S. G. Bauermann (2004). Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 203:277–297.
- BirdLife International (2019). Species factsheet: *Zonotrichia capensis*. [Online.] Available at <http://www.birdlife.org>.
- Cabanne, G. S., L. Calderón, N. Trujillo-Arias, P. Flores, R. O. Pessoa, F. D’Horta, e C. Y. Miyaki (2016). Pleistocene climate changes affected species ranges and evolutionary processes in the Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*:856–872.
- Cabanne, G. S., F. R. Santos, e C. Y. Miyaki (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91:73–84.
- Cabanne, G. S., E. H. R. Sari, D. Meyer, F. R. Santos, e C. Y. Miyaki (2013). Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish Schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). *Journal of Ornithology* 154:371–384.
- Cabrera, A. L., e A. Willink (1980). *Biogeografia da America Latina*. 2º edição. OEA, Washington.
- Campagna, L., C. Kopuchian, P. L. Tubaro, e S. C. Lougheed (2014). Secondary contact followed by gene flow between divergent mitochondrial lineages of a widespread Neotropical songbird (*Zonotrichia capensis*). *Biological Journal of the Linnean Society* 111:863–868.
- Campagna, L., L. F. Silveira, P. L. Tubaro, e S. C. Lougheed (2013). Identifying the sister species to the rapid capuchino seedeater radiation (Passeriformes: *Sporophila*) . *The Auk* 130:645–655.
- Carnaval, A. C., e C. Moritz (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35:1187–1201.
- Chapman, F. M. (1940). The post-glacial history of *Zonotrichia capensis*. *Bulletin American Museum of Natural History* LXXVII:381–438.
- Chevron, Z. A., e R. T. Brumfield (2009). Migration-selection balance and local adaptation of mitochondrial haplotypes in Rufous-Collared Sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an elevational gradient. *Evolution* 63:1593–1605.
- Chevron, Z. A., A. Whitehead, e R. T. Brumfield (2008). Transcriptomic variation and plasticity in rufous-collared sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an altitudinal gradient. *Molecular Ecology* 17:4556–4569.
- Christoff, A. U., V. Fagundes, I. J. Sbalqueiro, M. S. Mattevi, e Y. Yonenaga-Yassuda (2000). Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 81:838–851.
- Coltrinari, L. (1993). Global Quaternary changes in South America. *Global and Planetary Change* 7:11–23.
- Corander, J., e P. Marttinen (2006). Bayesian identification of admixture events using multilocus

- molecular markers. *Molecular Ecology* 15:2833–2843.
- Corander, J., P. Marttinen, J. Sirén, e J. Tang (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9:539.
- D’Horta, F. M., G. S. Cabanne, D. Meyer, e C. Y. Miyaki (2011). The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20:1923–1935.
- Diehl, E., E. Diehl-Fleig, E. Z. De Albuquerque, e L. K. Junqueira (2014). Richness of Termites and Ants in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Sociobiology* 61.
- Doyle, J. J., e J. L. Doyle (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9:11–15.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32:1792–7.
- van Els, P., H. V. Norambuena, e R. S. Etienne (2019). From pampa to puna: Biogeography and diversification of a group of Neotropical obligate grassland birds (*Anthus*: Motacillidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*:1–12.
- Excoffier, L., e H. E. L. Lischer (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, e J. M. Quattro (1992). Analyses of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- Felappi, J. F., R. C. Vieira, N. J. R. Fagundes, e L. V. Verrastro (2015). So far away, yet so close: Strong genetic structure in *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), a species with restricted geographic distribution in the Brazilian and Uruguayan Pampas. *PLoS ONE* 10:1–19.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science* 165:131–137.
- Handford, P. (1981). Vegetational correlates of variation in the song of *Zonotrichia capensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 8:203–206.
- Handford, P. (1983). Continental patterns of morphological variation in a south american sparrow. *Evolution* 37:920–930.
- Handford, P. (1985). Morphological relationships among subspecies of the Rufous-collared Sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Canadian Journal of Zoology* 63:2383–2388.
- Handford, P., e S. C. Loughheed (1991). Variation in duration and frequency characters in the song of the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*, with respect to habitat, trill dialects and body size. *The Condor* 93:644–658.
- Heled, J., e A. J. Drummond (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology* 8:289.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913.
- IBAMA (1994). Manual de anilhamento de aves silvestres.
- IBGE, I. B. de G. e E. (2004). Mapa da vegetação do Brasil e mapa de biomas do Brasil. [Online.] Available at <http://www.ibge.gov.br>.
- John, A. L. de W., G. Mäder, J. N. Fregonezi, e L. B. Freitas (2019). Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 42:108–119.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, e K. Tamura (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549.
- Librado, P., e J. Rozas (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.

- Lijtmaer, D. A., e P. L. Tubaro (2007). A reversed pattern of association between song dialects and habitat in the rufous-collared sparrow. *The Condor* 109:658.
- Lima-Rezende, C. A., A. V. Rocha, A. F. Couto, É. de Souza Martins, V. Vasconcelos, e R. Caparroz (2019). Late Pleistocene climatic changes promoted demographic expansion and population reconnection of a Neotropical savanna-adapted bird, *Neothraupis fasciata* (Aves: Thraupidae). *PLoS ONE* 14:1–19.
- Lougheed, S. C., L. Campagna, J. A. Dávila, P. L. Tubaro, D. A. Lijtmaer, e P. Handford (2013). Continental phylogeography of an ecologically and morphologically diverse Neotropical songbird, *Zonotrichia capensis*. *BMC evolutionary biology* 13:58.
- Lougheed, S. C., e P. Handford (1992). Vocal dialects and the structure of geographic variation in morphological and allozymic characters in the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Evolution* 46:1443–1456.
- Lougheed, S. C., P. Handford, e A. J. Baker (1993). Mitochondrial DNA hyperdiversity and vocal dialects in a subspecies transition of the rufous-collared sparrow. *The Condor* 95:889–895.
- Mäder, G., J. N. Fregonezi, A. P. Lorenz-Lemke, S. L. Bonatto, e L. B. Freitas (2013). Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evolutionary Biology* 13:178.
- Marini, M. Â., e S. J. Hackett (2002). A multifaceted approach to the characterization of an intergeneric hybrid manakin (Pipridae) from Brazil. *The Auk* 119:1114–1120.
- Milá, B., J. E. McCormack, G. Castañeda, R. K. Wayne, e T. B. Smith (2007). Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:2653–2660.
- Moreira, I. (2003). O espaço rio-grandense. 5ª edição. Ática, São Paulo.
- Moreno, E. M. S., L. B. De Freitas, P. R. Speranza, e V. G. Solís Neffa (2018). Impact of Pleistocene geoclimatic events on the genetic structure in mid-latitude South American plants: Insights from the phylogeography of *Turnera sidoides* complex (Passifloraceae, Turneroideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 188:377–390.
- Morrone, J. J. (2010). América do Sul e geografia da vida: comparação de algumas propostas de regionalização. In *Biogeografia da América do Sul: padrões e processos* (C. J. B. Carvalho e E. A. B. Almeida, Organizadores). Editora Rocca Limitada, São Paulo, p. 14–40.
- Morton, M. L. (2002). The mountain white-crowned sparrow: migration and reproduction at high altitude. *Studies in Avian Biology* 24.
- Norambuena, H. V., P. Van Els, C. P. Muñoz-Ramírez, e P. F. Victoriano (2018). First steps towards assessing the evolutionary history and phylogeography of a widely distributed Neotropical grassland bird (Motacillidae: *Anthus correndera*). *PeerJ* 6:e5886.
- Nottebohm, F. (1969). The song of the chingolo, *Zonotrichia capensis*, in Argentina: description and evaluation of a system of dialects. *The Condor* 71:299–315.
- Nottebohm, F. (1975). Continental patterns of song variability in *Zonotrichia capensis*: some possible ecological correlates. *The American Naturalist* 109:605–624.
- Nottebohm, F., e R. K. Selander (1972). Vocal dialects and gene frequencies in the chingolo sparrow (*Zonotrichia capensis*). *The Condor* 74:137–143.
- Overbeck, G. E., S. C. Müller, A. Fidelis, J. Pfadenhauer, V. D. Pillar, C. C. Blanco, I. I. Boldrini, R. Both, e E. D. Forneck (2007). Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9:101–116.
- Peçanha, W. T., S. L. Althoff, D. Galiano, F. M. Quintela, R. Maestri, G. L. Gonçalves, e T. R. O. Freitas (2017). Pleistocene climatic oscillations in Neotropical open areas: Refuge isolation in the rodent *Oxymycterus nasutus* endemic to grasslands. *PLOS ONE* 12:e0187329.
- Posada, D., e K. A. Crandall (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution.

- Bioinformatics 14:817–818.
- Quintela, F. M., F. Bertuol, E. M. González, P. Cordeiro-Estrela, T. R. O. De Freitas, e G. L. Gonçalves (2017). A new species of *Deltamys* Thomas, 1917 (Rodentia: Cricetidae) endemic to the southern Brazilian Araucaria Forest and notes on the expanded phylogeographic scenario of *D. kempfi*. *Zootaxa* 4294:71.
- Quintela, F. M., G. L. Gonçalves, S. L. Althoff, I. J. Sbalqueiro, L. F. B. Oliveira, e T. R. O. De Freitas (2014). A new species of swamp rat of the genus *Scapteromys* Waterhouse, 1837 (Rodentia: Sigmodontinae) endemic to Araucaria angustifolia Forest in Southern Brazil. *Zootaxa* 3811:207.
- Rambaut, A., A. J. Drummond, D. Xie, G. Baele, e M. A. Suchard (2018). Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. [Online.] Available at <https://academic.oup.com/sysbio/article/67/5/901/4989127>.
- Rising, J. & Jaramillo, A. (2019). Rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*). Handbook of the Birds of the World Alive. Lynx Edicions, Barcelona.
- Sick, H. (1997). Ornitologia Brasileira. 2º edição. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- Stephens, M., N. J. Smith, e P. Donnelly (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American journal of human genetics* 68:978–89.
- Suttie, J. M., S. G. Reynolds, e C. Batello (2005). Grasslands of the world. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123:597–601.
- Toews, D. P. L., e A. Brelsford (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21:3907–3930.
- Turchetto-Zolet, A. C., F. Pinheiro, F. Salgueiro, e C. Palma-Silva (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular ecology* 22:1193–213.
- Werneck, F. P., C. Nogueira, G. R. Colli, J. W. Sites, e G. C. Costa (2012). Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography* 39:1695–1706.
- Zink, R. M., e R. C. Blackwell (1996). Patterns of allozyme, mitochondrial DNA, and morphometric variation in four sparrow genera. *The Auk* 113:59–67.
- Zink, R. M., D. L. Dittmann, e W. L. Rootes (1991). Mitochondrial DNA variation and the phylogeny of *Zonotrichia*. *The Auk* 108:578–584.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos a Dra. Carla S. Fontana do Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, e aos doutores Analía de Valle Garnero e Ricardo J. Gunski do Laboratório de Diversidade Genética Animal da Universidade Federal do Pampa Campus São Gabriel, por viabilizarem amostras para este estudo. Também somos gratos a Bruna E. Szynwelski, Caroline C. Sartor, Rafael Kretschmer e Thamara Almeida pela ajuda nas atividades de campo.

Financiamento: Esta pesquisa foi apoiada pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declaração de ética: Esta pesquisa foi realizada com as seguintes autorizações e permissões: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) SISBio 49950-4 e Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto 29745).

FIGURAS

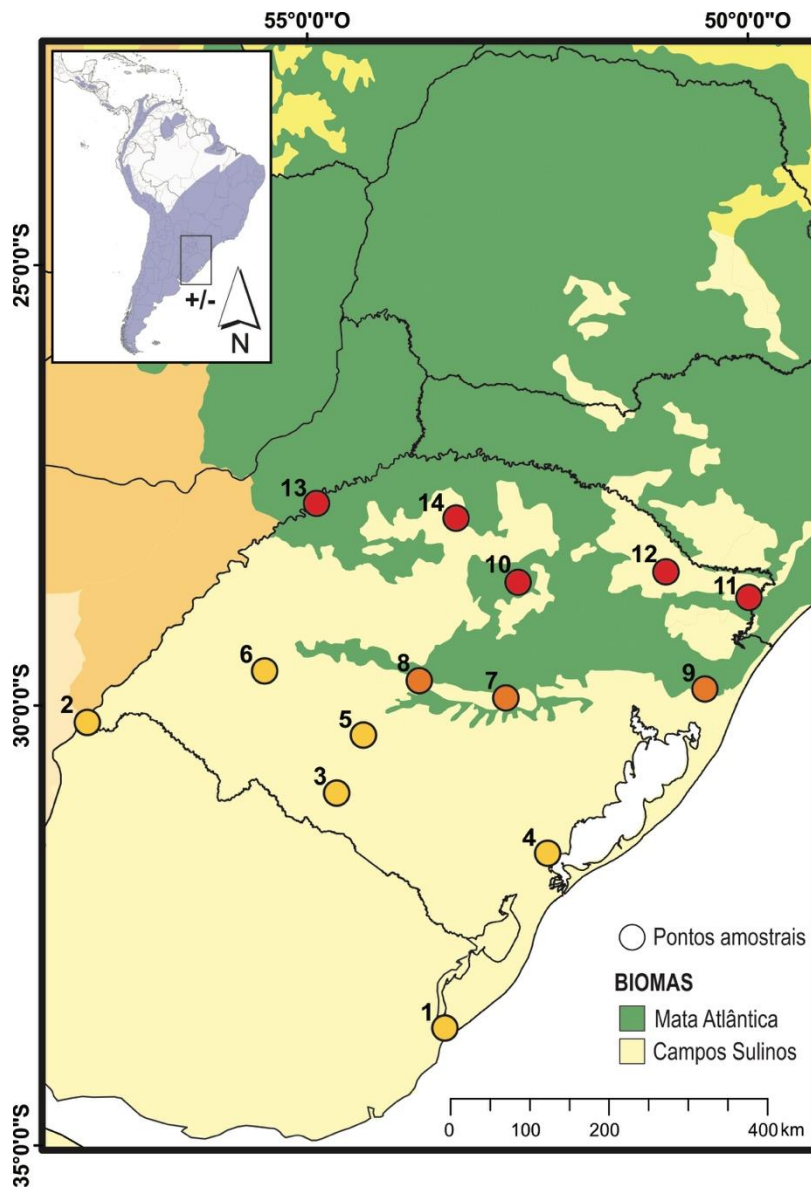


Figura 1. Pontos amostrais de *Zonotrichia capensis* no estado do Rio Grande do Sul. As cores representam as divisões populacionais propostas de acordo com as características fitofisionômicas da localidade amostrada. Em amarelo (Pampa): 1 – Chuí; 2 – Parque Estadual do Espinilho; 3 – Dom Pedrito; 4 – Pelotas; 5 – São Gabriel; 6 – Manoel Viana. Em alaranjado (zona de transição): 7 – Cachoeira do Sul; 8 – Santa Maria; 9 - Santo Antônio da Patrulha; Em vermelho (Mata Atlântica): 10 – Tio Hugo; 11 – São José dos Ausentes; 12 – Vacaria; 13 – Porto Vera Cruz; 14 – Palmeira das Missões.

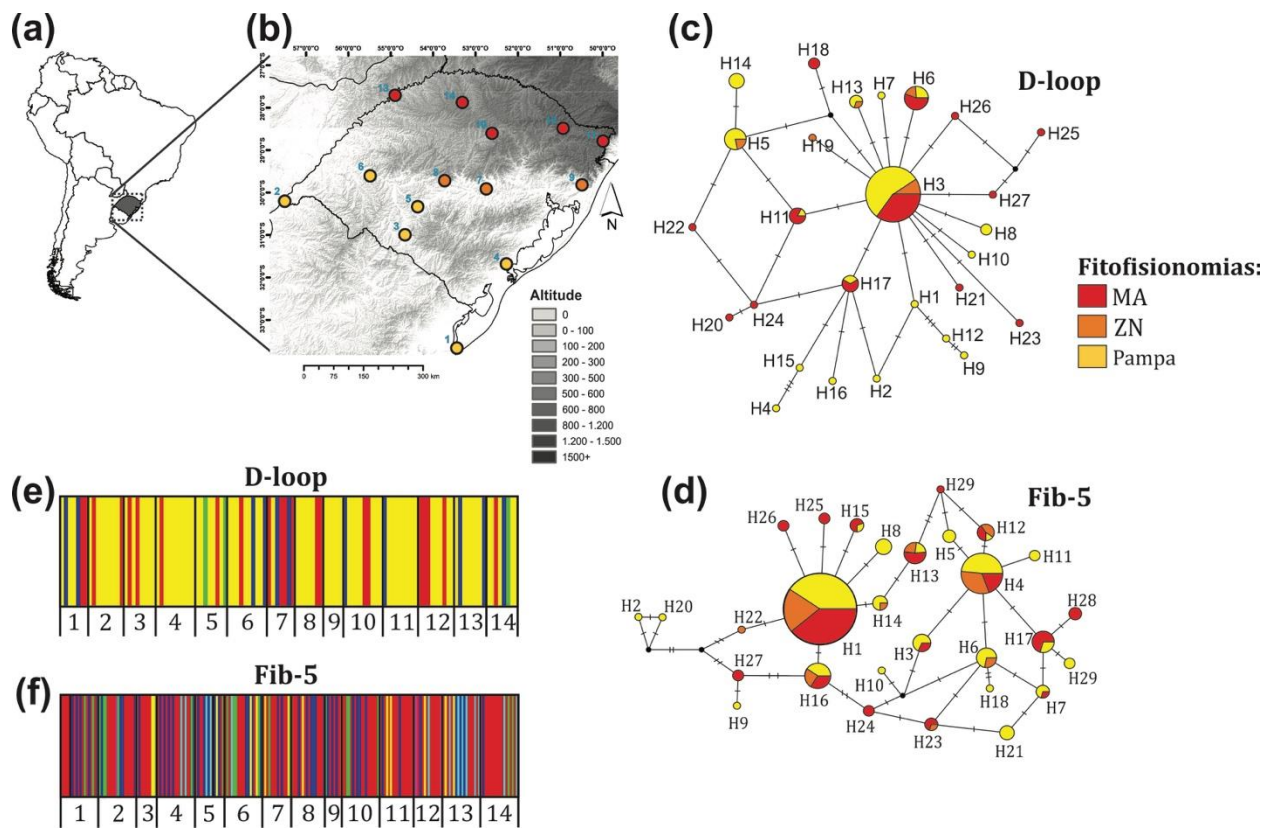


Figura 2. (a) Mapa da América do Sul, com destaque o estado do Rio Grande do Sul (Brasil). (b) Mapa topográfico com os pontos amostrais de *Zonotrichia capensis* deste estudo (detalhes ver Tabela S1). (c) Rede de haplótipos baseada em 597 pb de D-loop. (d) Rede de haplótipos baseada em 562 pb do Fib-5. As cores nas redes correspondem às cores no mapa, e denotam os 3 principais clusters propostos (ver Fig. 1; Tabela 3). (e,f) Análise Bayesiana de estrutura populacional (BAPS) de *Z. capensis*. Agrupamento baseado em 597 pb de D-loop e 562 pb de Fib-5. Cores indicam os melhores números de clusters para cada marcador. Números representam as localidades amostradas, de acordo com o mapa.

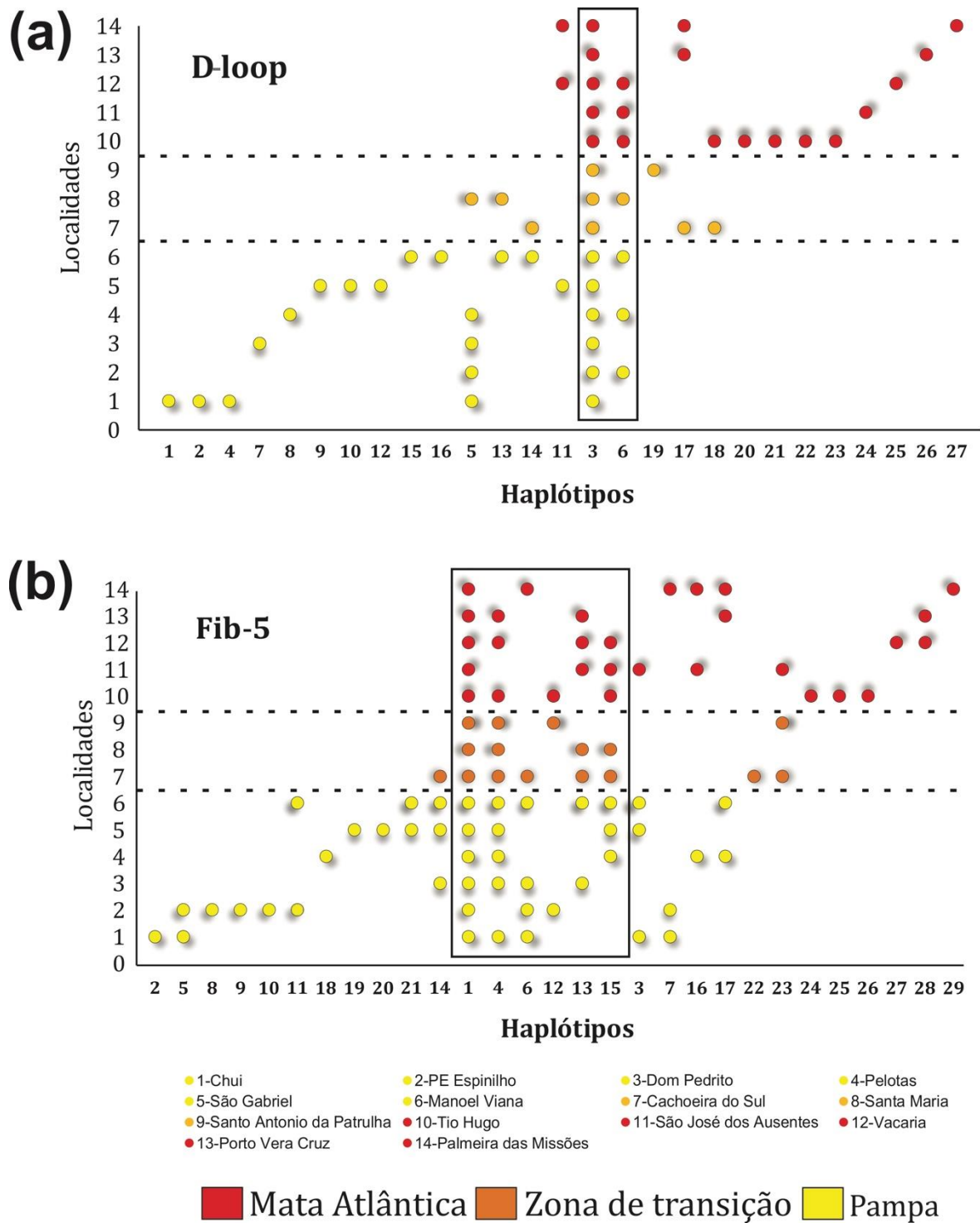


Figura 3. Diagrama de dispersão dos haplótipos vs. localidades. Na análise discriminante, no eixo X estão identificados os haplótipos encontrados nesse estudo; No eixo Y estão indicadas as localidades amostradas; As cores representam as partições geográficas propostas (Em amarelo: Pampa; Em alaranjado: Zona de transição; Em vermelho: Mata Atlântica). Em destaque aqueles haplótipos compartilhados entre pelo menos uma localidade de cada partição geográfica.

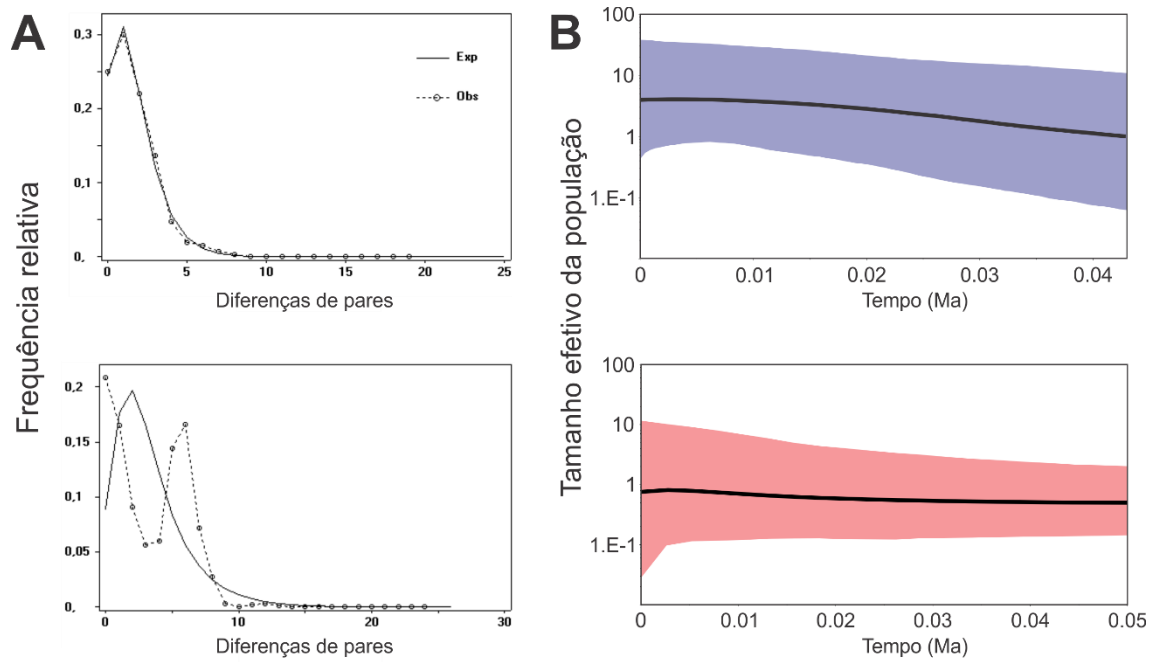


Figura 4. História demográfica da população do Rio Grande do Sul (Brasil) de *Z. capensis* com assinaturas para expansão populacional. **A**, distribuições de incompatibilidade de diferenças de pares de haplótipos de D-Loop e Fib-5 obtidos sob um modelo que permite expansão. **B**, *Bayesian Skyline Plot* para o conjuntos de dados D-Loop e Fib-5. Linhas em negrito indicam a mediana do tamanho efetivo da população ao longo do tempo e as linhas coloridas representam os 95% de maiores densidades posteriores sobre as estimativas medianas ao longo da história coalescente da população do Rio Grande do Sul.

TABELAS

Tabela 1. Variabilidade genética em *Z. capensis* e testes de neutralidade baseados em marcador mitocondrial (D-Loop) e nuclear (Fib-5) para o estado do Rio Grande do Sul (Brasil).

Grupo	N	S	N _H	Hd ± SD	π ± SD	k	F _s	D
D-loop								
Norte	43	11	13	0.7409 ± 0.0650	0.002207 ± 0.001558	1.317829	-8.35949*	-1.44156**
Sul	71	18	19	0.7706 ± 0.0492	0.002971 ± 0.001930	1.773843	-12.21911*	-1.56340
M. Atlântica	43	11	13	0.7409 ± 0.0650	0.002207 ± 0.001558	1.317829	-8.35949*	-1.44156
Zona de transição	19	8	8	0.8421 ± 0.0657	0.003115 ± 0.002085	1.859649	-2.59972**	-0.64146
Pampa	52	16	16	0.7157 ± 0.0650	0.002914 ± 0.001912	1.739819	-9.58515*	-1.56476**
Total	114	24	27	0.7505 ± 0.0414	0.00270 ± 0.00030	1.61202	-24.28957*	-1.87909*
Fib-5								
Norte	42	13	17	0.7476 ± 0.0237	0.005415 ± 0.003157	3.043029	-3.87572	0.47230
Sul	67	23	18	0.8127 ± 0.0284	0.006105 ± 0.003476	3.038923	-6.08471**	0.11811
M. Atlântica	42	13	17	0.7476 ± 0.0487	0.005415 ± 0.003157	3.043029	-3.87572	0.47230
Zona de transição	19	7	9	0.7468 ± 0.0573	0.005184 ± 0.003090	2.913229	-0.28357	2.09579
Pampa	48	18	21	0.8375 ± 0.0313	0.202546 ± 0.114636	3.645833	-5.22593	0.11563
Total	109	20	29	0.7919 ± 0.0256	0.00588 ± 0.00025	3.303386	-9.85197**	-0.04162

N: número de amostras; S: número de sítios variáveis; N_H: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π: diversidade nucleotídica; k: média da diferença entre os pares; D: teste de Tajima; F_s: teste de Fu. *P < 0.01 **P < 0.05. Os resultados são apresentados de acordo com os agrupamentos propostos: norte/sul e fitofisionomias (Mata Atlântica; Zona de transição; e Pampa) e para o conjunto total de dados (Geral) com n=114 para D-loop e n=109 para Fib-5.

Tabela 2. Detalhamento dos haplótipos encontrados para os marcadores D-loop e Fib-5

Localidade/Grupo*	N	D-loop			N	Fib-5		
		Haplótipo mais frequente (frequência%)	Haplótipos privados (frequência%)	Identificação de todos os haplótipos		Haplótipo mais frequente (frequência%)	Haplótipos privados (frequência%)	Identificação de todos os haplótipos
Chuí	07	H3 e H5 (28,5)	H1; H2 e H4 (14,3)	H1-H5	09	H1 (55,5)	H2 (5,5)	H1-H7
Parque Estadual do Espinilho	09	H3 (66,7)	-	H3; H5; H6	09	H8 (27,8)	H8 (27,8); H9 e H10 (5,5)	H1; H5-H12
Dom Pedrito	08	H3 (62,5)	H7 (12,5)	H3; H5; H7	05	H1 (60)	-	H1; H4; H6; H13; H14
Pelotas	10	H3 (60)	H8 (20)	H3; H5; H6; H8	09	H1 (44,5)	H18 (5,5)	H1; H4; H15-H18
São Gabriel	08	H3 (50)	H9; H10 e H12 (12,5)	H3; H9- H12	07	H4 (21,5)	H19 (14,3); H20 (7,2)	H1; H3; H4; H14- H16; H19-H21
Manoel Viana	10	H3 (40)	H15 e H16 (10)	H3; H6; H13-H16	09	H1 (27,8)	-	H1; H3; H4; H6; H11; H13; H14; H16; H17; H21
Cachoeira do Sul	07	H14 (42,9)	-	H3; H14; H17; H18	07	H1 (42,9)	H22 (7,1)	H1; H4; H6; H13; H14; H16; H22; H23
Santa Maria	07	H3; H5 e H6 (28,6)	-	H3; H5; H6; H12	08	H1 (43,8)	-	H1; H4; H13; H16
Santo Antônio da Patrulha	05	H3 (80)	H19 (20)	H3; H19	04	H1 (50)	-	H1; H4; H12; H23
Tio Hugo	10	H3 (40)	H20 - H23 (10)	H3; H6; H18; H20-H23	09	H1 (27,8)	H24; H25 e H26 (11)	H1; H4; H12; H16; H24-H26
São José dos Ausentes	09	H3 e H6 (44,5)	H24 (11)	H3; H6; H4	08	H1 (56);	-	H1; H3; H13; H15; H16; H23
Vacaria	09	H3 (44,5)	H25 (11)	H3; H6; H11; H25	07	H1 (57,1)	H27 (14,3)	H1; H4; H13; H16; H27; H28
Porto Vera Cruz	08	H3 (62,5)	H26 (12,5)	H3; H17; H26	09	H1 (38,9)	-	H1; H4; H13; H17; H28
Palmeira das Missões	07	H3 (57)	H27 (14,3)	H3; H11; H17; H27	09	H1 (66,7)	H29 (5,5)	H1; H6; H7; H15; H17; H29
Sul	71	H3 (47,9)	((H1; H2; H4; H7; H9; H10; H12; H15; H16; H19 (1,5)); H5(13,6); H8 (3); H13 (4,5); H14 (6)	H1-H19	67	H1 (38,8)	(H2; H9; H10; H18; H20; H22(0,8)); H5(2,4) H8(4); H11 e H19 (1,6); (H14 e H21 (3,1))	H1-H23
Norte	43	H3 (48,8)	H20-H27 (2,3)	H3; H6; H11; H17; H18; H19-H27	42	H1 (48,8)	(H24; H25 e H26 (1,6)); H27 (2,2); H28 (3,7); H29 (1)	H1; H3; H4; H6; H7; H12; H13; H15; H16; H17; H23-H29
Pampa	52	H3 (52)	((H1; H2; H4; H7; H9; H10; H12; H15; H16 (1,9)); H8 (3,8)	H1-H16	48	H1 (36,5)	(H2; H9; H10; H18 e H20 (1)); H5 (3,1); H8 (5,2); H11 (2); H19 (2); H21(4)	H1-H21
Zona de transição	19	H3 (36,8)	H19 (5,3)	H3; H5; H6; H13; H14; H17-H19	19	H1 (44,7)	H22 (2,6)	H1; H4; H6; H12; H13; H14; H16; H22; H23
Mata Atlântica	43	H3 (48,8)	H20-H27 (2,3)	H3; H6; H11; H17; H18; H20-H27	42	H1 (48,8)	(H24 – H27 (2,4)); H28 (3,6); H29 (1,2)	H1; H3; H4; H6; H7; H12; H13; H15; H16; H17; H23-H29
Total	114	H3 (48,3)		H1 – H27	109	H1 (42,7)		H1 – H29

N: número de amostras analisadas; *Grupos se referem aos agrupamentos testados nas AMOVAs. Os resultados são apresentados tanto individualmente para cada localidade amostrada, como para os agrupamentos propostos.

Tabela 3. Análise da variância molecular (AMOVA) estimada para as sequências de mtDNA (D-loop) e nDNA (Fib-5) de *Z. capensis*.

D-loop

Critério de agrupamento	Fonte de variação	df	% de variação	Φ - Estatística	P valor
1 – não estruturado	Entre as localidades	13	4.12	$\Phi_{ST} = 0.04117$	$P < 0.05$
	Dentro das localidades	100	95.88		
2 – Clusters (Norte e Sul)	Entre clusters	1	0.34	$\Phi_{CT} = 0.00336$	<i>N.S</i>
	Entre clusters dentro de ecorregiões	12	3.75	$\Phi_{SC} = 0.03758$	$P < 0.05$
	Dentro de clusters	100	95.92	$\Phi_{ST} = 0.04082$	$P < 0.05$
3 – Fitofisionomias (MA, ZN e Pampa)	Entre fitofisionomias	2	0.48	$\Phi_{CT} = 0.00476$	<i>N.S</i>
	Entre as populações dentro das fitofisionomias	11	3.79	$\Phi_{SC} = 0.03809$	$P < 0.05$
	Dentro das fitofisionomias	100	95.73	$\Phi_{ST} = 0.04267$	$P < 0.05$

Fib-5

Critério de agrupamento	Source of variation	df	% de variação	Φ - Estatística	P valor
1 – não estruturado	Entre as localidades	13	2.34	$\Phi_{ST} = 0.02337$	<i>N.S</i>
	Dentro das localidades	204	97.66		
2 – áreas biogeográficas (Norte e Sul)	Entre clusters	1	0.62	$\Phi_{CT} = 0.00622$	<i>N.S</i>
	Entre clusters dentro de ecorregiões	12	3.20	$\Phi_{SC} = 0.03221$	<i>N.S</i>
	Dentro de clusters	204	96.18	$\Phi_{ST} = 0.3823$	<i>N.S</i>
3 – Fitofisionomias (MA, ZN e Pampa)	Entre fitofisionomias	2	0.33	$\Phi_{CT} = 0.00330$	<i>N.S</i>
	Entre as populações dentro das fitofisionomias	11	2.11	$\Phi_{SC} = 0.02118$	<i>N.S</i>
	Dentro das fitofisionomias	204	97.56	$\Phi_{ST} = 0.02441$	<i>N.S</i>

Foram utilizados três modelos hierárquicos: 1) modelo de dois níveis incluindo apenas populações (localidades); e os modelo de três níveis: 2) entre os duas áreas biogeográficas (Norte/Mata Atlântica e Sul/Pampa), e 3) nas três fitofisionomias do estado do Rio Grande do Sul (Mata Atlântica, Zona de Transição e Pampa). Φ-estatísticas após 10.000 permutações para nível de probabilidade. ** $P < 0.05$; *N.S*: Não Significante.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela S1. Detalhamento das amostras de *Z. capensis* utilizadas nesse estudo.

Localidade	Coordenadas geográficas	Bioma	Identificação das amostras
Chuí (10)	33°39'S, 53°26'W	Pampa	^{1,2} CH1 ^S ; ^{1,2} CH2 ^S ; ^{1,2} CH3 ^S ; ² CH4 ^S ; ^{1,2} CH5 ^S ; ^{1,2} CH6 ^S ; ² CH7 ^S ; ^{1,2} CH8 ^M ; ² CH9 ^M ; ^{1,2} CH10 ^M
Parque Estadual do Espinilho ^a (10)	30°12'S, 57°30'W	Pampa	^{1,2} MCP4529 ^M ; ^{1,2} MCP4524 ^S ; ^{1,2} MCP442 ^M ; ^{1,2} MCP4787 ^S ; ² MCP4467 ^M ; ^{1,2} MCP4494 ^M ; ^{1,2} MCP4434 ^M ; ² MCP4543 ^M ; ^{1,2} MCP4431 ^M ; ^{1,2} MCP4517 ^M
Dom Pedrito ^b (8)	30°59'S, 54°39'W	Pampa	^{1,2} DP78 ^M ; ^{1,2} DP79 ^M ; ^{1,2} DP135 ^M ; ^{1,2} DP136 ^M ; ^{1,2} DP137 ^M ; ^{1,2} DP149 ^M ; ^{1,2} DP150 ^M ; ^{1,2} DP151 ^M
Pelotas (10)	31°40'S, 52°16'W	Pampa	^{1,2} PE1 ^S ; ^{1,2} PE2 ^S ; ^{1,2} PE3 ^S ; ^{1,2} PE4 ^S ; ^{1,2} PE5 ^S ; ^{1,2} PE6 ^M ; ^{1,2} PE7 ^M ; ¹ PE8 ^M ; ^{1,2} PE9 ^M ; ^{1,2} PE10 ^M
São Gabriel ^b (10)	30°20'S, 54°21'W	Pampa	¹ SG142 ^M ; ^{1,2} SG145 ^M ; ² SG147 ^M ; ¹ SG150 ^S ; ² SG157 ^S ; ² SG158 ^S ; ¹ SG159 ^S ; ^{1,2} SG161 ^S ; ¹ SG162 ^S ; ^{1,2} SG166 ^S ; ^{1,2} SG174 ^S
Manoel Viana (10)	29°36'S, 55°29'W	Pampa	^{1,2} MV1 ^M ; ^{1,2} MV2 ^M ; ^{1,2} MV3 ^M ; ^{1,2} MV4 ^S ; ^{1,2} MV5 ^S ; ^{1,2} MV6 ^S ; ^{1,2} MV7 ^S ; ^{1,2} MV8 ^S ; ^{1,2} MV9 ^S ; ^{1,2} MV10 ^S
Cachoeira do Sul (10)	29°54'S, 52°44'W	Zona de transição	¹ CS1 ^S ; ^{1,2} CS2 ^S ; ^{1,2} CS3 ^S ; ² CS4 ^S ; ¹ CS5 ^S ; ^{1,2} CS6 ^M ; ^{1,2} CS7 ^M ; ² CS8 ^M ; ² CS9 ^M ; ^{1,2} CS10 ^M
Santa Maria (10)	29°43'S, 53°43'W	Zona de transição	^{1,2} SM1 ^M ; ^{1,2} SM2 ^M ; ^{1,2} SM3 ^M ; ^{1,2} SM4 ^M ; ^{1,2} SM5 ^S ; ^{1,2} SM6 ^S ; ^{1,2} SM7 ^S ; ² SM8 ^S ; ² SM9 ^S ; ² SM10 ^S
Santo Antônio da Patrulha (6)	29°48'S, 50°29'W	Zona de transição	^{1,2} SA1 ^M ; ^{1,2} SA2 ^S ; ^{1,2} SA3 ^S ; ^{1,2} SA4 ^S ; ² SA5 ^M ; ^{1,2} SA6 ^M
Tio Hugo (10)	28°36'S, 52°36'W	Mata Atlântica	^{1,2} TH1 ^M ; ^{1,2} TH2 ^M ; ^{1,2} TH3 ^M ; ^{1,2} TH4 ^M ; ^{1,2} TH5 ^M ; ^{1,2} TH ^S ; ^{1,2} TH7 ^S ; ^{1,2} TH8 ^S ; ^{1,2} TH9 ^S ; ^{1,2} TH10 ^S
São José dos Ausentes (10)	28°47'S, 49°59'W	Mata Atlântica	^{1,2} SJ1 ^S ; ² SJ2 ^M ; ^{1,2} SJ3 ^M ; ^{1,2} SJ4 ^M ; ^{1,2} SJ5 ^M ; ^{1,2} SJ6 ^S ; ^{1,2} SJ7 ^S ; ^{1,2} SJ8 ^S ; ^{1,2} SJ9 ^S ; ^{1,2} SJ10 ^S
Vacaria (10)	28°28'S, 50°55'W	Mata Atlântica	¹ VA1 ^S ; ^{1,2} VA2 ^S ; ^{1,2} VA3 ^S ; ² VA4 ^S ; ^{1,2} VA5 ^S ; ^{1,2} VA6 ^S ; ^{1,2} VA7 ^S ; ^{1,2} VA8 ^S ; ^{1,2} VA9 ^S ; ^{1,2} VA10 ^S
Porto Vera Cruz (10)	27°42'S, 54°53'W	Mata Atlântica	^{1,2} PV1 ^S ; ^{1,2} PV2 ^S ; ¹ PV3 ^S ; ^{1,2} PV4 ^S ; ^{1,2} PV5 ^S ; ² PV6 ^S ; ^{1,2} PV7 ^S ; ^{1,2} PV8 ^S ; ² PV9 ^S ; ^{1,2} PV10 ^S
Palmeira das Missões (10)	27°52'S, 53°18'W	Mata Atlântica	^{1,2} PM1 ^M ; ² PM2 ^M ; ^{1,2} PM3 ^M ; ^{1,2} PM4 ^M ; ^{1,2} PM5 ^M ; ² PM6 ^S ; ² PM7 ^S ; ^{1,2} PM8 ^S ; ^{1,2} PM9 ^S ; ^{1,2} PM10 ^S

^a amostras cedidas pelo Museu de Ciências Naturais da PUC; ^b amostras cedidas pelo Laboratório de

Diversidade Genética Animal da Universidade Federal do Pampa Campus São Gabriel. O n amostral para cada localidade é informado pelos números entre parênteses. Genes amplificados: ¹: D-loop: fragmento do DNA mitocondrial; ²: Fib-5: Intron 5 do gene do β-fibrinogênio. Tipos de tecidos usados: ^S: sangue; ^M: músculo.

Tabela S2. Variabilidade genética de *Z. capensis* baseados em marcador mitocondrial (D-Loop) e nuclear (Fib-5) para cada localidade do estado do Rio Grande do Sul (Brasil).

D-Loop

População	n	s	N _H	Hd± SD	π± SD	k± SD	Fs Fu (P)	D de Tajima (P)
Chuí	7	8	5	0.9048 ± 0.1033	0.005105 ± 0.003455	3.047619 ± 1.800527	-0.673039 (0.26400)	-0.35022 (0.38900)
PE Espininho	9	3	3	0.5556 ± 0.1653	0.001675 ± 0.001405	1.000000 ± 0.739434	0.35118 (0.50000)	-0.35929 (-0.35929)
Dom Pedrito	8	3	3	0.6071 ± 0.1640	0.001855 ± 0.001535	1.107143 ± 0.804239	0.39014 (0.50400)	-0.17740 (0.44100)
Pelotas	10	4	4	0.6444 ± 0.1518	0.001601 ± 0.001344	0.955556 ± 0.709621	-0.97122 (0.12700)	-1.24468 (0.13400)
São Gabriel	8	8	5	0.7857 ± 0.1508	0.004547 ± 0.003069	2.714286 ± 1.608173	-0.49545 (0.31600)	-0.58166 (0.30800)
Manoel Viana	10	8	6	0.8444 ± 0.1029	0.003201 ± 0.002246	1.911111 ± 1.185537	-1.95329 (0.05700)	-1.39868 (0.09000)
Cachoeira do Sul	7	5	4	0.8095 ± 0.1298	0.004148 ± 0.002908	2.476190 ± 1.515724	0.28084 (0.52700)	1.05681 (0.85100)
Santa Maria	7	4	4	0.8571 ± 0.1023	0.002872 ± 0.002171	1.714286 ± 1.131278	-0.42812 (0.28400)	0.23902 (0.64000)
Santo Antonio da Patrulha	5	1	2	0.4000 ± 0.2373	0.000670 ± 0.000852	0.400000 ± 0.435050	0.09021 (0.29100)	-0.81650 (0.27300)
Tio Hugo	10	9	7	0.8667 ± 0.1072	0.003797 ± 0.002572	2.266667 ± 1.357497	-2.87486 (0.01300)	-1.25898 (0.11900)
São José dos Ausentes	9	3	3	0.6667 ± 0.1048	0.001675 ± 0.001405	1.000000 ± 0.739434	0.35118 (0.53200)	-0.35929 (0.39200)
Vacaria	9	5	4	0.7500 ± 0.1121	0.002326 ± 0.001782	1.388889 ± 0.938004	-0.36600 (0.29700)	-1.03796 (0.18400)
Porto Vera Cruz	8	2	3	0.6071 ± 0.1640	0.001137 ± 0.001096	0.678571 ± 0.574217	-0.47760 (0.12000)	-0.44794 (0.27300)
Palmeira das Missões	7	3	4	0.7143 ± 0.1809	0.001436 ± 0.001309	0.857143 ± 0.681989	-1.79778 (0.01700)	-1.35841 (0.07600)

Fib-5

Chuí	18	13	7	0.6863 ± 0.1123	0.006501 ± 0.003860	3.653595 ± 1.939805	0.34367 (0.60400)	-0.12432 (0.49200)
PE Espininho	18	12	9	0.8824 ± 0.0513	0.006908 ± 0.004066	3.882353 ± 2.043618	-1.21804 (0.26700)	0.41654 (0.70300)
Dom Pedrito	10	6	5	0.6667 ± 0.1633	0.004112 ± 0.002775	2.311111 ± 1.378890	-0.27358 (0.37100)	0.37099 (0.65300)
Pelotas	18	9	6	0.7451 ± 0.0790	0.006315 ± 0.003765	3.549020 ± 1.892296	1.18086 (0.73000)	1.26272 (0.88900)
São Gabriel	14	14	8	0.9231 ± 0.0438	0.008134 ± 0.004772	4.571429 ± 2.389266	-0.68098 (0.37700)	0.15556 (0.60200)
Manoel Viana	18	8	10	0.9020 ± 0.0497	0.006327 ± 0.003771	3.555556 ± 1.895266	-2.50369 (0.09800)	1.83746 (0.96800)
Cachoeira do Sul	14	7	8	0.8242 ± 0.0977	0.005006 ± 0.003153	2.813187 ± 1.578636	-2.14289 (0.09200)	1.02597 (0.86600)
Santa Maria	16	6	4	0.6917 ± 0.0736	0.005486 ± 0.003369	3.083333 ± 1.690523	2.75400 (0.90000)	2.41386 (0.99600)
Santo Antonio da Patrulha	8	6	4	0.7500 ± 0.1391	0.005719 ± 0.003755	3.214286 ± 1.852361	1.15319 (0.72600)	1.81343 (0.98500)
Tio Hugo	18	8	8	0.8889 ± 0.0465	0.005210 ± 0.003202	2.928105 ± 1.609365	-1.21134 (0.25600)	0.89988 (0.81700)
São José dos Ausentes	16	7	6	0.6833 ± 0.1200	0.003277 ± 0.002222	1.841667 ± 1.114854	-0.91259 (0.23500)	-0.44746 (0.37800)
Vacaria	14	10	6	0.6813 ± 0.1316	0.005025 ± 0.003163	2.824176 ± 1.583740	-0.06312 (0.49500)	-0.39667 (0.39300)
Porto Vera Cruz	18	8	5	0.7908 ± 0.0631	0.006769 ± 0.003996	3.803922 ± 2.008041	2.49964 (0.88500)	2.20858 (0.99300)
Palmeira das Missões	18	8	6	0.5621 ± 0.1342	0.004815 ± 0.003000	2.705882 ± 1.507653	0.37765 (0.61200)	0.56782 (0.72800)

N: número de amostras; S: número de sítios variáveis; N_H: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π: diversidade nucleotídica; k: média da diferença entre os pares; D: teste de Tajima; F_S: teste de Fu.

CAPÍTULO QUATRO

Conclusão Geral



Neste estudo foi caracterizada geneticamente a população de *Zonotrichia capensis* presente no estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizadas amostras de 138 indivíduos de 14 localidades diferentes, abrangendo as diferentes fitofisionomias do estado. Para as análises citogenéticas utilizamos amostras de três espécimes e para as análises moleculares utilizamos 124 indivíduos para o marcador nuclear e 114 para o mitocondrial.

Para responder ao objetivo de entender a organização cromossômica e identificar os rearranjos intracromossômicos em *Z. capensis*, foram realizadas análises citogenéticas em três indivíduos, capturados em São Gabriel-RS, utilizando técnicas de citogenética molecular, FISH e pintura cromossômica comparativa. Em síntese, através dessas análises constatamos a conservação da sintenia ancestral do cariótipo da espécie e descrevemos pela primeira vez uma inversão responsável presença do segmento correspondente ao LAL18 no braço curto do cromossomo 2 (ZCA2) do tico-tico.

Através da utilização das sondas de *Gallus gallus* (GGA) foi demonstrada a conservação da maioria dos macrocromossomos quando comparado ao cariótipo de *Gallus gallus*, tido como ancestral entre as Aves, e que o cromossomo GGA1 apresenta-se fissionado e corresponde a dois pares distintos (ZCA2 e ZCA5) nessa espécie, assim como em todas as espécies da ordem Passeriformes estudadas até o momento.

Com a aplicação das sondas de *Leucopternis albicollis* (LAL) foi confirmada a conservação do estado ancestral da maioria dos macrocromossomos e a fissão do cromossomo 1. As sondas de LAL também permitiram a identificação de inversões paracêntricas e pericêntricas no cromossomo ZCA2. Essas inversões foram encontradas em outros Passeriformes, porém em *Z. capensis* esses segmentos estão em posição diferente, possivelmente devido a uma inversão extra. Também foram identificadas inversões no cromossomo 3. Até o momento apenas os representantes do gênero *Zonotrichia* possuem

inversões descritas nesse cromossomo, o que pode indicar uma ancestralidade comum desse rearranjo cromossômico. Ainda, foi demonstrado, através de hibridização com as sondas ribossomais 18S, que os genes ribossomais estão presentes em apenas um par de microcromossomos, o que corresponde a uma característica ancestral das Aves.

No segundo artigo proposto, foram exploradas questões populacionais com os objetivos de avaliar os padrões de diversidade genética do tico-tico; e de verificar a influência do mosaico de habitats formados pelas diferentes fitofisionomias presentes no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) sobre os padrões demográficos da espécie.

As 114 amostras sequenciadas para o gene mitocondrial, D-loop, renderam sequências de 597 pares de base e demonstraram a presença de 27 haplótipos com 24 sítios polimórficos. Já as 124 amostras amplificadas para o gene nuclear, Fib-5, produziram fragmentos de 562 pares de base. Após a reconstrução haplotípica, restaram 109 amostras (218 cromossomos amostrados) que formaram 29 diferentes haplótipos com 20 sítios polimórficos. As redes de haplótipos derivadas do conjunto de dados para ambos os marcadores demonstram que os haplótipos, com maior frequência, H3 do mtDNA e H1 do nDNA estão compartilhados por todas as 14 localidades amostradas. Além desses os haplótipos H6, do gene D-loop e H4 e H16 de Fib-5, foram frequentes e estão presentes nas diferentes fitofisionomias amostradas. Embora alguns haplótipos exclusivos, em baixa frequência, tenham sido obtidos para os grupos propostos (Pampa e Mata Atlântica) a variabilidade genética da espécie encontra-se distribuída de modo homogêneo na região estudada.

As AMOVAs realizadas, independente dos grupos testados, indicam que a maior parte da variação genética observada está dentro das localidades. As análises de BAPS apesar de indicarem um k igual a quatro (mtDNA) e sete (nDNA) não encontraram

coerência geográfica entre as populações propostas. Essas análises corroboram os dados apresentados na rede haplótipos, portanto as três análises utilizadas para testar estruturação genética apresentaram dados concordantes para a ausência de estruturação da variabilidade genéticas da população estudada.

As análises de estruturação genética foram corroboradas pelos testes de neutralidade, obtidos através das estatísticas D de Tajima e F_s de Fu, que apresentaram valores negativos e significativos. Esses valores negativos e significativos indicam que a espécie passou por processos de expansão populacional recente.

As análises Bayesiana *Skyline Plot* (BSP) para os marcadores genéticos mitocondrial e nuclear, foram concordantes com os testes de neutralidade e indicaram que *Z. capensis* experimentou eventos de expansão demográfica há 50-40 mil anos, seguidos de um período de estabilidade populacional iniciado há menos dez mil anos. Essas datas de expansão populacional se alinham com o período de maior extensão dos campos, devido as condições climáticas vigentes durante o Quaternário. E o início da estabilização populacional é condizente com o início das mudanças climáticas e vegetacionais ocorridas ao final do Último Máximo Glacial.

Atualmente as formações campestres do estado do Rio Grande do Sul estão distribuídas de maneira descontínua, com extensas áreas abertas ao sul e recortes formados com a Floresta de Araucária ao norte. Embora estudos genéticos indiquem que algumas populações de *Z. capensis* apresentam diferenciações genéticas em decorrência dos diferentes habitats que ocupam, a população aqui estudada apresenta uma distribuição homogênea de sua variabilidade genética. A ausência de estruturação genética observada pode ser reflexo da recente expansão populacional da espécie e da existência de fluxo gênico entre as populações possibilitada pelas conexões existentes entre as diferentes

formações campestres do Rio Grande do Sul. Estudos em áreas onde as dinâmicas de expansão e retração dos campos foram mais acentuadas podem promover um melhor entendimento sobre a dinâmica populacional desse carismático passeriforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab'Saber, A. N. (1970). Províncias geológicas e domínios morfoclimáticos no Brasil. *Geomorfologia* 20:1–26.
- Ali, J. R., e J. C. Aitchison (2014). Exploring the combined role of eustasy and oceanic island thermal subsidence in shaping biodiversity on the Galápagos. *Journal of Biogeography* 41:1227–1241.
- Ames, P. L. (1971). The morphology of the synrix in passerine birds. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History* 37:1–194.
- Andrade, B. O., C. L. Bonilha, G. E. Overbeck, E. Vélez-Martin, R. G. Rolim, S. A. L. Bordignon, A. A. Schneider, C. Vogel Ely, D. B. Lucas, É. N. Garcia, E. D. dos Santos, et al. (2019). Classification of South Brazilian grasslands: Implications for conservation. *Applied Vegetation Science* 22:168–184.
- Anjos, L. dos (2006). Bird Species Sensitivity in a Fragmented Landscape of the Atlantic Forest in Southern Brazil 1. *Biotropica* 38:229–234.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Axelsson, E., N. G. C. Smith, H. Sundström, S. Berlin, e H. Ellegren (2004). Male-Biased Mutation Rate and Divergence in Autosomal, Z-Linked and W-Linked Introns of Chicken and Turkey. *Molecular Biology and Evolution* 21:1538–1547.
- Barker, F. K., K. J. Burns, J. Klicka, S. M. Lanyon, e I. J. Lovette (2013). Going to extremes: Contrasting rates of diversification in a recent radiation of new world passerine birds. *Systematic Biology* 62:298–320.
- Batalha-Filho, H., G. S. Cabanne, e C. Y. Miyaki (2012). Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65:892–902.
- Bauermann, S. (2009). Dinâmicas vegetacionais, climáticas e do fogo com base em palinologia e análise multivariada no Quaternário tardio do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Paleontologia* 11:87–96.
- Behling, H. (1997). Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil). *Review of Palaeobotany and Palynology* 97:109–121.
- Behling, H. (2002). South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: A synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177:19–27.
- Behling, H., e R. R. B. Negrelle (2001). Tropical Rain Forest and Climate Dynamics of the Atlantic Lowland, Southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research* 56:383–389.
- Behling, H., V. D. P. Pillar, L. Orlóci, e S. G. Bauermann (2004). Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do Sul core in southern Brazil. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 203:277–297.
- Belloq, M. I., J. Filloy, G. A. Zurita, e M. F. Apellaniz (2011). Responses in the abundance of generalist birds to environmental gradients: The rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*) in the southern Neotropics. *Écoscience* 18:354–362.
- BirdLife International (2019). Species factsheet: *Zonotrichia capensis*. [Online.] Available at <http://www.birdlife.org>.

- Brown, A. H. D. (1978). Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics* 52:145–157.
- Cabanne, G. S., L. Calderón, N. Trujillo-Arias, P. Flores, R. O. Pessoa, F. D’Horta, e C. Y. Miyaki (2016). Pleistocene climate changes affected species ranges and evolutionary processes in the Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*:856–872.
- Cabanne, G. S., F. R. Santos, e C. Y. Miyaki (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91:73–84.
- Cabanne, G. S., E. H. R. Sari, D. Meyer, F. R. Santos, e C. Y. Miyaki (2013). Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish Schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). *Journal of Ornithology* 154:371–384.
- Cabrera, A. L., e A. Willink (1980). *Biogeografia da America Latina*. 2º edição. OEA, Washington.
- Campagna, L., C. Kopuchian, P. L. Tubaro, e S. C. Lougheed (2014). Secondary contact followed by gene flow between divergent mitochondrial lineages of a widespread Neotropical songbird (*Zonotrichia capensis*). *Biological Journal of the Linnean Society* 111:863–868.
- Campagna, L., L. F. Silveira, P. L. Tubaro, e S. C. Lougheed (2013). Identifying the sister species to the rapid capuchino seedeater radiation (Passeriformes: *Sporophila*). *The Auk* 130:645–655.
- Carnaval, A. C., e C. Moritz (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* 35:1187–1201.
- Carvalho, M. W. P., e B. Erdtmann (1987). Ocorrência de polimorfismo cromossômico em tico-tico (*Zonotrichia capensis*) nos estados do Espírito Santo e Rio Grande do Sul. *Ciência e Cultura* 39:782.
- Catchpole, C. K., e P. J. B. Slater (2008). *Bird song: biological themes and variations*. 2º edição. Cambridge University Press, New York.
- Chapman, F. M. (1940). The post-glacial history of *Zonotrichia capensis*. *Bulletin American Museum of Natural History* LXXVII:381–438.
- Chevion, Z. A., e R. T. Brumfield (2009). Migration-selection balance and local adaptation of mitochondrial haplotypes in Rufous-Collared Sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an elevational gradient. *Evolution* 63:1593–1605.
- Chevion, Z. A., A. Whitehead, e R. T. Brumfield (2008). Transcriptomic variation and plasticity in rufous-collared sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an altitudinal gradient. *Molecular Ecology* 17:4556–4569.
- Christoff, A. U., V. Fagundes, I. J. Sbalqueiro, M. S. Mattevi, e Y. Yonenaga-Yassuda (2000). Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from Southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 81:838–851.
- Coltrinari, L. (1993). Global Quaternary changes in South America. *Global and Planetary Change* 7:11–23.
- Corander, J., e P. Marttinen (2006). Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology* 15:2833–2843.
- Corander, J., P. Marttinen, J. Sirén, e J. Tang (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9:539.

- D’Horta, F. M., G. S. Cabanne, D. Meyer, e C. Y. Miyaki (2011). The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular Ecology* 20:1923–1935.
- Dantas, M. E., A. C. Viero, e D. R. A. da Silva (2010). A Origem das Paisagens. In *Geodiversidade do estado do Rio Grande do Sul: Programa Geologia do Brasil. Levantamento da Geodiversidade* (A. C. Viero e D. R. A. da Silva, Organizadores). CPRM – Serviço Geológico do Brasil, Porto Alegre, p. 35–50.
- Delgado, I. de M., J. D. de Souza, L. C. da Silva, N. C. da Silveira Filho, R. A. dos Santos, A. J. Pedreira, J. T. Guimarães, L. A. de A. Angelim, A. M. Vasconcelo, I. P. Gomes, J. V. de L. Filho, et al. (2003). Geotectônica do Escudo Atlântico. In *Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil* (L. A. Bizzi, C. Schobbenhaus, R. M. Vidotti e J. H. Gonçalves, Organizadores). CPRM, Brasília, p. 227–334.
- Diehl, E., E. Diehl-Fleig, E. Z. De Albuquerque, e L. K. Junqueira (2014). Richness of Termites and Ants in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Sociobiology* 61.
- Doyle, J. J., e J. L. Doyle (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9:11–15.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32:1792–7.
- Eikenaar, C., F. Bonier, P. R. Martin, e I. T. Moore (2013). High rates of extra-pair paternity in two equatorial populations of rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Journal of Avian Biology* 44:600–602.
- van Els, P., H. V. Norambuena, e R. S. Etienne (2019). From pampa to puna: Biogeography and diversification of a group of Neotropical obligate grassland birds (*Anthus: Motacillidae*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*:1–12.
- Ericson, P. G. P., L. Christidis, A. Cooper, M. Irestedt, J. Jackson, U. S. Johansson, e J. A. Norman (2002). A Gondwanan origin of passerine birds supported by DNA sequences of the endemic New Zealand wrens. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 269:235–241.
- Ericson, P. G. P., M. Irestedt, e U. S. Johansson (2003). Evolution, biogeography, and patterns of diversification in passerine birds. *Journal of Avian Biology* 34:3–15.
- Eriksen, A. (2011). Song learning in oscine songbirds: Tutor choice, timing, and the relationship with sexual imprinting.
- Excoffier, L., e H. E. L. Lischer (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564–567.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, e J. M. Quattro (1992). Analyses of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- Felappi, J. F., R. C. Vieira, N. J. R. Fagundes, e L. V. Verrastro (2015). So far away, yet so close: Strong genetic structure in *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), a species with restricted geographic distribution in the Brazilian and Uruguayan Pampas. *PLoS ONE* 10:1–19.
- Fotheringham, J. R. (1995). Differences in singing behavior between rufous-collared sparrows in Costa Rica and Northwestern Argentina. *The Condor* 97:821–826.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.

- Futuyma, D. J. (1997). *Biologia Evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Gill, F. (2006). *Ornithology*. 3^o edição. W.H. Freeman & Company, New York.
- Gill, F., e D. Donsker (2019). IOC World Bird List (v9.1).
- Griffin, D. K., L. B. . Robertson, H. G. Tempest, e B. M. Skinner (2007). The evolution of the avian genome as revealed by comparative molecular cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research* 117:64–77.
- Gunski, R. J., G. S. Cabanne, M. A. Ledesma, e A. D. V. Garnero (2000). Análisis cariotípico de siete especies de Tiránidos (*Tyrannidae*). *Hornero* 15:103–109.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science* 165:131–137.
- Handford, P. (1981). Vegetational correlates of variation in the song of *Zonotrichia capensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 8:203–206.
- Handford, P. (1983). Continental patterns of morphological variation in a south american sparrow. *Evolution* 37:920–930.
- Handford, P. (1985). Morphological relationships among subspecies of the Rufous-collared Sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Canadian Journal of Zoology* 63:2383–2388.
- Handford, P., e S. C. Loughheed (1991). Variation in duration and frequency characters in the Song of the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*, with respect to habitat, trill dialects and body size. *The Condor* 93:644–658.
- Heled, J., e A. J. Drummond (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology* 8:289.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–913.
- IBAMA (1994). Manual de anilhamento de aves silvestres.
- IBGE, I. B. de G. e E. (2004). Mapa da vegetação do Brasil e mapa de biomas do Brasil. [Online.] Available at <http://www.ibge.gov.br>.
- John, A. L. de W., G. Mäder, J. N. Fregonezi, e L. B. Freitas (2019). Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 42:108–119.
- Kretschmer, R., M. Ferguson-Smith, e E. de Oliveira (2018a). Karyotype Evolution in Birds: From Conventional Staining to Chromosome Painting. *Genes* 9:181.
- Kretschmer, R., R. J. Gunski, A. D. V. Garnero, I. de O. Furo, P. C. M. O’Brien, M. A. Ferguson-Smith, e E. H. C. de Oliveira (2014). Molecular Cytogenetic Characterization of Multiple Intrachromosomal Rearrangements in Two Representatives of the Genus *Turdus* (Turdidae, Passeriformes). *PLoS ONE* 9:e103338.
- Kretschmer, R., V. L. C. de Lima, M. S. de Souza, A. L. Costa, P. C. M. O’Brien, M. A. Ferguson-Smith, E. H. C. de Oliveira, R. J. Gunski, e A. D. V. Garnero (2018b). Multidirectional chromosome painting in *Synallaxis frontalis* (Passeriformes, Furnariidae) reveals high chromosomal reorganization, involving fissions and inversions. *Comparative Cytogenetics* 12:97–110.
- Kretschmer, R., E. H. C. de Oliveira, M. S. Dos Santos, I. de O. Furo, P. C. M. O’Brien, M. A. Ferguson-Smith, A. del V. Garnero, e R. J. Gunski (2015). Chromosome mapping of the large elaenia (*Elaenia spectabilis*): evidence for a cytogenetic signature for passeriform birds? *Biological Journal of the Linnean Society* 115:391–398.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, e K. Tamura (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549.

- Librado, P., e J. Rozas (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451–1452.
- Lijtmaer, D. A., e P. L. Tubaro (2007). A reversed pattern of association between song dialects and habitat in the rufous-collared sparrow. *The Condor* 109:658.
- Lima-Rezende, C. A., A. V. Rocha, A. F. Couto, É. de Souza Martins, V. Vasconcelos, e R. Caparroz (2019). Late Pleistocene climatic changes promoted demographic expansion and population reconnection of a Neotropical savanna-adapted bird, *Neothraupis fasciata* (Aves: Thraupidae). *PLoS ONE* 14:1–19.
- Lougheed, S. C., L. Campagna, J. A. Dávila, P. L. Tubaro, D. A. Lijtmaer, e P. Handford (2013). Continental phylogeography of an ecologically and morphologically diverse Neotropical songbird, *Zonotrichia capensis*. *BMC evolutionary biology* 13:58.
- Lougheed, S. C., e P. Handford (1992). Vocal dialects and the structure of geographic variation in morphological and allozymic characters in the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Evolution* 46:1443–1456.
- Lougheed, S. C., P. Handford, e A. J. Baker (1993). Mitochondrial DNA hyperdiversity and vocal dialects in a subspecies transition of the rufous-collared sparrow. *The Condor* 95:889–895.
- Lowe, A., S. Harris, e P. Ashton (2004). *Ecological Genetics: design, analysis and application*. Blackwell Publishing, Malden.
- de Lucca, E. J. (1974). Cariótipos de 14 espécies de aves das ordens Cuculiformes, Galliformes, Passeriformes e Tinamiformes. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas* 7:253–263.
- de Lucca, E. J., e G. T. Rocha (1985). Chromosomal polymorphism in *Zonotrichia capensis* (Passeriformes: Aves). *Revista Brasileira de Genética* VIII:71–78.
- Mäder, G., J. N. Fregonezi, A. P. Lorenz-Lemke, S. L. Bonatto, e L. B. Freitas (2013). Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evolutionary Biology* 13:178.
- Magnoli, D., G. Oliveira, e R. Menegotto (2001). *Cenário Gaúcho*. Moderna, São Paulo.
- Marini, M. Á., e S. J. Hackett (2002). A multifaceted approach to the characterization of an intergeneric hybrid manakin (Pipridae) from Brazil. *The Auk* 119:1114–1120.
- McDonald, D. B. (2003). Microsatellite DNA evidence for gene flow in neotropical lek-mating long-tailed manakins. *The Condor* 105:580.
- Milá, B., J. E. McCormack, G. Castañeda, R. K. Wayne, e T. B. Smith (2007). Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:2653–2660.
- Moreira, I. (2003). *O espaço rio-grandense*. 5ª edição. Ática, São Paulo.
- Moreno, E. M. S., L. B. De Freitas, P. R. Speranza, e V. G. Solís Neffa (2018). Impact of Pleistocene geoclimatic events on the genetic structure in mid-latitude South American plants: Insights from the phylogeography of *Turnera sidoides* complex (Passifloraceae, Turneroideae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 188:377–390.
- Morrone, J. J. (2010). América do Sul e geografia da vida: comparação de algumas propostas de regionalização. In *Biogeografia da América do Sul: padrões e processos* (C. J. B. Carvalho e E. A. B. Almeida, Organizadores). Editora Rocca Limitada, São Paulo, p. 14–40.
- Morton, M. L. (2002). *The mountain White-crowned Sparrow: migration and reproduction*

- at high altitude. *Studies in Avian Biology* 24.
- Nanda, I., P. Benisch, D. Fetting, T. Haaf, e M. Schmid (2011). Synteny conservation of chicken macrochromosomes 1–10 in different avian lineages revealed by cross-species chromosome painting. *Cytogenetic and Genome Research* 132:165–181.
- Nanda, I., K. Schlegelmilch, T. Haaf, M. Schartl, e M. Schmid (2008). Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination. *Cytogenetic and Genome Research* 122:150–156.
- Nishida-Umehara, C., Y. Tsuda, J. Ishijima, J. Ando, A. Fujiwara, Y. Matsuda, e D. K. Griffin (2007). The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. *Chromosome Research* 15:721–734.
- Norambuena, H. V., P. Van Els, C. P. Muñoz-Ramírez, e P. F. Victoriano (2018). First steps towards assessing the evolutionary history and phylogeography of a widely distributed Neotropical grassland bird (Motacillidae: *Anthus correndera*) . *PeerJ* 6:e5886.
- Nottebohm, F. (1969). The song of the chingolo, *Zonotrichia capensis*, in Argentina: description and evaluation of a system of dialects. *The Condor* 71:299–315.
- Nottebohm, F. (1975). Continental patterns of song variability in *Zonotrichia capensis*: some possible ecological correlates. *The American Naturalist* 109:605–624.
- Nottebohm, F., e R. K. Selander (1972). Vocal dialects and gene frequencies in the chingolo sparrow (*Zonotrichia capensis*). *The Condor* 74:137–143.
- Overbeck, G. E., S. C. Müller, A. Fidelis, J. Pfadenhauer, V. D. Pillar, C. C. Blanco, I. I. Boldrini, R. Both, e E. D. Forneck (2007). Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9:101–116.
- Peçanha, W. T., S. L. Althoff, D. Galiano, F. M. Quintela, R. Maestri, G. L. Gonçalves, e T. R. O. Freitas (2017). Pleistocene climatic oscillations in Neotropical open areas: Refuge isolation in the rodent *Oxymycterus nasutus* endemic to grasslands. *PLOS ONE* 12:e0187329.
- Posada, D., e K. A. Crandall (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818.
- Pough, F. H., C. M. Janis, e J. B. Heiser (2008). *A vida dos vertebrados*. 4^o edição. Atheneu Editora São Paulo Ltda, São Paulo.
- Quintela, F. M., F. Bertuol, E. M. González, P. Cordeiro-Estrela, T. R. O. De Freitas, e G. L. Gonçalves (2017). A new species of *Deltamys* Thomas, 1917 (Rodentia: Cricetidae) endemic to the southern Brazilian Araucaria Forest and notes on the expanded phylogeographic scenario of *D. kempfi*. *Zootaxa* 4294:71.
- Quintela, F. M., G. L. Gonçalves, S. L. Althoff, I. J. Sbalqueiro, L. F. B. Oliveira, e T. R. O. De Freitas (2014). A new species of swamp rat of the genus *Scapteromys* Waterhouse, 1837 (Rodentia: Sigmodontinae) endemic to Araucaria angustifolia Forest in Southern Brazil. *Zootaxa* 3811:207.
- Raikow, R. J., e A. H. Bledsoe (2000). Phylogeny and evolution of the passerine birds. 50:487–499.
- Rambaut, A., A. J. Drummond, D. Xie, G. Baele, e M. A. Suchard (2018). Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. [Online.] Available at <https://academic.oup.com/sysbio/article/67/5/901/4989127>.
- Rambo, B. (1942). *A fisionomia do Rio Grande do Sul*. Oficina Gráfica da Imprensa Oficial, Porto Alegre.

- Ricklefs, R. E. (2002). Splendid isolation: historical ecology of the South American passerine fauna. *Journal of Avian Biology* 33:207–211.
- Ridgely, R. S., e G. Tudor (1989). *The birds of South America. Volume I, The Oscine Passerines*. University of Texas Press, Austin.
- Ridgway, R. (1898). Descriptions of supposed new genera, species, and subspecies of american birds. I. Fringillidæ. *The Auk* 15:223–230.
- Rising, J. & Jaramillo, A. (2019). Rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona.
- Rocha, G. T., E. J. De Lucca, e E. B. De Souza (1990). Chromosome polymorphism due to pericentric inversion in *Zonotrichia capensis* (Emberizidae-Passeriformes-Aves). *Genetica* 80:201–207.
- Santos, E. (1979). *Pássaros do Brasil*. 4º edição. Editora Itatiaia Limitada, Belo Horizonte.
- dos Santos, M. da S., R. Kretschmer, C. Frankl-Vilches, A. Bakker, M. Gahr, P. C. M. O'Brien, M. A. Ferguson-Smith, e E. H. C. de Oliveira (2017). Comparative cytogenetics between two important songbird, models: the zebra finch and the canary. *PLOS ONE* 12:e0170997.
- dos Santos, M. da S., R. Kretschmer, F. A. O. Silva, M. A. Ledesma, P. C. M. O'Brien, M. A. Ferguson-Smith, A. Del Valle Garneró, E. H. C. de Oliveira, e R. J. Gunski (2015). Intrachromosomal rearrangements in two representatives of the genus *Saltator* (Thraupidae, Passeriformes) and the occurrence of heteromorphic Z chromosomes. *Genetica* 143:535–543.
- Shetty, S., D. K. Griffin, e J. A. Graves (1999). Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 7:289–95.
- Sibley, C. G., e J. E. Ahlquist (1990). *Phylogeny and classification of birds*. Yale University Press, New Haven.
- Sibley, C. G., e B. L. Monroe (1990). *Distribution and taxonomy of birds of the world*. 1º edição. Yale University Press, New Haven.
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. 2º edição. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- Souza, E. B., e E. J. de Lucca (1988). Polimorfismo cromossômico em *Zonotrichia capensis*: frequência dos citótipos. *Ciência e Cultura* 40:764.
- Souza, E. B., e E. J. de Lucca (1991). Populational study of chromosome polymorphism in *Zonotrichia capensis* (Emberizidae - Passeriformes - Aves). *Revista Brasileira de Genética* 14:359–372.
- Stephens, M., N. J. Smith, e P. Donnelly (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American journal of human genetics* 68:978–89.
- Suttie, J. M., S. G. Reynolds, e C. Batello (2005). *Grasslands of the world*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123:597–601.
- Templeton, A. R., E. Routman, e C. A. Phillips (1995). Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140:767–82.
- Thomas, J. W., M. Cáceres, J. J. Lowman, C. B. Morehouse, M. E. Short, E. L. Baldwin, D. L. Maney, e C. L. Martin (2008). The chromosomal polymorphism linked to variation in social behavior in the white-throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*) is

- a complex rearrangement and suppressor of recombination. *Genetics* 179:1455–1468.
- Tobias, J. A., J. Brawn, e R. Brumfield (2012). The importance of suboscine birds as study systems in ecology and evolution. *Revista Brasileira de Ornitologia* 23:259–272.
- Toews, D. P. L., e A. Brelsford (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21:3907–3930.
- Tomazelli, L. J., S. . Dillenburg, e J. A. Villwock (2000). Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul Coastal Plain, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* 30:474–476.
- Turchetto-Zolet, A. C., F. Pinheiro, F. Salgueiro, e C. Palma-Silva (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular ecology* 22:1193–213.
- Vieira, E. F. (1984). Rio Grande do Sul: geografia física e vegetação. SAGRA-Editora e Distribuidora, Porto Alegre.
- Vieira, E. F. (2012). Geografia do Rio Grande do Sul: territorialidade - ambientes naturais - sociedade. Edigal, Porto Alegre.
- Viero, A. C., e D. R. A. da Silva (2010). Geodiversidade do estado do Rio Grande do Sul. CPRM, Porto Alegre.
- Villwock, J. A., e L. J. Tomazelli (1995). Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas do CECO_IG_UFRGS*:1–45.
- Werneck, F. P., C. Nogueira, G. R. Colli, J. W. Sites, e G. C. Costa (2012). Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography* 39:1695–1706.
- Zink, R. M. (1982). Patterns of genic and morphologic variation among sparrows in the genera *Zonotrichia*, *Melospiza*, *Junco*, and *Passerella*. *The Auk* 99:632–649.
- Zink, R. M., e R. C. Blackwell (1996). Patterns of allozyme, mitochondrial DNA, and morphometric variation in four sparrow genera. *The Auk* 113:59–67.
- Zink, R. M., D. L. Dittmann, e W. L. Rootes (1991). Mitochondrial DNA variation and the phylogeny of *Zonotrichia*. *The Auk* 108:578–584.

APÊNDICES

Apêndice1. Licença de coleta SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49950-4	Data da Emissão: 08/02/2018 09:30	Data para Revalidação*: 10/03/2019
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Thales Renato Ochotorena de Freitas	CPF: 238.934.600-63
Título do Projeto: Arquitetura Genética Geográfica do Tico-tico (<i>Zonotrichia capensis</i>) em populações do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição : UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de tecido biológico para preparações cromossômicas e extração de DNA	09/2015	09/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.bama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/icgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1. O intervalo máximo de tempo para a vistoria de cada rede não pode ultrapassar 20 minutos, se a área for ensolarada. Caso a área seja bem sombreada, os intervalos devem ser de 45 minutos, no máximo, de modo a evitar a morte dos animais; 2. As aves capturadas que não sejam da espécie de interesse do presente estudo (<i>Zonotrichia capensis</i>) devem ser soltas imediatamente a cada evento de vistoria das redes; 3. A coleta autorizada de cinco indivíduos por espécie de <i>Zonotrichia capensis</i> deve se restringir a esse quantitativo, no máximo, por localidade prevista na autorização para toda a duração deste estudo.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Caroline Charão Sartor	Integrante	020.592.800-52	3078250838 SSP-RS	Brasileira
2	Sandra Eloisa Bulau	Coordenador/Integrante	044.747.009-45	82970517 SSPPR-PR	Brasileira
3	RAFAEL KRETSCHMER	Integrante	025.731.550-05	1098852311 SJS-RS	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99577529



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49950-4	Data da Emissão: 08/02/2018 09:30	Data para Revalidação*: 10/03/2019
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Thales Renato Ochotorena de Freitas	CPF: 238.934.600-63
Título do Projeto: Arquitetura Genética Geográfica do Tico-tico (<i>Zonotrichia capensis</i>) em populações do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição : UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PELOTAS	RS	município	Fora de UC Federal
2	SAO JOSE DOS AUSENTES	RS	município	Fora de UC Federal
3	VACARIA	RS	município	Fora de UC Federal
4	CACHOEIRA DO SUL	RS	município	Fora de UC Federal
5	SANTA MARIA	RS	município	Fora de UC Federal
6	PALMEIRA DAS MISSOES	RS	município	Fora de UC Federal
7	DOM PEDRITO	RS	município	Fora de UC Federal
8	SAO GABRIEL	RS	município	Fora de UC Federal
9	MANOEL VIANA	RS	município	Fora de UC Federal
10	CHUI	RS	todo município	Fora de UC Federal
11	TIO HUGO	RS	Município	Fora de UC Federal
12	SANTO ANTONIO DA PATRULHA	RS	Município	Fora de UC Federal
13	PORTO VERA CRUZ	RS	Município	Fora de UC Federal
14	PORTO ALEGRE	RS	Município	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Zonotrichia capensis</i>
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Zonotrichia capensis</i>
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Zonotrichia capensis</i> (*Qtde: 5)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Penas, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Ovos
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina, Bioacústica

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Além do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99577529



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49950-4	Data da Emissão: 08/02/2018 09:30	Data para Revalidação*: 10/03/2019
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Thales Renato Ochotorena de Freitas	CPF: 238.934.600-63
Título do Projeto: Arquitetura Genética Geográfica do Tico-tico (<i>Zonotrichia capensis</i>) em populações do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição : UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 99577529



Página 3/3

Apêndice 2. Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29745

Título: Arquitetura Genética Geográfica do Tico-tico (*Zonotrichia capensis*) em populações do Rio Grande do Sul

Vigência: 20/10/2015 à 05/01/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

THALES RENATO OCHOTORENA DE FREITAS - coordenador desde 20/10/2015

SANDRA ELOISA BÚLAU - Aluno de Doutorado desde 20/10/2015

Caroline Charão Sartor - Aluno de Mestrado desde 20/10/2015

Rafael Kretschmer - Aluno de Doutorado desde 20/10/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 160 pássaros provenientes de 16 localidades (Pelotas, Camaquã, São José dos Ausentes, Vacaria, Bagé, Cachoeira do Sul, Santa Maria, Santa Rosa, São Gabriel, Cruz Alta, Manoel Viana, Palmeira das Missões, Dom Pedrito, Cacequi, Santiago e Santo Ângelo), com a finalidade de (captura, coleta, marcação), possuindo autorização da SISBIO Nº 49950-1, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 0 de Março de 2016

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética

Apêndice 3. Figuras 1 e 2. Imagens obtidas durante as atividades de campo desenvolvidas para a realização dessa tese



Figura 1. Indivíduo adulto de tico-tico coletado em atividade de campo realizada em São José dos Ausentes - RS, no Bioma Mata Atlântica.

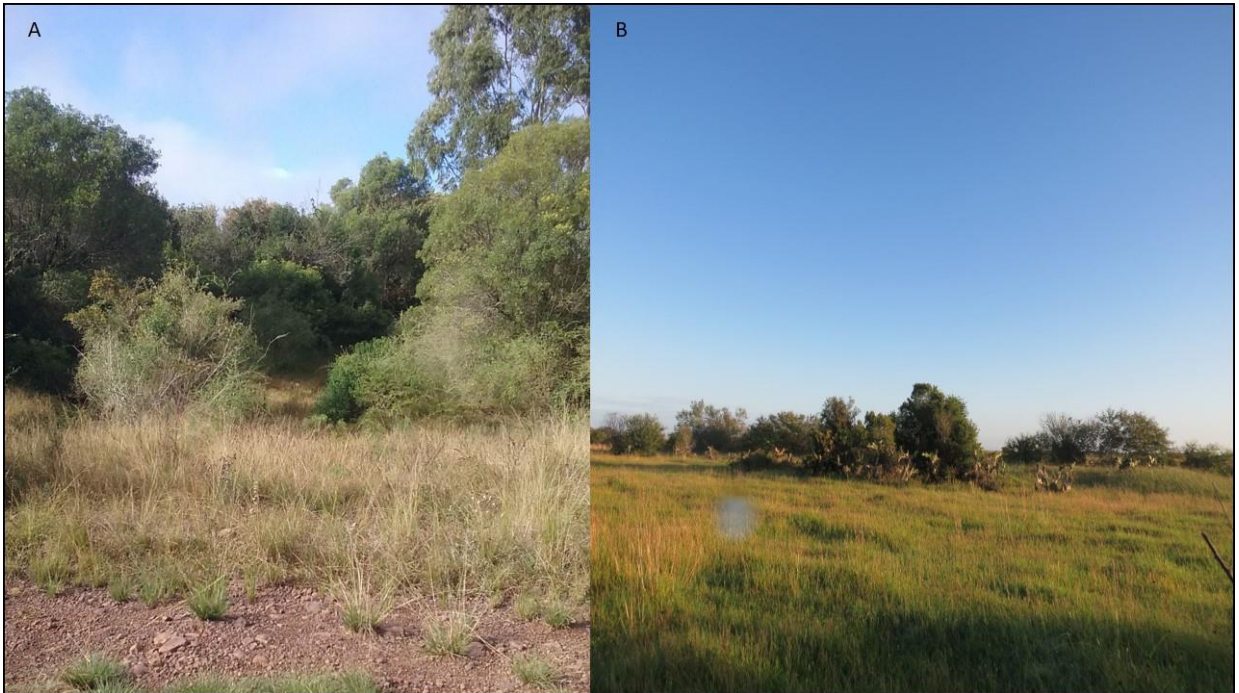


Figura 2. Formações campestres do Bioma Pampa. A: área às margens do Rio Ibicuí em Manoel Viana - RS.
B: área de campo na região de Chuí – RS