Tese - M/51

Pedro Miguel Guimarães Cardia Lopes

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA E ANTROPOLOGIA
44690
Nº: 5374

A DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA PEGA-AZUL (*Cyanopica cyanus* Pallas, 1776).

UMA ANÁLISE MOLECULAR DE UM PROBLEMA BIOGEOGRÁFICO.

Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto, 2002

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
D000054270

"(...) até que alguém nos prove o contrário, vamos continuar a acreditar no sonho dos marinheiros portugueses que trouxeram as pegas azuis nos barcos que conseguiram voltar ao cais (...)"

Correia, Clara Pinto, 1998.
A Pega Azul.
98 Mares, EXPO 98, Lisboa.

"Parece precizo advertir ao Leitor, que neste livro há de encontrar vários erros, & descuidos do prelo; calamidade a que está sogeita qualquer obra (...). Não se apontam estas erratas; porque os eruditos, & curiozos facilmente as poderão emmendar onde as toparem; & os ignorantes, & descuidados, ainda que lhas appontem não as emendarão"

Abreu, Luís Brás de, 1726.
Portugal Médico ou Monarchia Médico-Lusitana: História, Prática, Simbólica, Ethica e Política. Fundada e comprehendida no dillatado ambito dos Mundos Creados: Macrocosmo e Microcosmo. Repartida e Demarcada em Tres Amplyssimos Reynos: Animal, Vegetal e Mineral.
Lisboa, Joam Antunes Mercador de Livros.

Agradecimentos

Aos docentes responsáveis pelo Mestrado em Ecologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, agradeço a oportunidade concedida e o apoio no desenvolvimento do presente trabalho.

Agradeço igualmente à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) a atribuição de uma bolsa de mestrado, que me permitiu desenvolver este trabalho.

Ao meu orientador, Professor Doutor Nuno Ferrand de Almeida quero agradecer as sugestões, críticas e discussões que permitiram melhorar significativamente o conteúdo deste trabalho. Não posso ainda deixar de agradecer o apoio e entusiasmo que deu a este projecto, principalmente nos tempo mais difíceis.

Gostaria de agradecer ao Doutor Shou-Hsien Li a forma simpática e interessada com que me recebeu e orientou no *American Museum of Natural History*, assim como a cedência dos primers e sequências de Pega-azul asiáticas.

Ao Doutor Carlos De La Cruz quero agradecer a cedência de amostras, a partilha de conhecimentos sobre a biologia da *Cyanopica*, a ajuda na obtenção das armadilhas e todas as discussões que tivemos sobre a origem da Pega-azul e sobre o seu comportamento.

Ao Filipe Canário, o meu agradecimento pela realização da amostragem na população de Barrancos, pela cedência de bibliografia, pelos conselhos e discussões sobre a história e biologia da Pega-azul.

Gostaria de agradecer ao Pedro Esteves a ajuda e paciência com que correspondeu aos meus pedidos e dúvidas relativos à análise dos dados.

Ao Steve Weiss, o meu agradecimento por me ter elucidado numerosas dúvidas relativas à análise dos dados e por me ter "encaminhado" para alguns dos programas informáticos usados neste trabalho.

À Madalena Branco quero agradecer a disponibilidade e a ajuda que me deu na análise dos dados.

Ao Dr. António Monteiro (Parque Natural do Douro Internacional) e aos Drs. Juan M. Blanco e Ursula Höfle (Centro de Estudio de Rapaces Ibéricas, Junta de Castilla La Mancha) gostaria de agradecer a cedência de amostras de Pega-azul.

Ao Paulo Monteiro (*Quercus*, Rosmaninhal), agradeço o apoio logístico fornecido durante a recolha de amostras na Beira Baixa.

À Drª Luzia Sousa, do Museu de História Natural da Faculdade de Ciências do Porto, agradeço a disponibilidade e apoio na recolha de amostras de aves das colecções do museu.

Ao Sr. Zé Preto, pastor dos Alares, e à sua esposa, quero agradecer as preciosas indicações sobre a localização de ninhos da Pega-azul assim como a forma simpática com que me receberam.

À Dona Gracinda, de Idanha-a-Velha, agradeço o tempo que gastou enquanto indicava, árvore a árvore, a localização dos ninhos de "Gaio-azul", assim como a elucidação quanto às qualidades gastronómicas desta espécie.

Ao Dr. Paulo Cortez (Instituto Politécnico de Bragança) agradeço as informações sobre a localização de ninhos de Pega-azul na região de Pinhel.

Ao Frederico Lobo e à Bárbara Fráguas quero agradecer a enorme ajuda durante os trabalhos de campo de recolha de amostras.

A todos os meus amigos e aos colegas do laboratório, de Vairão, do UGAC, do CECA, do ICETA e do AGFC, quero deixar o meu agradecimento por toda a camaradagem e pelo excelente ambiente de trabalho, que muito contribuiu para o sucesso deste trabalho.

Gostava de agradecer de uma forma muito especial à minha família, pela forma excepcional como sempre me apoiou ao longo destes últimos anos.

À Xana, por toda a amizade, apoio e compreensão.

Índice

Resumo 6

Abstract 7

1. Introdução 8

1.1 A Filogeografia 9
1.2 Os Estudos Filogeográficos 9
1.3 História da Classe Aves e Origem dos Passeriformes 10
1.4 Marcadores Usados para Avaliar a Variabilidade Genética 12
1.5 Os Corvídeos 13
1.6 A Pega-Azul 14
1.7 O Problema da Distribuição Mundial da Pega-Azul 24
1.8 Objectivos 29

2. Material e Métodos 31

2.1 Critérios de Selecção dos Locais de Amostragem 32
2.2 Origem das Amostras 32
2.3 Métodos de Captura e Marcação de Pegas-Azuis 34
2.4 Recolha e Conservação de Amostras 35
2.5 Análise Molecular 36
2.5.1 Extracção do DNA 36
2.5.2 Amplificação do mtDNA 36
2.5.3 Purificação dos Produtos de Amplificação 40
2.5.4 Sequenciação dos Fragmentos de mtDNA 40
2.6 Análise dos Dados 40

3. Resultados 44

3.1 Sequenciação do mtDNA das Amostras de Pega-Azul 45
3.2 Filogenia da Família *Corvidae* 46
3.3 A Origem das Populações Ibéricas de Pega-Azul 52
3.4 A Filogeografia da Pega-Azul na Península Ibérica 55

4. Discussão 58

4.1 Sequenciação do mtDNA de Pega-Azul 59
4.2 Filogenia da Família *Corvidae* 60
4.2.1 O Género *Corvus* 61
4.2.2 Os Gaios Endémicos do Continente Americano 62
4.2.3 A. Posição da Pega-Azul no Seio da Família *Corvidae* 64
4.3 Origem das Populações Ibéricas de Pega-Azul 67
4.4 Filogeografia da Pega-Azul na Península Ibérica 70
4.5 O Estatuto Taxonómico da Pega-Azul Ibérica 73
4.6 Relevância para a Conservação da Pega-Azul na Península Ibérica 74

5. Considerações Finais 76

6. Referências Bibliográficas 79

7. Anexos 91

Resumo

Pega-azul é um corvídeo de pequeno porte que existe em duas áreas extremamente distantes entre si - o Extremo Oriente e a Península Ibérica. Esta invulgar distribuição geográfica foi interpretada segundo duas hipóteses distintas: *i)* como o resultado de uma introdução da espécie na Península Ibérica após a descoberta da rota marítima para o Oriente; ou *ii)* como o resultado de um processo de vicariância devido às alterações climáticas associadas às glaciações, que terão extinguido a espécie na área entre a Península Ibérica e o Extremo Oriente. Para testar estas hipóteses e, simultaneamente, determinar qual a posição do género *Cyanopica* no seio da família *Corvidae*, foi sequenciada uma região do DNA mitocondrial, compreendendo parte dos genes do citocromo b e ND5, em amostras pertencentes a três subespécies asiáticas (*C. c. pallescens*, *C. c. kansuensis*, *C. c. swinhoei*) e à subespécie ibérica (*C. c. cooki*).

De acordo com os resultados obtidos, a Pega-azul pertence, com elevado suporte estatístico, a um grupo que inclui igualmente os géneros *Pica* e *Ptilostomus* e que tem uma posição basal relativamente a um grupo que inclui os géneros *Corvus* e *Garrulus*. A análise dos dados permitiu concluir que a Pega-azul é uma espécie autóctone na Península Ibérica e não uma espécie introduzida. As divergência existente entre as aves asiáticas e ibéricas é de, aproximadamente, 6%. Se se assumir a existência de um relógio molecular e uma taxa de calibração de 2% de divergência entre sequências por milhão de anos então, a separação entre estas duas formas deverá ter-se iniciado no final do Plioceno. Esta diferenciação é consistente com a atribuição do estatuto de espécie à Pega-azul Ibérica: *Cyanopica cooki*. Durante as glaciações do Plistoceno, a Pega-azul Ibérica deverá ter sobrevivido em apenas um, ou dois, refúgios localizados no Sul da Península Ibérica. A melhoria das condições ambientais que se seguiu ao final das glaciações, deverá ter permitido a expansão para Norte da Pega-azul Ibérica.

Abstract

The Azure-winged Magpie (*Cyanopica cyanus*) is a small corvid, which occurs in two widely separated areas in eastern Asia and Iberian Peninsula. This unusual geographical pattern has been interpreted in two different ways: *i)* as the result of an introduction of birds in the Iberian peninsula, after the establishment of the first commercial sea routes between Europe and far eastern Asia; or, *ii)* resulting from the extinction of the species in the areas in between Iberia and East Asia due to a vicariant event connected with climatic changes (glaciations). To test these hypotheses, and to evaluate the phylogenetic placement of the genus *Cyanopica* within the *Corvidae* family, samples from birds belonging to three Asian subspecies (*C. c. pallescens*, *C. c. kansuensis*, *C. c. swinhoei*) and the Iberian subspecies (*C. c. cooki*) were sequenced for a region including the mitochondrial DNA genes cytochrome b and ND5.

According to the results obtained, the Azure-winged Magpie forms a well supported clade with the genera *Pica* and *Ptilostomus*, which is basal to a clade formed by the genera *Corvus* and *Garrulus*. These results support the hypothesis of a native origin for Iberian Azure-winged Magpies. Assuming the existence of a molecular clock and a calibration rate of two per cent sequence divergence per a million years, the observed differences between Asian and Iberian birds (approximately 6%), places the divergence of these two forms in the late Pliocene and is consistent with the attribution of a specific status to the Iberian Azure-winged Magpie: *Cyanopica cooki*. In the Iberian Peninsula, the Azure-winged Magpie has probably survived in one, possibly two refugia located in the Southern limit of the Peninsula. The change in the environmental conditions that followed the end of Pleistocene glaciations, enabled the Iberian Azure-winged Magpie to expand its range northwards.

1. Introdução

1.1 A Filogeografia

A filogeografia é uma disciplina que integra e sintetiza os conhecimentos provenientes de disciplinas que estudam os processos microevolutivos (como a etologia, a demografia, e a genética populacional) e macroevolutivos (como a paleontologia e a filogenia) num todo coerente (Avise, 2000). De acordo com Avise (1998, 2000), a filogeografia pode definir-se como a disciplina que estuda os princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens evolutivas, especialmente ao nível intraespecífico. Embora só em 1987 surja o termo "filogeografia" (Avise *et al.*, 1987), desde o final da década de 70 que existem trabalhos que abordam o estudo da biodiversidade numa perspectiva filogeográfica. O constante acréscimo do número de trabalhos deste tipo publicados anualmente, permitiu iniciar uma nova fase no estudo desta disciplina - a filogeografia comparada - em que se comparam os padrões filogeográficos de vários organismos de uma comunidade ou de uma categoria taxonómica (Avise, 1998, 2000).

1.2 Os Estudos Filogeográficos na Europa

Durante os períodos glaciares do Quaternário, o avanço dos gelos e as consequentes transformações do meio forçaram muitas espécies a retrair a sua área de distribuição para latitudes mais próximas do equador. Na Europa, ao contrário dos restantes continentes do hemisfério Norte, este processo de "migração" para Sul era dificultado por um factor adicional: a posição do mar Mediterrâneo impedia efectivamente as espécies menos móveis de prosseguirem o movimento para Sul. Esta importante barreira geográfica impediu que muitas espécies retraíssem a sua distribuição para o continente Africano, fragmentando as suas populações pelas três penínsulas do Sul da Europa - penínsulas Balcânica, Itálica e Ibérica - durante os períodos de maior intensidade das glaciações. Estas zonas assumiram um papel de refúgios durante os episódios glaciais. Muitas das espécies que aí ficaram retidas acabaram por se extinguir, por não serem capazes de sobreviver às mudanças climáticas que também afectaram as zonas de refúgio. As espécies que conseguiram sobreviver às transformações dos ecossistemas evoluíram isoladamente de outras populações conspecíficas, retidas noutros locais. Durante os períodos interglaciais e no final das glaciações do Quaternário, a recolonização da Europa pelas comunidades animais e vegetais, fez-se a partir das populações que sobreviveram nas regiões

meridionais. No entanto, a distribuição da variabilidade genética em algumas espécies indica que as três penínsulas do Sul da Europa não tiveram a mesma importância como fonte dos organismos que recolonizaram a Europa. As colonizações iniciadas a partir da Península Ibérica ou dos Balcãs parecem ter sido mais relevantes do que as iniciadas na Península Itálica, para moldar a composição e estrutura das comunidades animais e vegetais que hoje ocupam a Europa, o que provavelmente se deverá à acção da barreira geográfica formada pelos Alpes (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1996, 1999, 2000; Blondel, 2001).

1.3 História da Classe Aves e Origem dos Passeriformes

A história evolutiva das Aves é particularmente mal conhecida, principalmente quando comparada com a dos Répteis e Mamíferos. A principal causa deste relativo desconhecimento reside na pobreza do seu registo fóssil. Devido aos constrangimentos impostos pela adaptação ao voo, o esqueleto da maioria dos grupos de Aves é bastante frágil, pelo que facilmente desaparece antes de se ter iniciado o processo de fossilização. Adicionalmente, este grupo de organismos não apresenta estruturas como os dentes dos Mamíferos, que são importantes fontes de informação paleontológica, na medida em que "sobrevivem" melhor do que os outros tipos de evidência fóssil (De Juana, 1992). Por este motivo, muito do conhecimento existente sobre a origem, evolução e diversificação das Aves provém de estudos moleculares que se baseiam no estabelecimento de comparações filogenéticas entre o ácido desoxirribonucleico (DNA) de espécies actualmente existentes e, inclusive, algumas "recentemente" extintas como as Moas (Ratites) da Nova Zelândia. Estes estudos permitem estabelecer uma ordenação do aparecimento dos diversos grupos ou espécies de Aves existentes e enquadrar cronologicamente estes acontecimentos, com o recurso a um relógio molecular devidamente calibrado (Hedges, 1994; Cooper, 1997; Cooper & Penny, 1997; Cooper *et al.*, 2001; Barker *et* al., 2002; Ericson *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 2002).

Segundo as evidências paleontológicas, a história das Aves remonta até ao Jurássico, há cerca de 150 milhões de anos (MA), quando um grupo ancestral deu origem a duas linhagens de Aves, as *Siaurinae* e as *Ornithurae*. A primeira linhagem deu origem a Aves como o *Archaeopteryx* e a um vasto grupo de espécies designadas como *Enantiornithines*. Todas as Aves

pertencentes a esta linhagem desapareceram juntamente com os Dinossauros e muitos outros *taxa*, na extinção em massa que assinala a transição do Cretáceo para o Terciário. A segunda linhagem, designada por *Ornithurae*, diferenciou-se durante o Cretáceo inferior e foi a precursora de todas as Aves modernas - as *Neornithes* (De Juana, 1992; Feduccia, 1995; Bernis, 1997; Blondel, 2001). As *Neornithes* sofreram uma grande diversificação no Paleoceno (há cerca de 65 MA), tendo surgido nesta altura a maior parte das ordens actuais. Até ao Mioceno inferior (há cerca de 25 MA), o clima na região Holárctica era do tipo subtropical e não tinha uma sazonalidade tão marcada. Nesta época, a avifauna do hemisfério Norte era dominada por numerosas famílias de Aves não-passeriformes - *Anhimidae*, *Sagitaridae*, *Megapodiidae*, *Psittacidae*, *Musophagidae*, *Steornithidae*, *Aegothelidae*, *Podargidae*, *Nyctibiidae*, *Coliidae*, *Trogonidae*, *Todidae*, *Momotidae*, *Phoeniculidae* e *Capitonidae* - que hoje subsistem apenas nas regiões tropicais. Estas famílias abandonaram as zonas de latitudes mais elevadas do hemisfério Norte, num processo gradual que começou no Oligoceno superior (há cerca de 30 MA), com o arrefecimento do clima mundial. Durante a transição entre o Oligoceno e o Mioceno assistiu-se ao estabelecimento da moderna avifauna Europeia, sobretudo devido ao aparecimento dos Passeriformes. Este grupo de Aves, que se terá originado no "protocontinente" Gondwana, expandiu-se para o hemisfério Norte a partir do Mioceno, tendo aí assumido um papel dominante na composição da avifauna, o qual mantêm até ao presente (Blondel, 2001; Irestedt *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2002; Ericson *et al.*, 2002).

As evidências moleculares quanto à origem das Aves modernas não são inteiramente congruentes com as evidências paleontológicas. Existem evidências (baseadas no estudo de genes nucleares) que sugerem que as Aves modernas iniciaram a sua diversificação ainda durante o Cretáceo e que um grande número destas linhagens sobreviveu à transição do Cretáceo para o Terciário (Cooper & Penny, 1997; Barker *et al.*, 2002; Ericson *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 2002). De acordo com estes dados, os Passeriformes terão surgido no Cretáceo e a divergência entre as suas duas subordens - Oscinos e Suboscinos - terá ocorrido há 78,7-62,5 MA, no final do Cretáceo (Barker *et al.*, 2002; Ericson *et al.*, 2002).

1.4 Marcadores Usados para Avaliar a Variabilidade Genética

Existe um grande número de técnicas moleculares que podem ser usadas com o intuito de determinar a variabilidade genética dos mais diversos grupos de organismos. A electroforese de proteínas é uma das técnicas utilizadas para este fim mas tem o inconveniente de apenas reflectir parte da variação total que existe no genoma. Este tipo de análise restringe-se às regiões genómicas que codificam directamente a síntese de proteínas e não detecta também as mutações silenciosas que ocorrem geralmente na terceira posição de um codão. O estudo directo das sequências de DNA permite detectar polimorfismos genéticos de uma forma global e directa e quantificar mais precisamente a divergência genética entre dois *taxa*. Com o advento da técnica de *polymerase chain reaction* (PCR), o estudo directo dos polimorfismos genéticos do DNA tornou-se mais fácil, rápido e barato, o que possibilitou a generalização deste tipo de estudos.

A análise do genoma mitocondrial (mtDNA) tem-se revelado muito útil no estabelecimento de relações evolutivas entre populações, espécies ou outros *taxa* superiores (Avise, 1986; Hillis *et al.*, 1991; Morin *et al.*, 1994; Moritz, 1996; Baker & Marshall, 1997; Houde *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Mindell *et al.*, 1997; Moore & DeFilippis, 1997; Quin, 1997). O estudo do genoma destes organelos subcelulares apresenta vantagens, pois é uma molécula relativamente pequena, fácil de obter e isolar com técnicas laboratoriais correntes e padronizadas. No entanto, não são estas as características que conferem à molécula de DNA mitocondrial a sua grande "popularidade" em estudos de genética evolutiva. As principais vantagens desta molécula residem:

i) no seu modo de transmissão uniparental (nos vertebrados, só o mtDNA das fêmeas é transmitido à geração seguinte);

ii) na ausência de recombinação; e

iii) na sua elevada taxa de mutação (Moritz *et al.*, 1987; Gray, 1989; Harrison, 1989; Wolstenholme, 1992; Quin, 1997; Avise, 2000).

O mtDNA de todos os vertebrados contém 22 ácidos ribonucleicos de transferência (tRNAs), 13 genes que codificam a síntese de proteínas, dois ácidos ribonucleicos ribossómicos (rRNAs 12S e 16S) e uma (ou duas) região de controlo. Os espaçadores intergénicos são pequenos (geralmente têm menos de 10 pares de bases) e os genes não apresentam intrões, o que confere ao genoma mitocondrial uma organização bastante compacta e eficiente (Quin, 1997).

1.5 Os Corvídeos

A família *Corvidae* tem uma distribuição cosmopolita, estando apenas ausente da Antárctida. Os membros desta família exibem uma apreciável diversidade morfológica e comportamental, sendo considerados como um dos grupos mais bem sucedidos de entre todos os Passeriformes. Estão presentes em diversos tipos de habitats, desde as florestas temperadas e tropicais até às regiões desérticas, estando apenas ausentes de ambas as regiões polares e da maioria das ilhas oceânicas. Tradicionalmente, considera-se que esta família é composta por 105 a 121 espécies, pertencentes a 24 ou 25 géneros (De Juana, 1992; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Tellería *et al.*, 1999). Este grupo de Aves deverá ter-se originado na região da Australo-Papuásia, a partir da qual se expandiram para Noroeste, tendo atingido o continente Euroasiático, onde prosseguiram a sua expansão geográfica e se diferenciaram num grande número de *taxa* (Helm-Bychowski & Cracraft, 1993; Cracraft & Feinstein, 2000; Barker *et al.*, 2002; Ericson *et al.*, 2002).

Até ao fim da década de 80, a taxonomia da família *Corvidae* era bastante consensual, existindo apenas algumas dúvidas quanto à categoria taxonómica em que algumas formas deveriam ser incluídas (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994). No entanto, a publicação dos trabalhos de Sybley & Ahlquist (1990) e Sibley & Monroe (1990) veio alterar profundamente a classificação tradicional, não só da família *Corvidae* mas também das Aves em geral. Estes autores realizaram um extenso trabalho baseado na técnica de hibridação de DNA que resultou numa proposta de reordenação profunda de toda a sistemática das Aves, com efeitos grandes ao nível da divisão ou junção de famílias anteriormente reconhecidas. Encarada a princípio com algumas reservas e fortes críticas (ver Bernis, 1997), os trabalhos subsequentes reafirmaram parte dos resultados destes investigadores sendo que, actualmente, é maior a

aceitação dos resultados de Sybley & Ahlquist (1990) e Sibley & Monroe (1990), embora os pontos de discordância ainda sejam muitos (De Juana, 1992; Madge & Burn, 1994; Bernis, 1997).

Segundo esta nova classificação, a família *Corvidae* foi muito expandida, passando agora a englobar um vasto grupo de quase 650 espécies de Passeriformes, que inclui espécies tão diversas como as aves-do-paraíso e os papa-figos (anteriormente pertencentes às famílias Paradiseidae e Oriolidae, respectivamente). Os corvídeos, segundo a classificação de Sibley & Ahlquist (1990) e Sibley & Monroe (1990), são considerados uma tribo - *Corvini* – que juntamente com as tribos *Paradisaeini*, *Artamini* e *Oriolini* compõem a subfamília *Corvinae*. Por não estar ainda bem estabelecida entre a comunidade ornitológica esta nova classificação, no presente trabalho será usada sempre a classificação tradicional, a não ser que tal esteja explicitamente referido no texto.

Os dados existentes, referentes à filogenia dos *Corvidae*, são parcelares, pois incluem apenas 16 dos 25 géneros de corvídeos actualmente reconhecidos. De acordo com dados provenientes do estudo do citocromo b (*cyt b*), os corvídeos (família *Corvidae*) formam um grupo monofilético com as aves-do-paraíso (família *Paradisaeidae*; Helm-Bychowski & Cracraft, 1993; Cibois & Pasquet, 1999). As gralhas do género *Pyrrhocorax* são um grupo basal dos corvídeos e não são directamente aparentadas com o género *Corvus* como alguns autores defendiam (Cibois & Pasquet, 1999). Os gaios do continente americano - géneros *Cyanocorax*, *Calocitta*, *Cyanocitta*, *Psilorhinus*, *Aphelocoma*, *Gymnorhinus* e *Cyanolyca* - constituem um grupo monofilético, não directamente aparentado com os gaios paleárcticos do género *Garrulus* ou os gaios Holárcticos do género *Perisoreus* (De Los Monteros & Cracraft, 1997; Cibois & Pasquet, 1999; Saunders & Edwards, 2000).

1.6 A Pega-azul

A Pega-azul *Cyanopica cyanus* (Pallas, 1776) é única espécie do género *Cyanopica*, pertencente à família *Corvidae*. Não são bem conhecidas as relações existentes entre esta espécie e os restantes corvídeos. Em 1850, Bonaparte (*in* Sacarrão, 1974) sustenta que o género

Cyanopica seria intermediário entre os géneros *Garrulus* e *Pica*. Em 1944, Amadon (*in* Sacarrão, 1974) sugere a existência de afinidades entre os géneros *Cyanopica*, *Pica* e *Cissa*. Segundo Madge & Burn (1994), a Pega-azul deverá ser uma espécie bastante antiga e, possivelmente, estará próxima do ancestral dos gaios do continente americano. Os trabalhos mais recentes que abordaram a filogenia dos *Corvidae* são omissos quanto à posição da Pega-azul nesse grupo, pelo que esta problemática permanece por resolver (De Los Monteros & Cracraft, 1997; Cibois & Pasquet, 1999; Omland *et al.*, 2000; Saunders & Edwards, 2000; Jenner *et al.*, 2001).

É um Corvídeo de pequeno tamanho, de formas semelhantes à Pega-rabuda (*Pica pica*) mas mais pequena, sendo os seus membros posteriores e o bico proporcionalmente mais pequenos. Esta espécie tem um comprimento de 31-35 cm, dos quais 16-20 cm se devem à cauda, uma envergadura de 38-40 cm e 62-82 g de peso. Em voo, apresenta uma silhueta muito característica, com asas curtas e largas e cauda muito comprida mas estreita (ver figura 1.1; Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Jonsson, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998; Mullarney *et al.*, 1999).

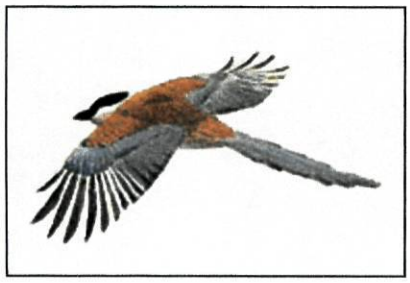


Figura 1.1. Pega-azul em voo. A ave representada na figura pertence à subespécie Ibérica *Cyanopica cyanus cooki*. Podem apreciar-se alguns dos aspectos característicos desta espécie: a longa cauda azul-celeste, as asas curtas e arredondadas com rémiges azuis-celeste, o dorso, uropígio e coberturas alares castanhos, o capuz preto na cabeça, e a garganta branca (adaptado de Snow & Perrins, 1998).

Embora ambos os sexos sejam idênticos no que respeita ao padrão de plumagem, existe dimorfismo sexual ao nível das medidas corporais e do peso. Em média, os machos são significativamente maiores do que as fêmeas em todos os parâmetros corporais, exceptuando o comprimento do bico (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Jonsson, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998; Mullarney *et al.*, 1999).

As aves adultas (da subespécie *C. c. cooki*) têm um capuz preto com um ligeiro brilho azulado, formado pela coroa, nuca e face. A cor branca presente na garganta cede gradualmente lugar a uma cor branco-sujo, levemente rosada, no peito, flancos, ventre e subcaudais. As partes

superiores, dorso e uropígio, são castanho-acinzentados. A cauda é azul celeste, com ligeiros tons violeta. As duas rectrizes centrais terminam numa barra branca, que não excede cinco milímetros de espessura, enquanto nas restantes rectrizes esta barra é vestigial ou está ausente. Nas asas, as rémiges e as grandes coberturas são azul celeste com tons violeta enquanto as restantes coberturas alares são da mesma cor que o dorso, embora ligeiramente matizadas de violeta. O bico e os membros posteriores são pretos e a íris é castanha escura ou preta-acastanhada (ver figura 1.2; Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Jonsson, 1994; Madge & Burn, 1994; Svensson, 1996; Snow & Perrins, 1998; Mullarney *et al.*, 1999).

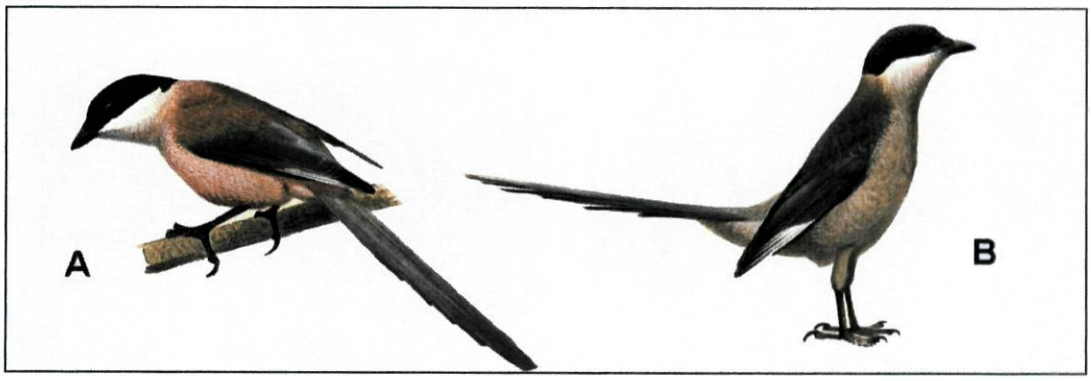


Figura 1.2. A: Ave adulta da subespécie Ibérica *Cyanopica cyanus cooki*; **B**: Ave juvenil pertencente à mesma subespécie. Nesta figura é possível comparar um adulto e um juvenil da mesma subespécie. Os juvenis têm um tom mais escuro na plumagem, a cauda mais curta, o capuz de cor baça e a coroa mais clara (adaptado de Snow & Perrins, 1998).

Os juvenis são semelhantes aos adultos, mas têm uma plumagem acastanhada mais escura. Na face, aparentam ter uma máscara preta pois embora o capuz seja preto (baço), as penas da coroa são orladas de branco. A cauda é bastante curta uma vez que as duas rectrizes centrais, que nas aves adultas são as mais compridas, têm apenas metade do comprimento das rectrizes que lhes estão adjacentes (ver figura 1.2; Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Jonsson, 1994; Madge & Burn, 1994; Svensson, 1996; Snow & Perrins, 1998; Mullarney *et al.*, 1999).

Das nove subespécies de Pega-azul que actualmente são reconhecidas uma, *C. c. cooki*, habita a Península Ibérica e as restantes oito, *C. c. cyanus*, *C. c. koreensis*, *C. c. japonica*, *C. c. pallescens*, *C. c. stegmanni*, *C. c. interpositta*, *C. c. kansuensis* e *C. c. swinhoei*, habitam a Ásia

(Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998). Actualmente, não se considera válida a subespécie asiática *C. c. jeholica*, mencionada por Goodwin (1986) e o mesmo sucede relativamente à subespécie *C. c. gili*, descrita em 1923 por Witherby com base em aves capturadas em Candeleda, Avila (Espanha; Witherby, 1928 *In* Sacarrão, 1967).

De entre estas subespécies, *C. c. cooki* é aquela que mais se destaca morfologicamente. Tem a cauda ligeiramente mais curta, raramente com a extremidade branca, que quando presente nunca tem mais de cinco milímetros de comprimento. Adicionalmente, *C. c. cooki* tem dimensões corporais menores e uma cor mais acastanhada no dorso e ventre (ver figuras 1.3 e 1.4).

Figura 1.3. (©John Gardner)
Exemplar de Pega-azul pertencente à subespécie ibérica, *C. c. cooki*. Nesta fotografia pode observar-se a coloração castanha no dorso da ave e o azul-celeste intenso nas asas e cauda.

Figura 1.4. (©Tohru Akiba)
Exemplar de Pega-azul pertencente à subespécie que habita o Japão, *C. c. japonica*. Na fotografia é bem visível a extensa zona branca na extremidade da cauda, característica das subespécies asiáticas de Pega-azul.

A diferenciação das subespécies asiáticas baseia-se na intensidade da coloração e parece variar de forma clinal, sendo por vezes pouco evidente (Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994). No continente asiático, observa-se uma tendência para que as subespécies de maior tamanho e de coloração mais pálida e acinzentada ocupem as zonas mais setentrionais e interiores da sua área de distribuição, enquanto as subespécies mais pequenas e de coloração mais acastanhada ocupam as áreas mais a Sul e (ou) litorais (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994). Uma situação análoga ocorre na Península Ibérica, onde as aves maiores e mais acinzentadas vivem na parte Norte, enquanto que as aves mais pequenas e de coloração mais acastanhada ocorrem nas zonas mais ao Sul e junto ao litoral. No entanto, a sobreposição nas medidas corporais dos dois "grupos" é demasiado extensa para que possam ser reconhecidos como entidades distintas (Sacarrão, 1967; Cramp & Perrins, 1994).

Existem variações consideráveis no tipo de habitat preferido pela Pega-azul, consoante as regiões onde ocorre. No continente asiático, pode encontrar-se desde o nível do mar até aos 1600 m de altitude (no Japão), em florestas de folhosas ou mistas (embora prefira as primeiras), parecendo ser especialmente comum em bosques e galerias ripícolas. Frequenta, também, zonas abertas com alamedas de árvores, matas, pomares ou sebes e pode, inclusivamente, ser observada em jardins e parques urbanos. No Japão, esta espécie vive em áreas onde frequentemente neva, nos meses mais frios do ano (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994).

Na Península Ibérica é uma espécie essencialmente de zonas baixas, com bosques mediterrânicos, pertencentes aos andares bioclimáticos termomediterrânico, mesomediterrânico e supramediterrânico, estando ausente das zonas de tipo eurosiberiano e de alta montanha (Rivas Martínez, 1987; De La Cruz, 1997). A Pega-azul atinge os 1100 metros de altitude nas serras de Gredos e Nevada (Tellería *et al.*, 1999), mas este poderá não ser o seu limite superior de distribuição, uma vez que existem registos de aves a 1500 metros de altitude (De La Cruz, 1997). Prefere os sistemas florestais e agro-florestais, desde que aí encontre bosques abertos. Parece ser especialmente frequente em montados de sobro e azinho (*Quercus suber* e *Q. rotundifolia*), mas ocupa também pinhais (sobretudo de Pinheiro-manso, *Pinus pinea*), zimbrais (*Juniperus* sp.), pomares, olivais (*Olea europaea*), bosques de Carvalho-negral (*Q. pyrenaica*) ou Freixo (*Fraxinus excelsior*) e, inclusive, eucaliptais (*Eucalyptus globulus*; Rufino, 1989; Muñoz-Pulido *et al.*, 1990; Alonso *et al.*, 1991; Elias *et al.*, 1998; Tellería *et al.*, 1999). Nas zonas mais desarborizadas pode encontrar-se nas linhas de árvores existentes ao longo das estradas (Elias *et al.*, 1998).

A Pega-azul procura normalmente o alimento no meio da folhagem de árvores e arbustos ou no chão, debaixo do manto de folhas ou ramos mortos e na terra. Enquanto se alimenta, nunca se afasta muito do abrigo proporcionado pelas copas das árvores. Pode ser observada, principalmente no Extremo Oriente, a alimentar-se em lixeiras, manjedouras de animais, em aldeias e mesmo em parques e jardins, de cidades de grandes dimensões, onde se habituou à constante presença humana. Em algumas zonas da Ásia é frequentemente capturada em armadilhas de caçadores ao tentar retirar o isco aí existente. À semelhança de outras espécies de Corvídeos (como o Gaio, *Garrulus glandarius*, e o Quebra-nozes, *Nucifraga caryocatactes*, por exemplo), também a Pega-azul tem o hábito de esconder alimentos, enterrando-os no solo. Na

Península Ibérica, este comportamento foi documentado com bolotas, azeitonas e pinhões (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994)

As aves adultas têm um regime alimentar omnívoro mas a dieta das crias é essencialmente insectívora (Cramp & Perrins, 1994; Canário *et al.*, 1999). De acordo com Canário e colaboradores (1999), a ausência de materiais de origem vegetal na dieta das crias poderá estar relacionada com a maior quantidade de proteína que existe nas presas animais e com o facto de as proteínas serem essenciais a um desenvolvimento rápido das crias. A alimentação da Pega-azul é composta, principalmente, por Insectos e outros invertebrados, sementes, frutos e, menos frequentemente, desperdícios humanos e pequenos vertebrados. A fracção animal da sua dieta é composta, principalmente, por larvas e adultos de coleópteros, mas inclui também Miriápodes, Diplópodes, Himenópteros, Dípteros, Odonata e Hemípteros (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Canário *et al.*, 1999; Tellería *et al.*, 1999). Por vezes, também consome partes de carcaças de animais, tendo sido observadas pegas-azuis a alimentarem-se de uma carcaça de Burro (Santos Júnior, 1968). A fracção vegetal da dieta é marcadamente frugívora, com um predomínio das uvas, pinhões, frutos de Aroeira e figos, mas também inclui azeitonas, maçãs, bolotas e bagas de Zimbro (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Tellería *et al.*, 1999). A importância relativa de cada um dos itens acima referidos varia com a região geográfica, a idade das aves e a estação do ano.

A Pega-azul é uma espécie gregária, que vive em bando durante todo o ano (Goodwin, 1986; Rufino, 1989; Cramp & Perrins, 1994; De La Cruz, 1997; Elias *et al.*, 1998; Snow & Perrins, 1998; Canário & Marín, 1999). Cada bando tem um território de 0,1 a 1 Km^2, que defende activamente contra a intrusão de aves de outros bandos. Após a reprodução, cada bando é formado pelos grupos familiares provenientes da mesma colónia, mas durante o Inverno diferentes bandos podem juntar-se em grandes grupos, que chegam a atingir mais de 200 exemplares (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994). Enquanto se movimentam pelo seu território, os membros de um bando comunicam constantemente entre si por intermédio de vocalizações. A defesa da colónia de reprodução é feita por todas as aves da colónia, que se juntam e perseguem o intruso até que este se afaste. Nestas ocasiões, alguns indivíduos de um bando podem perseguir um predador, como o Corvo (*Corvus corax*), durante vários minutos e ao longo de uma distância superior a um quilómetro (dados não publicados; Cramp & Perrins, 1994).

Na época de nidificação, as aves de um mesmo bando formam uma colónia reprodutora embora, por vezes, também possam nidificar isoladamente. A dimensão de uma colónia reprodutora depende da proporção de aves do bando que se reproduzem num dado ano. As colónias de nidificação da Pega-azul são formadas, normalmente, por três a dezasseis casais mas, por vezes, podem conter mais de 20 casais e existem registos de colónias com mais de 90 exemplares (Hosono, 1983; Cramp & Perrins, 1994; Canário & Marín, 1999). Os ninhos localizam-se em árvores diferentes e distam 40 a 100 metros dos ninhos adjacentes, embora já tenham sido detectados dois ninhos numa mesma árvore e ninhos distando menos de cinco metros entre si (dados não publicados; Muñoz-Pulido *et al.*, 1990; Cramp & Perrins, 1994). Os territórios ocupados por colónias adjacentes têm muito pouca ou nenhuma sobreposição entre si, pelo que a distribuição das colónias de nidificação é descontínua (Cramp & Perrins, 1994).

Embora a Pega-azul seja uma espécie monogâmica, os casais reprodutores podem ter a ajuda de outros membros do bando. Este tipo de sistema de reprodução, em que existem indivíduos - os ajudantes (*helpers*) - que ajudam a criar juvenis que não lhes são directamente aparentados, denomina-se cria cooperativa (Brown, 1974; Canário & Marín, 1999). O sistema de cria cooperativa é frequente em Corvídeos, particularmente nas espécies do continente americano mas, até ao momento, só foi demonstrado em duas espécies do velho mundo, a Pega-azul (no Japão e na Península Ibérica) e a "Pega da Formosa" (*Urocissa caerulea*), embora também possa existir nas restantes espécies do género *Urocissa* (Araújo, 1975; Hosono, 1983; Komeda, *et al.*, 1987; De La Cruz & González, 1993; Madge & Burn, 1994; Arnold & Owens, 1998). Embora a presença de ajudantes seja comum, é frequente existirem casais que se reproduzem sem a sua ajuda (Canário *et al.*, 1999). O número de ajudantes por ninho é variável: geralmente existe apenas um, mas a presença de dois ajudantes não é rara e foi mesmo registada uma ave que assumia o papel de ajudante em dois ninhos diferentes (Cramp & Perrins, 1994; Canário *et al.*, 1999). Julga-se que a idade da ave não é determinante para que se comporte como ajudante ou reprodutora activa numa época de nidificação. Outros factores, como o grau de parentesco com as restantes aves e o seu estatuto social, desempenham, provavelmente, papeis importantes neste processo (Komeda *et al.*, 1987; Cramp & Perrins, 1994).

Os ninhos de Pega-azul têm uma forma hemisférica, semelhante a uma taça. Externamente, são formados por uma estrutura de pequenos ramos unidos entre si e assentes

numa base composta por lama, terra e excrementos de animais. Internamente, são revestidos por uma camada, com cerca de um centímetro de espessura, de pequenas folhas e raízes de plantas, líquenes, pêlos de animais, penas de aves e musgo (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998). Os ninhos localizam-se preferencialmente em árvores, a meio da altura da copa e o mais longe possível do tronco, mas sem serem visíveis do exterior da copa. Segundo Alonso e colaboradores (1991), esta disposição dos ninhos permite minimizar a sua acessibilidade e maximizar a sua camuflagem com o meio, podendo, assim, desempenhar um papel na redução do insucesso reprodutor devido à predação. Constrói o ninho em árvores e arbustos podendo, no Extremo Oriente, fazê-lo também em acumulações de ramos e detritos depositados pela acção de cheias, e mesmo no solo (Cramp & Perrins, 1994). Entre as árvores escolhidas pela espécie para nidificar na Península Ibérica encontram-se: a Azinheira (*Quercus rotundifolia*), o Sobreiro (*Q. suber*), o Carvalho-negral (*Q. pyrenaica*), a Oliveira (*Olea europaea*), a Amendoeira (*Prunus dulcis*), o Freixo (*Fraxinus excelsior*), os choupos (*Populus* sp.), o Pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), o Pinheiro-manso (*P. pinea*), a Laranjeira (*Citrus aurantium*) e o Eucalipto (*Eucalyptus globulus*; Alonso *et al.*, 1991; Cramp & Perrins, 1994).

A postura decorre entre Março e finais de Julho na Península Ibérica, sendo mais frequente entre meados de Abril e Maio. Na Ásia é mais tardia, ocorrendo entre finais de Maio e Junho (Goodwin, 1986; Muñoz-Pulido *et al.*, 1990; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994). Factores como o tipo de folhagem da árvore onde se localiza o ninho (folha perene *versus* folha caduca) ou a altitude do local podem influenciar a data de início da postura. Ocasionalmente, a Pega-azul pode efectuar uma postura de reposição ou uma segunda postura (Muñoz-Pulido *et al.*, 1990; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994). Na Península Ibérica, a realização de segundas posturas parece estar limitada pela curta duração da época favorável à reprodução nos ecossistemas Mediterrânicos, pelo que este comportamento só ocorre em anos muito favoráveis (Valencia *et al.*, 2000). Aparentemente, a realização de segundas posturas é mais frequente no Extremo Oriente (Cramp & Perrins, 1994). Quando assim sucede, os juvenis da primeira ninhada são alimentados pelo macho enquanto a fêmea incuba os ovos da segunda postura. A fêmea põem geralmente cinco a sete ovos (mínimo dois, máximo 11), que incuba durante 14 a 17 dias. As crias permanecem no ninho por 14 a 19 dias, sendo alimentadas nos primeiros dias apenas pela fêmea. O macho também participa directamente na alimentação das crias, mas apenas após os primeiros dias de vida destas. No início, tanto o progenitor

masculino como o(s) ajudante(s) (caso existam) limitam-se a entregar o alimento à fêmea, que o distribui pelas crias, e só posteriormente alimentam directamente as crias. Após abandonarem o ninho, os juvenis continuam a ser alimentados pelos progenitores durante cerca de um mês (Cramp & Perrins, 1994; Snow & Perrins, 1998).

Na Península Ibérica, os ninhos podem ser parasitados pelo Cuco-rabilongo (*Clamator glandarius*) e pelo Cuco-canoro (*Cuculus canorus*), e no Extremo Oriente pelo Cuco da espécie *Cuculus micropterus* (Hosono, 1983; Goodwin, 1986; Alonso *et al.*, 1991; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Tellería *et al.*, 1999). A predação dos ninhos é a principal causa de insucesso reprodutor nesta espécie. Na Península Ibérica, os principais predadores de ninhos desta ave são Mamíferos como o Leirão-dos-pomares e a Geneta (*Elyomis quercinus* e *Genetta genetta*), Répteis como o Sardão e a Cobra-rateira (*Lacerta lepida* e *Malpolon monspessulanus*) e Aves como a Pega-rabuda e o Corvo (*Pica pica* e *Corvus corax*; De La Cruz *et al.*, 1990; Cramp & Perrins, 1994). No Japão, as pegas-azuis que nidificam junto a ninhos do gavião *Accipiter gularis* têm maior sucesso reprodutor pois esta ave de rapina defende agressivamente as imediações do seu ninho contra a presença de predadores e, assim, fornece involuntariamente protecção aos ninhos de Pega-azul (Ueta, 1998). Em alguns anos com condições meteorológicas particularmente adversas, o alimento disponível é mais escasso, forçando as aves a abandonarem mais frequentemente o ninho em busca de comida, fazendo diminuir o sucesso reprodutor (Cramp & Perrins, 1994).

A Pega-azul é uma espécie residente na Península Ibérica, embora efectue algumas deslocações de reduzida amplitude, principalmente fora do período reprodutor. Em algumas zonas da Ásia realiza movimentos migratórios entre zonas de reprodução e zonas de invernada. Na fase de dispersão que se segue à sua emancipação, os juvenis movimentam-se apenas algumas dezenas de quilómetros. No entanto, existem algumas observações de Pega-azul em áreas afastadas da sua distribuição normal, na Península Ibérica. Estas observações foram quase todas realizadas na Primavera, o que indicia ser esta a estação do ano em que a mobilidade da espécie é maior. Durante estes movimentos erráticos a espécie já foi detectada em Arcos de Valdevez, Alcobaça, em numerosas localidades do Nordeste de Espanha e mesmo no Sul de França, embora as observações neste último país se possam dever a exemplares fugidos de cativeiro (Sacarrão, 1967, 1971, 1972, 1982; Ferrer, 1987; Cramp & Perrins, 1994; Tellería *et al.*, 1999; Dubois *et al.*, 2001).

De acordo com os dados publicados nos atlas da avifauna de ambos os países Ibéricos (ver Rufino, 1989 e Purroy, 1997), a população reprodutora deste Corvídeo na Península Ibérica deverá estar compreendida entre 250.000 e 360.000 casais, dos quais 240.000 a 260.000 se encontram em Espanha e 10.000 a 100.000 em Portugal. Nestes países, a espécie tem o estatuto de não ameaçada (SNPRCN, 1990). A população Ibérica desta ave encontra-se, aparentemente, numa fase de lenta expansão da sua área de distribuição (Sacarrão, 1982; Rufino, 1989; Madge & Burn, 1994; De La Cruz, 1997). Não se conhecem ameaças graves que possam a médio prazo comprometer a sobrevivência da Pega-azul. A principal ameaça reside na perseguição humana, pois alguns agricultores e caçadores imputam a esta espécie prejuízos em pomares e olivais bem como a predação sobre juvenis de espécies cinegéticas (De La Cruz, 1997; Canário *et al.*, 1999).

Nas zonas mais ocidentais da sua distribuição asiática, localizadas próximo do lago Baikal, a Pega-azul é uma espécie pouco comum e localizada. Na restante área de distribuição asiática, é uma espécie comum e poderá mesmo estar em expansão. No Japão, os efectivos desta ave na ilha de Honshu estão a aumentar mas, na ilha de Kyushu, a Pega-azul extinguiu-se após 1950, provavelmente devido à competição com a Pega-rabuda (*Pica pica*), que aí foi introduzida (Madge & Burn, 1994).

A distribuição mundial da Pega-azul é, provavelmente, o aspecto mais peculiar e enigmático da sua biologia. Este corvídeo tem uma distribuição ampla mas fortemente descontínua, na região Paleárctica. Nesta região, a Pega-azul apenas ocorre na Península Ibérica e no Extremo Oriente, em zonas da Rússia, Mongólia, Península Coreana, China e Japão (ver figura 1.5; Sacarrão, 1967 e 1971; Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998; Canário & Cardia, 2000). Entre estes dois extremos geográficos, a Pega-azul está ausente, mesmo de regiões que, *a priori*, parecem ter um habitat favorável à sua presença (Goodwin, 1986; De La Cruz, 1997).

Na região do Paleárctico Ocidental, a Pega-azul está confinada ao quadrante Sudoeste da Península Ibérica. O limite Norte da sua distribuição pouco ultrapassa o vale do Douro e a Este tem como limites o vale do Ebro e o Sistema Ibérico meridional. A Sul, a sua distribuição atinge o Atlântico no Alentejo e Algarve. A Sudoeste é parcialmente limitada pelo rio Guadalquivir, embora a espécie esteja presente a Sul deste rio nas serras do Norte das províncias de Málaga e

Granada (Sacarrão, 1972; Rufino, 1989; De La Cruz, 1997; Tellería *et al.*, 1999). Curiosamente, existem na Península Ibérica zonas contíguas à área de ocorrência da Pega-azul, ou mesmo incluídas no seu interior, nas quais a espécie nunca foi detectada, embora aí ocorram extensões consideráveis de habitat favorável (De Juana, 1980; Ferrer, 1987; De La Cruz, 1997). São exemplos destas regiões o vale do Guadiana, entre Badajoz e Mourão, e as serras de Cuenca e Teruel, em Espanha (dados não publicados; De La Cruz, 1997).

1.7 O Problema da Distribuição Mundial da Pega-azul

O problema colocado pela invulgar distribuição geográfica da Pega-azul tem merecido a atenção de naturalistas e biólogos desde há bastante tempo. Para explicar a distribuição tão marcadamente descontínua desta espécie foram propostas duas hipóteses.

A primeira hipótese sugere que as populações ibéricas de Pega-azul tiveram a sua origem em aves, introduzidas nos séculos XVI-XVII por navegadores ou comerciantes Portugueses a partir da Ásia, uma vez que era usual a colheita de espécimes zoológicos e botânicos para enriquecer colecções e para recreio. A plumagem colorida da Pega-azul, o seu reduzido tamanho e o seu regime alimentar omnívoro (e, portanto, relativamente fácil de satisfazer durante uma longa viagem marítima) poderiam torná-la uma ave bastante apropriada para ser mantida em cativeiro e transportada para a Europa. Após a chegada à Península Ibérica, alguns exemplares poderiam ter fugido de cativeiro (ou sido voluntariamente libertados). Se estas aves se tivessem conseguido estabelecer no meio selvagem poderiam constituir o núcleo fundador da actual população Ibérica (Santos Júnior, 1968; Canário & Cardia, 2000).

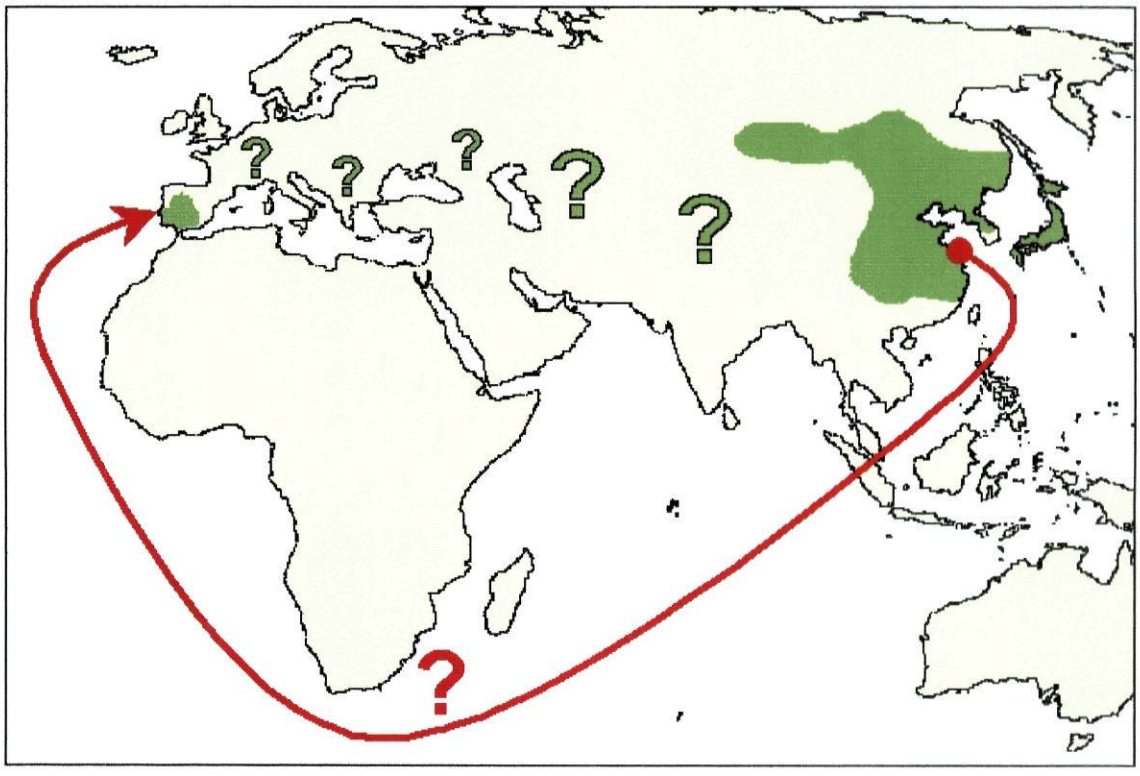


Figura 1.5. A área de distribuição mundial da Pega-azul (*Cyanopica cyanus*) está representada a verde (adaptado de Cramp & Perrins, 1994 e Madge & Burn, 1994). A hipótese segundo a qual esta espécie foi introduzida na Península Ibérica após o estabelecimento das rotas comerciais entre os reinos Ibéricos e o Extremo Oriente está representada pela seta e ponto de interrogação a vermelho. Os pontos de interrogação a verde pretendem representar a hipótese segundo a qual a Pega-azul teve no passado uma vasta área de distribuição através da Eurásia, que sob o efeito das glaciações do Quaternário se fragmentou e contraiu, tendo a espécie sobrevivido apenas na Península Ibérica e no Extremo Oriente.

Curiosamente, esta mesma hipótese é invocada para explicar a distribuição mundial de duas espécies de ostras. As espécies *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata* foram inicialmente descritas por Thunberg (1793) e por Lamarck (1819), respectivamente. A principal razão para serem classificadas como espécies distintas residia na separação das respectivas áreas de distribuição: *C. angulata* foi descrita na Europa e *C. gigas* na Ásia. De acordo com estudos sobre a sua morfologia (Ranson, 1948) e estudos genéticos baseados em alozimas (Mathers *et al.*, 1974; Buroker *et al.*, 1979; Mattiucci & Villani, 1983), estas ostras deveriam ser agregadas numa única espécie, ficando ambas as formas com o estatuto de subespécie (Menzel, 1974). Recentemente, foram realizados estudos de regiões do genoma mitocondrial (subunidade I da oxidase do citocromo) e nuclear (microssatélites) destas duas espécies (O'Foighil *et al.*, 1998;

Boudry *et al.*, 1998; Huvet *et al.*, 2000). Estes trabalhos confirmaram a hipótese de a espécie *C. angulata* ter sido introduzida na costa Portuguesa durante o século XVI, a partir de exemplares provenientes da Formosa (*Taiwan*; Huvet *et al.*, 2002).

Em 1974, Sacarrão criticou esta hipótese afirmando ser improvável que uma subespécie bem individualizada como a Ibérica tenha adquirido as características que a distinguem das restantes no curto intervalo de 200 a 300 anos que medeia a data da possível introdução e a data da descrição da subespécie Ibérica, feita em 1850 por Bonaparte. No entanto, existem exemplos de espécies que, após a sua introdução em zonas muito afastadas da sua área de distribuição natural, adquirem rapidamente uma diferenciação morfológica marcada. Com efeito, o Pardal-comum (*Passer domesticus*) foi introduzido na América do Norte no final do século XIX e hoje, apenas 100 anos depois, exibe uma marcada variação morfológica ao longo desse continente (Johnston & Selander, 1971; Gould & Johnston, 1972). O Coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) foi introduzido na ilha de Porto Santo em 1419 (Barros, 1988). Uma vez que na ilha não existiam quaisquer predadores, os coelhos prosperaram, de tal modo que em 1590 eram considerados uma praga (Frutuoso, 1873). No século XIX, tanto Charles Darwin como Ernst Haeckel estudaram o coelho de Porto Santo o qual, segundo a sua opinião, constituiria uma nova espécie, que se tinha diferenciado dos coelhos europeus em apenas 400 anos. Haeckel chegou mesmo a atribuir o nome *Lepus huxley* ao coelho de Porto Santo, formalizando assim a sua separação dos restantes coelhos europeus (na altura designados como *Lepus cuniculus*; França, 1913; Zeuner, 1963).

A longa duração das viagens marítimas entre o Extremo Oriente e Portugal (cerca de 2 anos) associada às difíceis condições em que se realizavam, constituiriam, segundo Sacarrão (1974), um grande obstáculo ao transporte de animais vivos para Portugal. Embora estas dificuldades fossem reais, tal não impediu o transporte para a Europa de animais de maior porte do que a Pega-azul, como o provam os quinze exemplares de Dodó (*Raphus cucculatus*) que chegaram vivos à Europa nos séculos XVI e XVII e o Rinoceronte-Indiano (*Rhinocerus unicornis*) que Afonso de Albuquerque enviou em 1515 ao rei D. Manuel I, e este ofereceu ao papa Leão X (Damião de Góis, 1954; Correia, 2001).

Segundo a hipótese alternativa, a Pega-azul é uma "relíquia biogeográfica" que sobreviveu às drásticas alterações climáticas do Quaternário apenas na Península Ibérica e no

Extremo Oriente, embora no passado tenha ocupado uma vasta área, não necessariamente contínua, através da região Paleárctica (Sacarrão, 1974). As glaciações do Quaternário teriam sido responsáveis (directa ou indirectamente) pela fragmentação da área de distribuição original da Pega-azul e pela extinção dos núcleos populacionais existentes entre as suas actuais áreas de ocorrência. A sobrevivência da Pega-azul no Extremo Oriente e na metade Sul da Península Ibérica (duas regiões que se situam, aproximadamente, à mesma latitude) terá sido favorecida pela existência, nestes locais, de um clima mais ameno e de áreas com vegetação arbórea.

As glaciações do Quaternário tiveram um efeito marcado sobre as comunidades biológicas do Paleárctico Ocidental. Durante os máximos glaciários, espécies de *taxa* tão distintos quanto os Mamíferos, Anfíbios, Artrópodes, e Plantas tiveram a sua distribuição restrita a uma ou mais zonas de refúgio, nas três penínsulas do Sul do continente Europeu - Ibéria, Itália e Balcãs (Bilton *et al.*, 1998; Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1996, 1999 e 2000; Blondel, 2001). Após o final das glaciações, muitas destas espécies expandiram-se para o Centro e Norte da Europa acompanhando o recuo dos gelos (Bilton *et al.*, 1998; Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1996, 1999 e 2000; Blondell, 2001). Segundo esta hipótese, por algum motivo desconhecido, a Pega-azul permaneceu confinada à Península Ibérica após o final das glaciações (Canário & Cardia, 2000). Existem outros pares de espécies de Aves (ou subespécies) que apresentam padrões de distribuição semelhantes, mas nunca tão marcadamente alopátricos quanto a Pega-azul. São os casos da Cegonha-branca *Ciconia ciconia* e Cegonha-branca Oriental *C. (c.) boyciana*, do Verdelhão-comum *Carduelis chloris* e Verdelhão-Asiático *C. (c.) sinica* e do Chapim-palustre *Parus palustris* e Chapim-palustre Asiático *P. p. brevirostris* (Del Hoyo *et al.*, 1992; Madge & Burn, 1994; Clement *et al.*, 1999). Contra esta hipótese foram apontadas as seguintes objecções:

i) Não eram conhecidos fósseis de Pega-azul fora da China (Tyrberg, 1998);

ii) Não existem outras Aves que apresentem uma distribuição geográfica idêntica à da Pega-azul;

iii) Não existem registos históricos indicando a presença da Pega-azul em áreas da bacia mediterrânica e Ásia (fora da sua actual área de distribuição), onde existe o habitat favorável à sua ocorrência (Canário & Cardia, 2000).

Recentemente, foram descobertos em Gibraltar dois fósseis (um úmero de uma ave adulta e outro de um juvenil) identificados como sendo de Pega-azul, *Cyanopica cyanus* (Cooper, 2000). A datação pelo método do carbono 14, de carvões encontrados na mesma camada estratigráfica, atribuiu a estes fósseis uma idade superior a 44.000 anos. Uma outra indicação da antiguidade destes fósseis foi dada pela análise do contexto estratigráfico da sua descoberta, pois encontravam-se associados a instrumentos de pedra atribuídos ao Homem de Neandertal (*Homo neanderthalensis*). De acordo com estes dados, a Pega-azul já estaria presente no Sul da Península Ibérica durante o último período glaciar, o que invalidaria a hipótese da sua introdução. No entanto, a identificação destes fósseis como pertencendo a *Cyanopica cyanus* não é consensual (Marco, 2000), razão pela qual é desejável que existam novas evidências que possam esclarecer o problema da origem das populações ibéricas de Pega-azul (Canário & Cardia, 2000).

A análise comparativa da variabilidade genética das populações ibéricas e asiáticas de *C. cyanus* poderá responder a estas questões e testar ambas as hipóteses para a origem da Pega-azul na Península Ibérica. Assim, assumindo como correcta a hipótese de a Pega-azul ser uma espécie relíquia na Península Ibérica, esperar-se-ia que:

i) As populações asiáticas apresentassem maior variabilidade genética do que as ibéricas, pois têm efectivos populacionais superiores que estão dispersos por uma área geográfica mais extensa;

ii) Os haplótipos detectados fossem diferentes entre as duas populações, existindo haplótipos privativos das populações asiática e ibérica;

iii) A similaridade genética entre populações da Ásia e Península Ibérica fosse menor do que a existente entre populações de uma mesma região.

Pelo contrário, se a espécie tiver sido introduzida na Península Ibérica entre os séculos XVI a XVII, dado o reduzido tempo decorrido desde a sua introdução (que não é suficiente para que a taxa de mutação possa reconstituir a variabilidade genética entretanto perdida) e devido à acção combinada da deriva genética e do efeito do fundador, esperar-se-ia que:

i) A actual população ibérica possuísse um reduzido número de haplótipos, idênticos, ou muito próximos, dos existentes nas populações asiáticas contemporâneas;

ii) A similaridade genética entre populações dos extremos geográficos fosse, nalguns casos, maior do que a existente entre populações que habitam a sua área de distribuição natural;

iii) A similaridade genética entre populações na área colonizada fosse maior do que a similaridade genética entre populações da região original.

1.8 Objectivos

Constituiu um objectivo deste trabalho averiguar qual a posição filogenética da Pega-azul no seio da família *Corvidae*, tentando determinar qual, ou quais, dos géneros actuais pertencentes aos *Corvidae* está mais próximo do género *Cyanopica*.

Pretende-se também esclarecer se a presença da Pega-azul na Península Ibérica se deve a

i) um fenómeno de vicariância, desencadeado por alterações climáticas que resultaram na extinção da espécie nas áreas situadas entre a Península Ibérica e o Extremo Oriente;

ii) ou resulta de uma introdução, realizada entre os séculos XVI e XVII, por navegadores, marinheiros ou comerciantes Ibéricos.

Se for determinado que o isolamento da espécie na Península Ibérica teve origem num fenómeno de vicariância ligado a alterações ambientais, proceder-se-á a uma reavaliação da divergência da subespécie Ibérica *versus* as subespécies asiáticas. Com este processo, procurar-se-á determinar qual a categoria taxonómica mais apropriada para classificar a forma Ibérica e situar, numa escala cronológica, o intervalo de tempo durante o qual terá ocorrido a separação das aves ibéricas e asiáticas.

Caso a hipótese da introdução se afigure mais plausível, um objectivo secundário deste trabalho consiste em avaliar o grau de divergência genética atingido pela população Ibérica face às asiáticas, nos 400 anos que decorreram desde a data da hipotética introdução da Pega-azul na Península Ibérica.

Procurar-se-á, ainda, averiguar qual o grau de subestruturação genética das populações de Pega-azul da Península Ibérica.

2. Material e Métodos

2.1 Critérios de Selecção dos Locais de Amostragem

Os locais de amostragem foram seleccionados de acordo com os seguintes critérios:

i) representarem uma parte significativa da área de distribuição da Pega-azul na Península Ibérica;

ii) a presença e abundância da Pega-azul: sempre que possível dirigiu-se a prospecção para áreas onde era conhecida *a priori* a presença e abundância da espécie, de acordo com a bibliografia consultada (Rufino, 1989; Purroy, 1997; Elias *et al.*, 1998), a experiência pessoal e contactos com ornitólogos e habitantes das zonas;

iii) a sua acessibilidade: apenas foram visitados locais de fácil acesso, para minimizar o esforço despendido na obtenção de cada amostra e possibilitar a recolha de um maior número de amostras.

2.2 Origem das Amostras

As aves amostradas em Idanha-a-Velha, Alcafozes, Alares, Pinhel, Congida e Pocinho foram capturadas, entre Abril e Julho de 2001, ao abrigo de uma autorização concedida pelo Instituto da Conservação da Natureza (ICN). As amostras provenientes de Barrancos foram cedidas pelo Dr. Filipe Canário. Ao Dr. António Monteiro (Parque Natural do Douro Internacional/ICN) deve-se a recolha de uma ave, encontrada morta nas imediações de Lagoaça.

As amostras provenientes de Badajoz (Espanha) foram recolhidas em 1998, pelo Prof. Dr. Carlos De La Cruz (*Universidad de Extremadura*, Badajoz, Espanha) e as de Sevilleja De La Jara em 1997, tendo sido cedidas pelos Drs. Ursula Höfle e Juan Manuel Blanco (Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas).

Na figura 2.1 estão representados os locais da Península Ibérica onde foram recolhidas amostras para o presente trabalho.

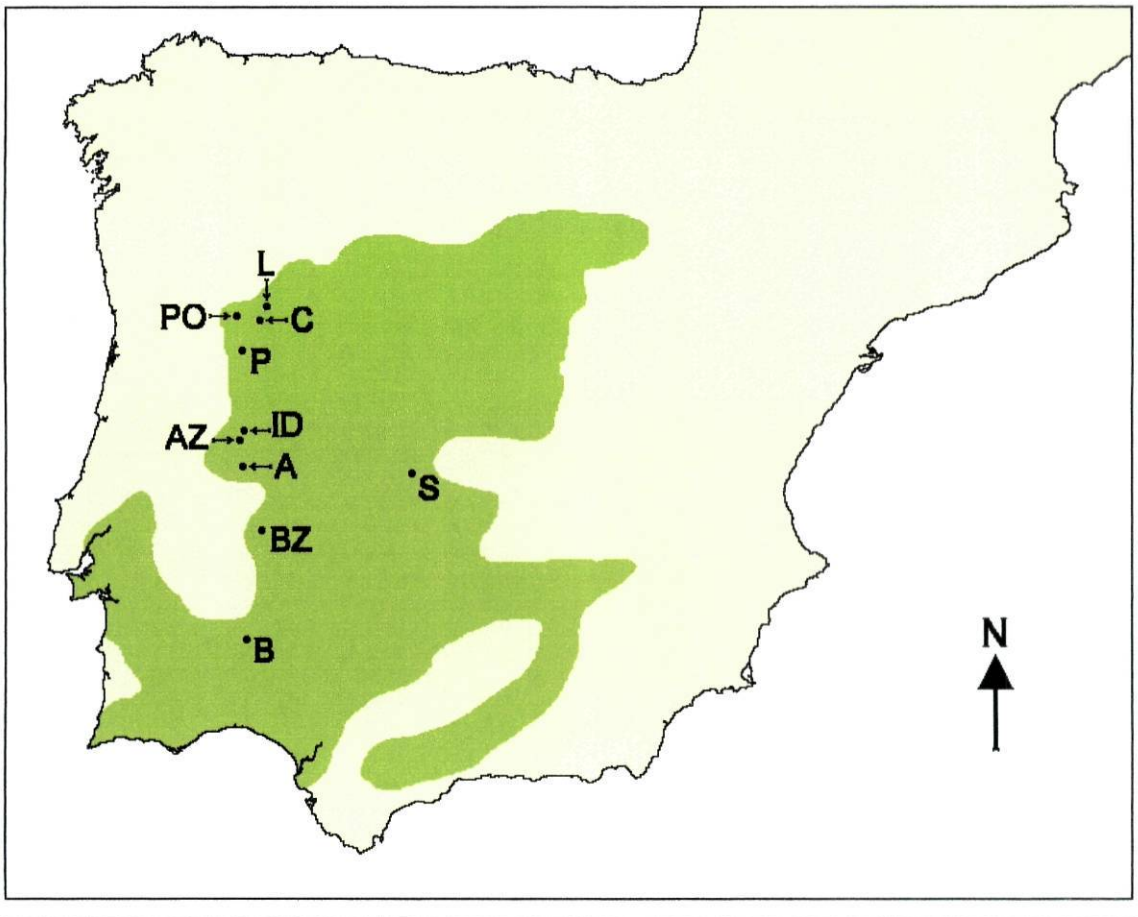


Figura 2.1. Locais de amostragem de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*) na Península Ibérica; A área de distribuição da espécie está representada a verde (adaptado de Rufino, 1989 e De La Cruz, 1997); **L** - Lagoaça; **PO** - Pocinho; **C** - Congida (Freixo de Espada à Cinta); **P** - Pinhel; **ID** - Idanha-a-Velha; **AZ** - Alcafozes; **A** - Alares (Rosmaninhal); **BZ** - Badajoz (Espanha); **B** - Barrancos; **S** - Sevilleja De La Jara (Espanha).

Constrangimentos de ordem temporal, financeira e logística impediram a recolha *in situ* de amostras de Pega-azul na Ásia, pelo que estas foram obtidas através da colaboração estabelecida com o Prof. Doutor Shou-Hsien Li (*American Museum of Natural History/Taiwan Normal University*) que cedeu amostras de quatro aves de origem Asiática. Três destas amostras foram colhidas a partir de exemplares conservados nas colecções do *American Museum of Natural History* (AMNH) e pertencem às subespécies *C. c. pallescens*, *C. c. swinhoei* e *C. c. kansuensis*. A quarta ave amostrada foi adquirida num estabelecimento de

venda de animais na Formosa (*Taiwan*). Não foi possível determinar a identidade subespecífica deste exemplar, uma vez que a Pega-azul não ocorre naturalmente na Formosa e a diferenciação morfológica das subespécies asiáticas é clinal e pouco notória (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998).

Apesar dos esforços desenvolvidos, não foi possível obter amostras de Pega-azul pertencentes às subespécies asiáticas *C. c. cyanus*, *C. c. stegmanni*, *C. c. koreensis*, *C. c. interposita* e *C. c. japonica*.

2.3 Métodos de Captura e Marcação de Pegas-Azuis

As amostras de Pega-azul da Península Ibérica provêm de aves adultas capturadas com o auxílio de redes de anilhagem e de armadilhas ou de juvenis capturados quando ainda se encontravam no ninho. As armadilhas utilizadas foram especificamente desenhadas para a captura de pegas-azuis, tendo sido concebidas pelo Prof. Dr. Carlos De La Cruz.

Os exemplares capturados foram marcados com anilhas metálicas da Central de Anilhagem Portuguesa, podendo deste modo evitar-se a amostragem repetida do mesmo exemplar. Não foram anilhadas as aves capturadas em Alcafozes e Idanha-a-Velha e os juvenis que apresentavam um diâmetro do tarso muito reduzido. Em Alcafozes, a captura de pegas-azuis foi feita no interior de uma colónia de nidificação, onde mais de 50% dos ninhos detectados continham ainda ovos. Neste local, optou-se por não anilhar as aves capturadas para reduzir o tempo de permanência no local e a perturbação causada na colónia. Após contacto com habitantes de Idanha-a-Velha, constatou-se que era muito frequente a pilhagem dos ninhos de Pega-azul existentes junto à povoação (local onde se realizou a amostragem) pelo que os juvenis aí capturados também não foram anilhados.

2.4 Recolha e Conservação de Amostras.

Na tabela 2.1, apresentam-se os resultados referentes ao número de amostras recolhidas nas diferentes regiões da Península Ibérica.

Tabela 2.1. Amostras de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*) recolhidas na Península Ibérica e analisadas neste trabalho.

Local	Região	Código	Nº amostras recolhidas	Nº amostras analisadas
Barrancos	Baixo Alenteio	B	23	18
Badajoz	Extremadura	BZ	3	3
Sevilleja De La Jara	Castilla La Mancha	S	3	1
Alares	Beira Baixa	A	23	9
Idanha-a-Velha	Beira Baixa	ID	9	2
Alcafozes	Beira Baixa	AZ	15	7
Pinhel	Beira Alta	P	10	3
Pocinho	Beira Alta/Trás-os-Montes	PO	6	2
Congida	Trás-os-Montes	C	12	4
Lagoaça	Trás-os-Montes	L	1	1
		Total	**105**	**50**

O número de amostras sequenciadas é, para muitas localidades, menor do que o número de amostras recolhidas. Esta discrepância deve-se ao facto de existirem várias amostras de aves de uma mesma ninhada que, supostamente, serão irmãs (na ausência de parasitismo reprodutor na Pega-azul). Uma vez que o mtDNA das Aves se transmite exclusivamente por via materna, todas as aves irmãs devem apresentar o mesmo haplótipo, pelo que se analisou apenas uma amostra de cada ninhada.

A todas as aves capturadas foram retirados cerca de 70 µL de sangue por punção da veia braquial. Com o auxílio de um microcapilar de vidro recolheu-se o sangue para um tubo *eppendorf* contendo etanol (96%), conservado à temperatura ambiente, enquanto decorriam os trabalhos de recolha de amostras. Posteriormente, transferiram-se as amostras para uma arca congeladora, onde foram conservadas a -20ºC. Todas as aves capturadas foram libertadas o mais rapidamente possível, de modo a minimizar a perturbação causada por este processo. No caso dos juvenis não voadores, estes foram recolocados nos seus ninhos de origem.

As amostras das subespécies *C. c. kansuensis*, *C. c. swinhoei* e *C. c. pallescens* foram obtidas, a partir de exemplares conservados no AMNH, através de uma pequena porção de

tecido da planta do pé, retirada com o auxílio de um bisturi (menos de quatro milímetros quadrados).

2.5 Análise Molecular

2.5.1 Extracção de DNA

A extracção do DNA total das amostras de sangue foi feita de acordo com o protocolo originalmente descrito por Sambrook *et al.* (1989), com ligeiras modificações (ver Anexo II). Os produtos de extracção foram submetidos a um tratamento com polietilenoglicol (PEG) para melhorar o grau de pureza do DNA extraído (ver Anexo III).

O DNA das amostras de tecido da planta do pé foi extraído com um *kit* de extracção de DNA - *QIAamp Tissue Kit* (QIAGEN Gmbh, Hilden, Germany) - de acordo com as instruções do fabricante.

Para averiguar o sucesso e qualidade do DNA extraído, os produtos de extracção foram submetidos a uma corrida electroforética em géis de agarose (0,8%, p/v). Após a separação electroforética dos produtos de extracção, mergulharam-se os géis de agarose numa solução corante de brometo de etídio (0,05%, v/v) durante, aproximadamente, cinco minutos. Seguidamente, observaram-se as bandas correspondentes ao DNA extraído com o auxílio de luz ultravioleta.

2.5.2 Amplificação do mtDNA

A amplificação de fragmentos do mtDNA através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada em termocicladores *GeneAmp 2400 PCR System* (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc.) e *T3 Thermocycler* (Biometra). Neste processo foi usada a enzima *Taq polymerase* (Promega).

A amplificação da totalidade do gene mitocondrial do citocromo b foi feita em dois fragmentos, A e B (ver figura 2.2).

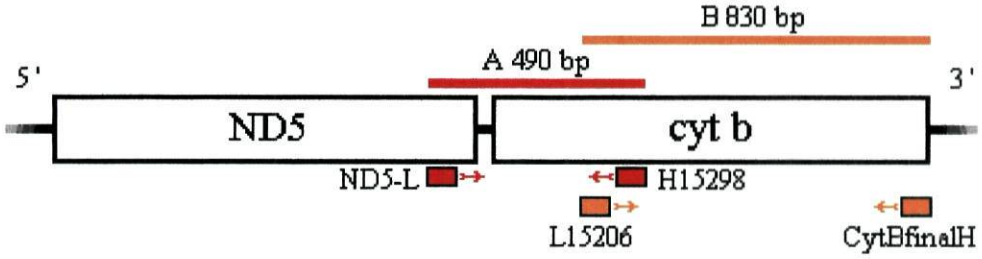


Figura 2.2. Representação esquemática dos fragmentos de DNA estudados neste trabalho, com indicação das posições relativas dos *primers* usados na sua amplificação. **Legenda. ND5**: gene da subunidade 5 da desidrogenase do NADH; **cyt b**: gene do citocromo b; **ND5-L**, **H15298**, **L15206** e **CytBfinalH**: *primers* usados na amplificação de ambos os fragmentos do mtDNA.

Estes fragmentos têm um comprimento de 490 e 830 pares de bases (bp), respectivamente, verificando-se uma sobreposição de 130 bp entre eles, pelo que no seu conjunto amplificam um total de 1190 bp do genoma mitocondrial. A região do genoma mitocondrial amplificada nestes dois fragmentos engloba 50 bp da porção terminal do gene da subunidade 5 da desidrogenase do NADH (*ND5*), a totalidade do gene do *cyt b* e uma pequena região não codificante situada entre ambos os genes, que na Pega-azul é composta por 9 bp.

O DNA das amostras provenientes de exemplares de museu encontra-se geralmente degradado, o que se traduz na impossibilidade de amplificar fragmentos longos de DNA. Assim, optou-se por tentar amplificar o *cyt b* em vários fragmentos de reduzido tamanho (aproximadamente 200 bp) que se sobrepõem nas suas extremidades. Para este efeito, foram usados *primers* desenvolvidos por investigadores do AMNH, que não se encontram publicados, pelo que não são referidos na tabela 2.2.

A constituição dos *primers* utilizados para amplificar os fragmentos A e B do mtDNA encontra-se descrita na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Lista dos *primers* usados na amplificação e sequenciação do mtDNA de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*).

Primer	Sequência (5' – 3')	Amplificação		Sequenciação		Fonte
		Fragmento A	Fragmento B	Fragmento A	Fragmento B	
ND5-L	TAGGATCTTTCGCCCTATC	+	-	-	-	*a)*
H15298	GCTCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	+	-	+	-	*b)*
L15206	GAGGAATCTACTACGG	-	+	-	+	*a)*
CytBfinalH	ATTTTGTTCTCTAGGGC	-	+	-	+	*c)*
THR-H	TTACAAGACCAATGTTTTTAT	-	+	-	+	*a)*

Legenda. Os símbolos + e - denotam se o *primer* foi ou não usado para amplificar e/ou sequenciar o fragmento de mtDNA; *a)* Shou-Hsien Li, comunicação pessoal; *b)* Helm-Bychowski & Cracraft, 1993; *c)* este trabalho;

Na tabela 2.3 apresenta-se a composição da reacção e o programa usado para amplificar o fragmento A do mtDNA de Pega-azul.

Tabela 2.3. Reagentes e programação do termociclador utilizados na amplificação do fragmento A do DNA mitocondrial de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*).

Reagentes	Quantidade[1] (µL)	Concentração
Taq	0,5	0,05 U/µL
Tampão (10x)	5,0	1x
$MgCl_2$	10,0	5 mM
ND5-L	0,5	0,1 µM
H15298	0,5	0,1 µM
DNTPs	1,5[2]	0,3 mM[3]
Amostra	1,0	-
H_2O	31,0	-

Fase	Duração	Temperatura	Nº de Ciclos
Desnaturação	3 minutos	94°C	x 1
Desnaturação	30 segundos	94°C	x 35
Hibridação	30 segundos	49°C	
Extensão	30 segundos	72°C	
Extensão	3 minutos	72°C	x 1
	∞	4°C	-

Legenda. [1] Os valores expressos referem-se a volumes de reacção de 50 µL; [2] Volume total de uma solução que incorpora os quatro tipos de dinucleotídeos; [3] Concentração final de cada um dos quatro dinucleotídeos.

Na tabela 2.4 apresenta-se a composição da reacção e o programa usado para amplificar o fragmento B do mtDNA de Pega-azul.

Tabela 2.4. Reagentes e programação do termociclador utilizados na amplificação do fragmento B do DNA mitocondrial de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*).

Reagentes	Quantidade[1] (µL)	Concentração Final	Fase	Duração	Temperatura	Nº de ciclos
Taq	0,5	0,05 U/µL				
Tampão (10x)	5,0	1x	Desnaturação	5 minutos	95°C	x 1
$MgCl_2$	14,0	7 mM	Desnaturação	1 minutos	95°C	x 30
L15206	0,5	0,1 µM	Hibridação	1 minutos	46°C	
CytBfinalH	0,5	0,1 µM	Extensão	1 minutos	72°C	
DNTPs	1,5[2]	0,3 mM[3]	Extensão	5 minutos	72°C	x 1
Amostra	1,0	-		∞	4°C	-
H_2O	27,0	-				

Legenda. [1] Os valores expressos referem-se a volumes de reacção de 50 µL; [2] Volume total de uma solução que incorpora os quatro tipos de dinucleotídeos; [3] Concentração final de cada um dos quatro dinucleotídeos.

Na tabela 2.5 apresenta-se a composição da reacção e o programa usado para amplificar fragmentos do *cyt b* em amostras de Pega-azul do AMNH.

Tabela 2.5. Reagentes e programação do termociclador utilizados na amplificação de fragmentos do citocromo b das amostras de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*) provenientes do *American Museum of Natural History*.

Reagentes	Quantidade[1] (µL)	Concentração Final	Fase	Duração	Temperatura	Nº de ciclos
Taq	0,5	0,05 U/µL				
Tampão (10x)	5,0	1x	Desnaturação	5 minutos	94°C	x 1
$MgCl_2$	2,0	1 mM	Desnaturação	1 minutos	94°C	x 25
Primer L	0,5	0,1 µM	Hibridação	1 minutos	54°C	
Primer H	0,5	0,1 µM	Extensão	90 segundos	72°C	
DNTPs	1,0[2]	0,3 mM[3]	Extensão	5 minutos	72°C	X 1
Amostra	1,0	-		∞	4°C	-
H_2O	39,5	-				

Legenda. [1] Os valores expressos referem-se a volumes de reacção de 50 µL; [2] Volume total de uma solução que incorpora os quatro tipos de dinucleotídeos; [3] Concentração final de cada um dos quatro dinucleotídeos.

Para confirmar o sucesso das reacções de amplificação, submeteram-se os produtos de amplificação a uma corrida electroforética em géis de agarose (2%, p/v). Nestas electroforeses foi usado um marcador de peso molecular conhecido (*Marker 5*, Eurogentec) para verificar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados. Após a electroforese, os géis de agarose foram corados com uma solução de brometo de etídio (0,05%, v/v) durante cerca de cinco minutos para, sob iluminação com luz ultravioleta, se observarem as bandas correspondentes ao fragmento de DNA amplificado.

2.5.3 Purificação dos Produtos de Amplificação.

Após a amplificação do mtDNA, procedeu-se a uma purificação dos produtos de PCR pelo método enzimático, com as enzimas exonuclease e fosfatase alcalina (*Amersham Life Science*; ver Anexo III). Este processo visa retirar da solução os reagentes que não foram totalmente gastos durante o processo de amplificação, para que a sequenciação do DNA se processe mais facilmente.

2.5.4 Sequenciação dos Fragmentos de mtDNA

As reacções de sequenciação decorreram em termocicladores (GeneAmp 2400 PCR System, Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc. e T3 Thermocycler, Biometra), tendo sido usados os *primers* L15206, CytBfinalH e H15298. A temperatura de hibridação dos *primers* L15206 e CytBfinalH foi de 46°C e para o *primer* H15298 foi de 49°C. A electroforese dos produtos sequenciados foi feita num sequenciador automático *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc.). Os protocolos utilizados neste processo encontram-se descritos no anexo V.

2.6 Análise de Dados

As sequências de DNA foram editadas com o programa *Sequence Navigator*™ versão 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc.), para corrigir os erros existentes nas sequências "em bruto". Os fragmentos de uma mesma amostra, sequenciados com os *primers* L15206, CytBfinalH e H15298 foram reunidos numa só sequência, com o auxílio dos

programas *Sequence Navigator*™ versão 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc.) e *XESEE* versão 3.1 (Cabot, 1997).

Para além das sequências de Pega-azul, foram igualmente usadas neste trabalho sequências de outras espécies de Aves, as quais foram retiradas da base de dados do *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html). Todas as sequências foram alinhadas manualmente, com o auxílio dos programas *Sequence Navigator*™ versão 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer-Applied Biosystems, Inc.) e *XESEE* versão 3.1 (Cabot, 1997).

Foram usados quatro métodos de agrupamento diferentes na análise filogenética - *Neighbor-joining* (NJ; Saitou & Nei, 1987), *Unweighted Pair-group Arithmetic Average* (UPGMA; Sneath & Sokal, 1973), *Minimum Evolution* (ME) e *Maximum Parsimony* (MP; ver Nei & Kumar, 2000). As árvores NJ, UPGMA e ME foram construídas com base numa matriz de distâncias entre os *taxa*, calculada pelo método de Tamura-Nei (1993) e as árvores MP foram elaboradas com os algoritmos existentes no programa MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Para avaliar a robustez de cada árvore, realizou-se o teste de *bootstrap* com 1000 replicações (Felsenstein, 1985) ou o *Interior Branch Test* (IBT), igualmente com 1000 replicações. Estes cálculos foram realizados com o programa MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Para reconstruir a filogenia dos *Corvidae* e determinar a posição mais provável da Pega-azul no seio desta família, analisou-se a variação contida num fragmento de DNA, com 925 bp de comprimento. Este fragmento está compreendido entre as posições 99 e 1023 (inclusive) do gene do *cyt b* e corresponde às posições 13791 a 14715 do genoma mitocondrial, de acordo com o alinhamento com a sequência de referência da Gralha-calva (Harlid *et al.*, 1998). Não foram incluídos nesta análise os 51 bp de sequência do ND5 assim como os nove bp que separam o ND5 do *cyt b*, uma vez que a maioria das sequências de mtDNA de Corvídeos disponíveis no GenBank não incluem esta região.

A escolha dos *outgroups* influencia grandemente a topologia das árvores filogenéticas. Estes *taxa* devem estar suficientemente próximos do grupo em análise para evitar a aleatoriedade na determinação da posição da raiz da árvore, sendo que o uso de mais do que um *outgroup* pode ajudar a reduzir os erros na reconstrução filogenética (Helm-Bychowski & Cracraft, 1993). Segundo os autores anteriormente citados, os *Ptilonorhynchidae* são um grupo

basal relativamente ao agrupamento formado pelas famílias *Paradisaeidae*, *Corvidae*, *Laniidae* e *Vireonidae* e os *Paradisaeidae* são o grupo irmão dos *Corvidae*. Consequentemente, foram usadas como *outgroups* na análise filogenética as sequências de duas aves-do-paraíso (*Paradisaeidae*), *Manucodia keraudrenii* e *Diphyllodes magnificus*, e de um membro da família *Ptilonorhynchidae*, *Ailuroedus melanotus* (retiradas do trabalho de Helm-Bychowski & Cracraft, 1993; ver tabela 2.6).

Tabela 2.6. Distribuição mundial das espécies utilizadas na reconstrução da filogenia dos *Corvidae* e códigos de acesso do *GenBank* para as suas sequências de *cyt b*.

Espécie	Distribuição Mundial	Código de acesso do Genbank	Fonte
Aphelocoma californica	Neárctica	AY030116	*a)*
Aphelocoma coerulescens	Península da Flórida	U77335	*b)*
Calocitta formosa	América Central	U77336	*b)*
Cissa chinensis	Ásia	U86037	*c)*
Corvus brachyrhynchos	Neárctica	AY030112	*a)*
Corvus corax	Holárctica	U86031	*c)*
Corvus corone	Paleárctica	U86032	*c)*
Corvus coronoides	Austrália	AF197837	*d)*
Corvus frugilegus	Eurásia	Y16885	*e)*
Corvus monedula	Paleárctica	U86033	*c)*
Cyanocitta cristata	Neárctica	X74258	*f)*
Cyanocitta stelleri	Neárctica	AY030113	*a)*
Cyanocorax chrysops	Neotropical	U77334	*b)*
Cyanolyca viridicyana	Neotropical	U77333	*b)*
Garrulus glandarius	Paleárctica	U86034	*c)*
Garrulus lidthi	Ilhas Nansei, Japão	U86035	*c)*
Gymnorhinus cyanocephalus	Neárctica	U77332	*b)*
Nucifraga caryocatactes	Eurásia	U86041	*c)*
Perisoreus canadensis	Neárctica	U77331	*b)*
Perisoreus infaustus	Eurásia	U86042	*c)*
Pica hudsonia	Neárctica	AY030114	*a)*
Pica pica	Paleárctica	U86036	*c)*
Ptilostomus afer	África	U86040	*c)*
Pyrrhocorax graculus	Eurásia	U86043	*c)*
Pyrrhocorax pyrrhocorax	Eurásia	U86044	*c)*
Urocissa erythrorhyncha	Ásia	U86038	*c)*
Ailuroedus melanotus	Oceânia	X74257	*f)*
Diphyllodes magnificus	Oceânia	X74255	*f)*
Manucodia keraudrenii	Oceânia	X74252	*f)*

Legenda. *a)* Cicero & Johnson, 2001; *b)* De Los Monteros & Cracraft, 1997; *c)* Cibois & Pasquet, 1999; *d)* Cracraft & Feinstein, 2000; *e)* Harlid *et al.*, 1998; *f)* Helm-Bychowski & Cracraft, 1993.

Para esclarecer qual das hipóteses - introdução *versus* vicariância - melhor explica a presença da Pega-azul na Península Ibérica, analisou-se a variação contida num fragmento de DNA, com 343 bp de comprimento, compreendido entre as posições 551 e 893 do *cyt b*. Esta região corresponde às posições 13791 e 14715 do mtDNA (inclusive), segundo o alinhamento

realizado com a sequência da Gralha-calva (*Corvus frugilegus*; Harlid *et al.*, 1998). Como *outgroups* desta análise foram usadas sequências de uma ave-do-paraíso (*Manucodia keraudrenii*; Helm-Bychowski & Cracraft, 1993) e da Pega-rabuda (*Pica pica*; Cibois & Pasquet, 1999; ver tabela 2.6).

A construção das redes (*networks*) de genealogias dos haplótipos ibéricos de Pega-azul foi feita com o auxílio do programa TCS versão 1.13 (Clements *et al.*, 2000), que implementa a metodologia descrita por Templeton *et al.* (1992). Para realizar esta análise foi usada uma região compreendida entre os genes *ND5* e *cyt b*, com 411 bp. Este fragmento situa-se entre as posições 13634 e 14044 do mtDNA (inclusive), de acordo com o alinhamento com a sequência da Gralha-calva (*Corvus frugilegus*; Harlid *et al.*, 1998).

As medidas de variação intra/interpopulacional e inter/intraespecífica nas sequências de DNA, bem como os testes de neutralidade foram calculados com o auxílio dos programas DnaSP versão 3.51 (Rozas & Rozas, 1999) e MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). A análise da distribuição das diferenças entre pares de sequências (*Pairwise Mismatch Distribution*) foi realizada com o programa Arlequin, versão 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

3. Resultados

3.1 Sequenciação do mtDNA de Pega-Azul

A amplificação e sequenciação de fragmentos dos genes mitocondriais *cyt b* e *ND5* permitiu obter 62 sequências, das quais 58 são de amostras da subespécie *C. c. cooki* e as restantes pertencem às subespécies *C. c. pallescens*, *C. c. kansuensis*, *C. c. swinhoei* e a uma ave asiática cuja subespécie é desconhecida. Estas sequências estão compreendidas entre as posições 13632 e 14822 do genoma mitocondrial, de acordo com o alinhamento com a sequência de referência da Gralha-calva (*Corvus frugilegus*; Harlid *et al.*, 1998). No anexo VI apresenta-se uma tabela que resume a informação relativa às posições variáveis existentes nestas sequências, assim como duas sequências de Pega-azul que incluem todas as bases no intervalo definido pelos fragmentos A e B (ver figura 2.2).

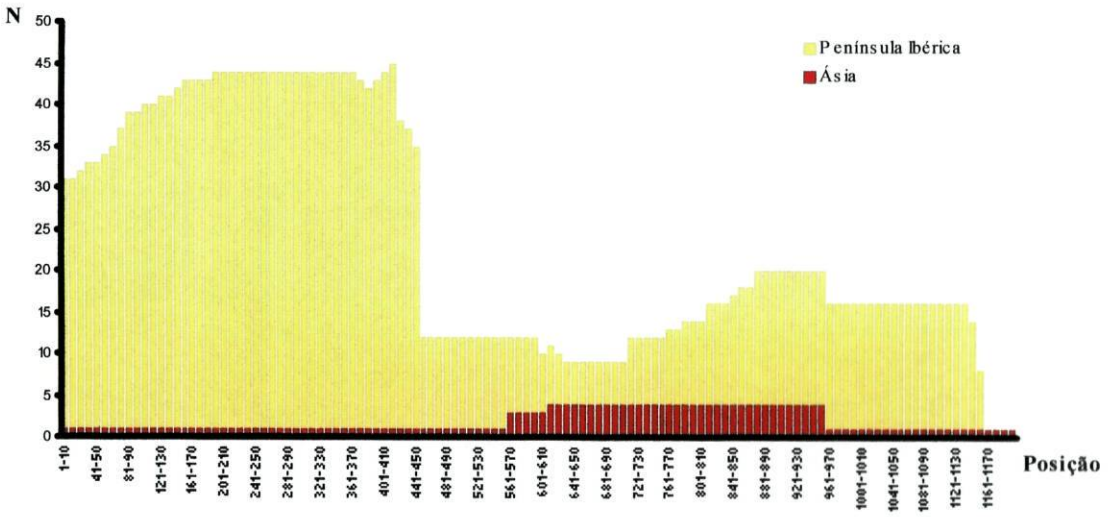


Figura 3.1. Representação gráfica das sequências de mtDNA de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*) realizadas no presente trabalho. As barras de cor amarela representam as sequências de amostras da subespécie Ibérica *C. c. cooki*, enquanto as barras de cor vermelha representam as sequências obtidas a partir de amostras das subespécies asiáticas. A escala no eixo das abcissas representa, em intervalos de 10 bp, a posição da sequência. A escala no eixo das ordenadas refere-se ao número de sequências obtidas para essa posição.

Na figura, são notórias as desigualdades existentes entre os comprimentos das diferentes sequências. Esta desigualdade verifica-se não só nas sequências de amostras de Pega-azul da Península Ibérica mas também nas sequências de amostras de origem asiática. Entre as sequências asiáticas, existe apenas uma que abrange a totalidade da região compreendida entre os fragmentos A e B do mtDNA (ver figura 2.2). As restantes três sequências não excedem os 400 bp de comprimento, que correspondem a uma região do intermédia do gene do citocromo b.

Existe um reduzido número de sequências de amostras ibéricas completas, *i.e.*, que abrangem toda a região do mtDNA amplificada, cujo comprimento é de 1160 bp, aproximadamente. A maior parte destas sequências tem um comprimento inferior a 500 bp, o qual corresponde à sequenciação da quase totalidade do fragmento A do mtDNA (ver figura 2.2). As sequências correspondentes ao fragmento B são em menor número do que as do fragmento A e, abrangem maioritariamente a metade terminal deste fragmento.

Tendo em consideração os objectivos do presente trabalho e as restrições impostas pelos dados obtidos, optou-se por realizar os diferentes tipos de análise com base em diferentes regiões da sequência de mtDNA. O estudo da filogenia da família *Corvidae* e a determinação da posição mais provável do género *Cyanopica* no seu seio, realizou-se com base em sequências de 900 bp do *cyt b*. Com estas sequências é possível estabelecer comparações entre várias espécies e géneros de *Corvidae*, permitindo uma melhor avaliação da filogenia deste grupo de Aves. A região intermédia do *cyt b* é a única zona onde existe um número semelhante de sequências de amostras ibéricas e asiáticas, sendo assim indicada para realizar comparações filogenéticas entre as diferentes subespécies de Pega-azul. Este é um passo essencial para averiguar qual a origem provável das populações ibéricas desta ave e determinar qual das duas hipóteses - introdução ou vicariância - melhor se coaduna com os dados moleculares. A região inicial do mtDNA amplificado, onde existe o número mais elevado de sequências de Pega-azul da Península Ibérica, foi usada para estudar a filogeografia da espécie no contexto Ibérico e averiguar qual o grau de subestruturação populacional da subespécie *C. c. cooki*. O estudo desta região permite comparar um número elevado de sequências de amostras provenientes de todos os locais de amostragem, fornecendo assim a necessária amplitude geográfica para a realização desta análise.

3.2 Filogenia dos *Corvidae*

Na tabela 3.1 apresentam-se as percentagens de divergência ao nível nucleotídico, existentes entre as diferentes espécies utilizadas para a reconstrução da filogenia da família *Corvidae*. Os valores apresentados foram calculados com a distância de Tamura-Nei (1993).

Tabela 3.1. Percentagem de diferenças entre as sequências da família *Corvidae*, calculada pelo método de Tamura-Nei (1993).

		Espécie																														
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**
Corvus corax	**1**		1,1	1,4	1,5	1,3	2,9	2,1	4,4	4,7	6,4	4,2	3,7	6,0	4,3	4,6	4,0	4,8	4,6	4,3	4,7	4,6	3,1	3,3	3,6	4,7	5,4	4,7	4,4	6,6	6,0	8,9
Corvus brachyrhynchos	**2**	7,0		0,5	1,1	2,0	2,9	2,3	4,4	4,7	6,4	3,7	3,5	6,0	4,1	4,3	4,0	5,0	4,6	4,1	4,2	4,3	3,6	3,7	3,9	4,7	5,4	5,2	4,4	6,9	6,8	9,2
Corvus corone	**3**	9,0	5,5		1,4	2,1	3,0	2,5	4,8	5,0	6,5	4,1	3,9	6,1	4,4	4,4	4,1	4,9	4,7	4,2	4,6	4,9	3,7	3,9	4,2	4,8	5,5	5,3	4,8	7,3	7,1	9,1
Corvus coronoides	**4**	8,4	8,2	9,6		2,0	3,2	2,3	4,9	5,2	6,6	4,4	4,2	6,5	4,3	4,6	4,2	4,6	4,8	4,1	4,4	4,8	3,4	3,5	3,9	4,7	5,7	4,7	4,9	7,1	6,8	9,5
Corvus frugilegus	**5**	7,5	9,1	9,4	9,7		3,2	2,6	4,7	5,2	6,9	4,4	4,0	6,5	4,8	5,0	4,4	5,3	4,8	4,3	5,4	5,5	3,4	3,5	4,1	4,4	5,7	4,7	5,2	6,9	7,3	8,4
Corvus monedula	**6**	10,3	10,8	11,7	10,9	10,3		2,8	4,9	5,2	6,6	4,2	4,2	6,3	4,6	4,8	3,7	4,8	4,6	4,3	4,9	5,0	3,2	3,3	3,9	4,7	5,2	4,4	4,9	6,6	6,8	9,5
Nucifraga caryocatactes	**7**	12,3	14,0	13,9	12,6	14,1	13,0		4,6	4,8	6,8	4,1	3,9	6,1	3,5	4,4	3,6	4,4	4,0	3,7	4,1	4,4	2,8	2,9	3,0	3,9	4,6	3,9	4,3	6,0	6,4	9,6
Aphelocoma californica	**8**	14,1	13,2	14,7	14,9	14,5	13,8	14,8		1,3	4,8	2,9	2,7	4,0	4,2	2,6	5,3	5,9	4,9	4,7	5,3	4,9	4,2	4,3	4,4	5,3	5,5	4,8	5,8	6,3	7,1	9,3
Aphelocoma coerulescens	**9**	14,8	15,0	16,9	16,6	16,5	15,3	16,0	5,4		5,3	3,1	2,9	4,4	4,4	3,0	5,5	5,9	5,7	5,2	5,5	5,2	4,4	4,6	4,7	5,8	6,0	5,3	6,0	7,0	7,4	10,1
Calocitta formosa	**10**	14,0	14,8	16,1	15,8	14,9	16,5	16,8	16,3	17,3		5,0	5,0	3,5	6,6	5,2	7,3	7,4	7,9	6,9	7,0	7,1	6,9	7,0	6,4	7,3	7,8	7,3	8,0	8,0	8,2	11,2
Cyanocitta cristata	**11**	13,1	12,9	13,7	14,0	14,0	12,9	14,5	14,1	14,7	16,2		0,9	4,2	3,7	2,6	5,3	6,1	5,2	4,7	5,0	5,2	4,0	4,1	4,2	5,3	5,5	5,0	5,3	5,8	6,6	10,4
Cyanocitta stelleri	**12**	12,4	11,7	13,1	12,9	12,2	12,3	15,8	11,8	13,7	15,4	12,1		4,2	3,5	2,6	5,0	5,9	4,9	4,4	4,6	4,7	4,0	4,1	4,2	5,0	5,8	4,6	4,6	6,0	6,4	9,6
Cyanocorax chrysops	**13**	14,9	15,2	16,3	16,1	15,7	16,1	15,8	14,2	15,1	12,8	15,1	14,0		5,5	4,3	6,6	7,0	7,5	6,3	6,6	7,0	6,3	6,4	5,8	6,6	7,1	6,4	6,9	6,4	7,5	10,5
Cyanolyca viridicyana	**14**	13,1	12,6	14,8	13,9	13,7	14,8	16,9	15,3	15,9	18,4	14,8	14,0	17,3		4,3	5,7	6,0	5,3	5,0	5,4	5,8	4,6	4,7	4,6	4,9	5,4	5,2	5,9	6,6	7,3	10,3
Gymnorhinus cyanocephalus	**15**	14,5	14,1	14,6	14,9	14,5	14,2	15,4	13,2	13,7	16,5	12,5	14,3	14,0	15,7		5,2	6,0	4,8	5,0	4,9	4,8	4,3	4,4	4,8	5,2	5,9	5,7	6,1	5,7	5,8	9,2
Garrulus glandarius	**16**	13,0	13,5	14,3	15,1	14,6	14,2	15,1	15,7	17,1	15,5	14,2	15,5	18,0	15,6	15,7		2,1	4,9	4,7	5,0	5,2	4,0	3,9	3,7	5,3	6,0	4,8	5,3	6,0	6,9	9,3
Garrulus lidthi	**17**	15,4	15,5	16,3	16,2	15,6	14,8	17,2	17,5	18,1	20,0	18,6	16,7	20,4	18,9	17,8	14,7		6,0	5,3	5,9	6,3	4,6	4,4	4,6	5,9	5,9	4,9	5,7	6,6	6,8	10,0
Perisoreus canadensis	**18**	13,8	12,6	12,8	15,0	14,8	15,4	16,1	15,6	17,1	18,4	16,3	15,2	18,5	15,6	16,3	17,2	17,2		2,7	4,7	4,3	4,1	4,2	4,6	4,7	5,2	4,4	4,7	6,9	7,0	8,7
Perisoreus infaustus	**19**	13,1	14,7	14,8	15,7	15,4	14,5	17,5	16,4	17,5	16,5	16,7	15,7	17,5	16,3	17,6	14,8	19,3	14,4		4,9	4,8	3,6	3,7	3,6	4,9	4,9	3,7	4,7	7,1	6,8	9,2
Cyanopica cyanus cooki	**20**	13,4	13,8	15,4	14,3	15,7	14,8	16,8	16,2	17,5	19,1	17,1	15,8	19,1	16,5	15,2	17,1	19,7	16,9	16,3		0,8	3,7	3,9	4,2	5,5	5,8	5,5	5,8	6,8	7,1	9,1
Cyanopica cyanus ? (Ásia)	**21**	14,4	14,0	16,6	15,4	15,9	14,2	15,8	16,8	17,2	17,8	16,9	16,9	19,5	17,7	16,4	16,5	20,5	15,8	17,1	6,9		3,9	4,0	4,3	5,4	5,9	5,4	5,7	6,6	6,5	9,2
Pica hudsonia	**22**	12,1	14,3	15,0	14,7	13,2	13,1	13,7	14,6	14,6	17,6	17,2	15,8	16,5	16,1	16,0	15,8	15,4	14,6	15,1	15,0	14,1		0,3	2,9	4,4	4,4	4,0	4,4	6,1	6,3	9,5
Pica pica	**23**	12,0	14,6	16,0	14,4	13,8	13,5	13,7	15,2	14,7	18,3	17,2	16,2	16,8	16,7	15,3	16,6	15,7	14,4	15,5	15,1	14,0	3,1		3,3	4,6	4,6	4,3	4,6	6,0	6,4	9,3
Ptilostomus afer	**24**	13,0	13,1	14,4	14,2	14,4	11,3	13,8	15,0	16,7	17,2	15,1	14,2	17,3	16,3	14,9	15,0	16,2	15,1	14,5	14,3	13,9	13,3	12,8		4,7	5,7	4,0	4,4	6,1	7,5	8,9
Pyrrhocorax graculus	**25**	16,0	14,2	15,4	15,0	16,3	15,4	16,0	15,8	17,0	18,5	16,8	16,6	18,5	16,9	16,3	15,5	20,0	15,2	17,2	16,3	17,3	15,4	15,0	15,9		2,2	4,8	5,3	6,0	5,9	8,3
Pyrrhocorax pyrrhocorax	**26**	17,0	15,5	17,4	16,2	17,2	16,1	17,1	16,6	18,0	19,9	17,0	18,9	19,0	18,5	16,4	17,2	20,6	16,2	17,8	16,6	17,6	17,1	17,3	16,9	11,6		5,0	5,5	6,8	6,4	9,3
Urocissa erythrorhyncha	**27**	13,3	15,0	16,1	15,1	14,5	15,4	16,3	16,9	18,0	17,0	16,7	14,5	17,0	16,0	15,7	14,4	17,3	15,7	15,2	16,9	18,2	15,7	16,0	15,4	15,1	17,9		3,4	6,8	6,6	9,1
Cissa chinensis	**28**	14,1	14,2	14,4	14,1	15,1	13,9	15,0	16,8	17,9	17,6	16,9	16,5	16,5	17,5	18,5	17,5	18,4	15,1	15,8	16,2	15,0	14,7	14,7	14,7	15,8	18,4	13,9		6,8	6,6	9,1
Diphyllodes magnificus	**29**	15,8	16,0	17,2	17,4	16,8	16,8	17,9	16,0	17,5	18,2	17,4	17,2	17,9	17,0	16,3	17,8	18,1	16,3	17,8	18,0	18,3	15,9	16,4	16,0	16,6	17,8	15,9	16,4		4,9	7,5
Manucodia keraudrenii	**30**	16,4	17,1	18,0	18,5	18,3	16,8	18,6	18,2	18,8	19,1	18,4	20,6	19,1	20,4	16,8	19,0	19,9	19,7	20,1	19,4	17,7	18,9	19,6	18,7	20,0	17,7	19,8	17,8	15,1		8,7
Ailuroedus melanotus	**31**	19,8	20,0	20,2	21,3	19,0	20,0	22,6	21,2	23,0	21,6	21,5	20,0	23,9	22,3	21,8	21,0	23,1	19,7	22,0	22,5	21,3	20,9	20,3	19,5	20,9	22,8	20,3	19,6	18,9	21,3	

Legenda. Acima da diagonal encontram-se os valores da distância de Tamura-Nei calculados apenas com base nas transversões entre as diferentes espécies. Abaixo da diagonal encontram-se os valores da distância de Tamura-Nei calculados com base nas transições e transversões entre as diferentes espécies.

A hipótese nula, segundo a qual estas sequências evoluem de um modo neutral, não foi rejeitada , quando se aplicaram os testes de neutralidade *D* de Tajima (P > 0,10), *D** de Fu & Li (P > 0,10) e *F** de Fu & Li (P > 0,10; ver Nei & Kumar, 2000).

Na figura 3.2 apresentam-se os resultados da reconstituição da filogenia dos *Corvidae*, com o método de agrupamento NJ. Ambas as árvores foram elaboradas a partir da matriz de distâncias de Tamura-Nei (1993), calculada com base no número de transversões (A) ou no número de transversões e transições (B).

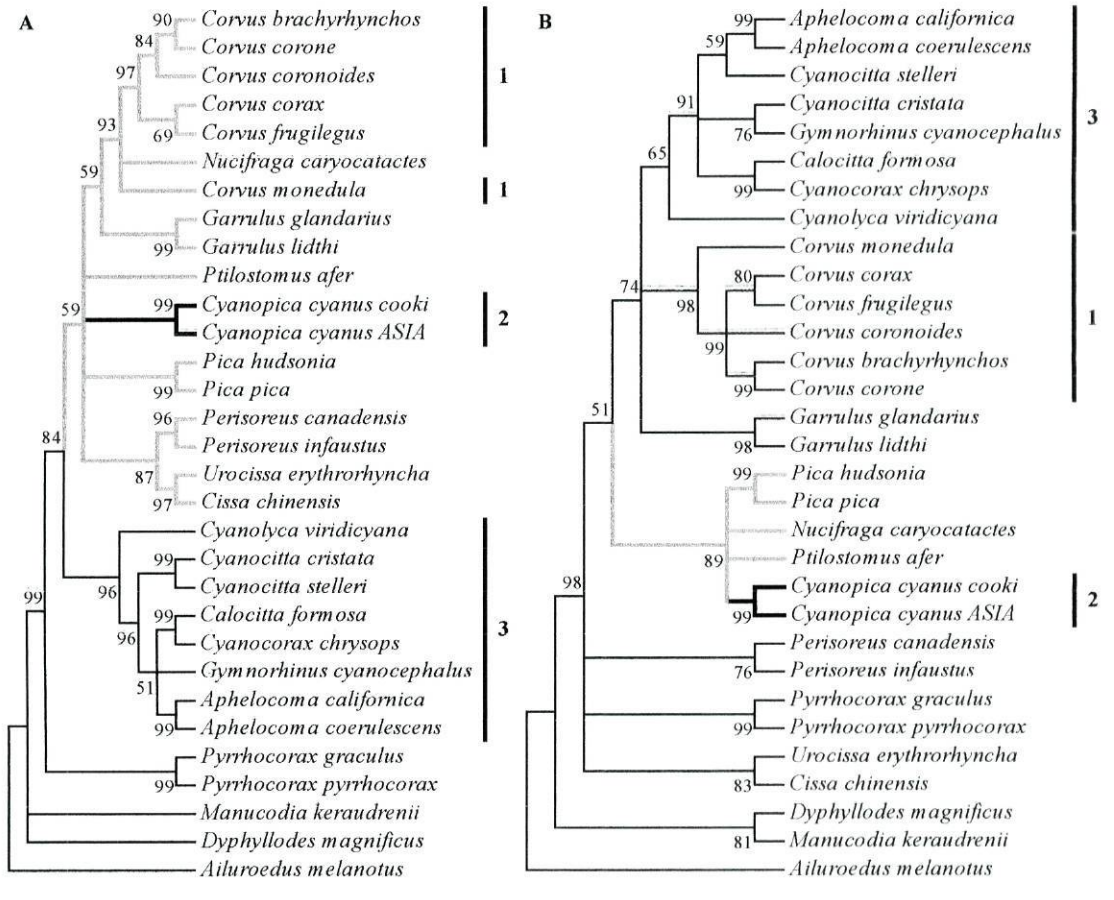


Figura 3.2. A: Árvore filogenética NJ calculada com base no número de transversões entre haplótipos. **B**: Árvore filogenética NJ calculada com base no número de transições e transversões entre haplótipos. Ambas as árvores foram condensadas para os valores de suporte do IBT inferiores a 50%. **1**: Espécies pertencentes ao género *Corvus*; **2**: Pega-azul (*Cyanopica cyanus*); **3**: Gaios do continente Americano.

Nesta figura, é possível verificar que os corvídeos formam um grupo monofilético, bem suportado estatisticamente, que se separa dos *taxa* usados como *outgroups* na primeira ramificação de ambas as árvores.

Em A, a segunda dicotomia separa as gralhas de bico curvo, pertencentes ao género *Pyrrhocorax*, de todas as outras espécies, mas na árvore B este género está incluído numa politomia, onde se inserem mais três ramos: um ramo formado pelo género *Perisoreus*, um ramo constituído pelos géneros *Cissa* e *Urocissa* e um ramo que conduz a todos os restantes *Corvidae*.

A terceira dicotomia da árvore A separa dos restantes corvídeos um grupo monofilético (grupo 3), formado pelos géneros de "gaios" endémicos do continente americano (com um valor de IBT de 96%). Este agrupamento é igualmente monofilético na árvore B mas o seu suporte estatístico é reduzido (65%) e tem uma posição distante da origem do ramo dos corvídeos, na mesma politomia de onde emergem os ramos formados pelos géneros *Corvus* e *Garrulus*. Em ambas as árvores existe uma ramificação basal que separa o género *Cyanolyca* dos restantes mas a restante topologia do ramo dos "gaios" americanos não é consensual nas árvores A e B. Assim, na árvore A, a segunda ramificação deste grupo separa as espécies do género *Cyanocitta* das restantes mas em B, este género é polifilético devido à inclusão das espécies *Cyanocitta cristata* e *Cyanocitta stelleri* em ramos diferentes de uma politomia. A associação entre os géneros *Calocitta* e *Cyanocorax* é bem suportada estatísticamente em ambas as árvores existe .

Na árvore NJ elaborada com base nas transversões, existe uma politomia central (60% de suporte do IBT) composta por géneros com origem no velho mundo, embora algumas espécies dos géneros *Pica*, *Perisoreus* e *Corvus*, existam hoje em dia na América. A Pega-azul (grupo 2) insere-se neste grupo de corvídeos do velho mundo, mas a sua posição no interior do grupo é incerta, pois o suporte estatístico (IBT) é reduzido. Na árvore B a Pega-azul insere-se num agrupamento bem suportado estatísticamente (valor de IBT de 89%) que inclui igualmente os géneros *Pica*, *Ptilostomus* e *Nucifraga*. Este grupo tem uma posição basal relativamente ao ramo composto pelos "gaios" americanos (3) e pelos géneros *Corvus* (1) e *Garrulus*.

A monofilia de todos os géneros representados por mais de uma espécie tem um suporte estatístico superior a 90% em ambas as árvores. As únicas excepções são o género *Cyanocitta* (já anteriormente referido) e o género *Corvus* (grupo 1), que é parafilético na árvore A, uma vez que inclui o Quebra-nozes (*Nucifraga caryocatactes*) no seu interior.

Nas figura 3.3 apresentam-se as árvores realizadas com o método de agrupamento ME. Ambas as árvores foram elaboradas a partir da matriz de distâncias de Tamura-Nei (1993), calculada com base no número de transversões (A) ou de transversões e transições (B).

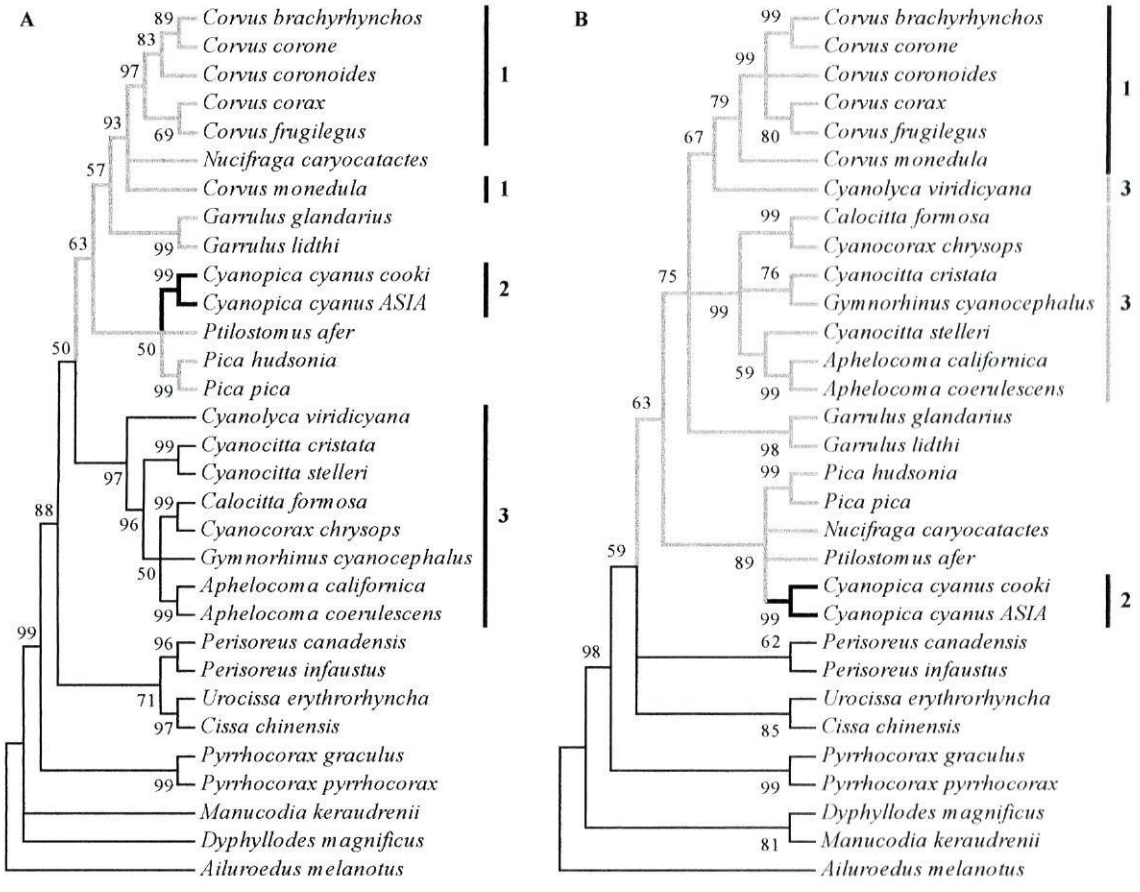


Figura 3.3. Árvores filogenéticas ME, condensadas para os valores de suporte do IBT inferiores a 50%. **A**: Árvore elaborada com base no número de transversões entre haplótipos. **B**: Árvore elaborada com base no número de transversões e transições entre haplótipos. **1**: Espécies pertencentes ao género *Corvus*; **2**: Pega-azul (*Cyanopica cyanus*); **3**: Gaios do continente Americano.

As árvores apresentadas na figura 3.3 são concordantes quanto à monofilia dos *Corvidae*, existindo em ambas um elevado suporte estatístico para a ramificação que separa os corvídeos dos *taxa* usados como *outgroups*.

Nas árvore A e B, o género *Pyrrhocorax* tem uma posição basal relativamente aos restantes corvídeos. No interior do agrupamento dos corvídeos, a ramificação seguinte separa, em A, um grupo formado pelos géneros *Perisoreus*, *Cissa* e *Urocissa* (valor de IBT de 71%) dos restantes géneros. Na árvore B, esta ramificação é uma politomia que não permite verificar qual a relação entre estes três géneros .

A Pega-azul é incluída num grupo do qual fazem parte os géneros *Pica*, *Ptilostomus* e *Nucifraga* (este último só na árvore B). Em A, este grupo insere-se num ramo do qual também fazem parte os grupos formados pelos géneros *Garrulus* e *Corvus*. Em B, o grupo onde se inclui

o género *Cyanopica* faz parte de uma bifurcação que no outro ramo inclui os grupos formados pelo género *Garrulus* e *Corvus* e os "gaios" americanos.

O conjunto dos gaios americanos apresenta algumas inconsistências entre as árvores A e B. Nesta última árvore, o género *Cyanolyca* é colocado no mesmo ramo que o género *Corvus*, enquanto na árvore elaborada com base nas transversões entre nucleotídeos este género tem uma posição basal no grupo dos "gaios" americanos. Na árvore A, o ramo formado pelo género *Cyanocitta* é monofilético e recebe um elevado suporte estatístico mas em B, este género é polifilético, uma vez que as duas espécies que o constituem se inserem em ramos diferentes.

O género *Corvus* não é monofilético na árvore A devido à inclusão no seu seio do Quebra-nozes (*Nucifraga caryocatactes*). Na árvore B, o grupo 1 apresenta-se como monofilético e a sua topologia interna é muito próxima da exibida por este grupo na árvore [a]

Na figura 3.4 apresenta-se a árvore filogenética de máxima parsimónia.

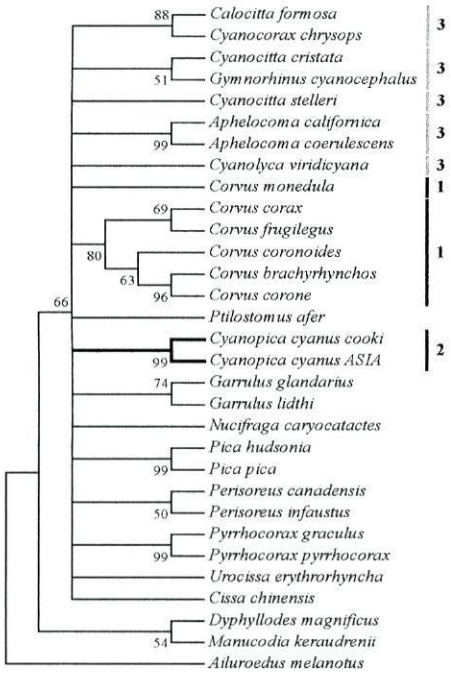


Figura 3.4.

Árvore filogenética de máxima parsimónia calculada com o algoritmo *close-neighbor-interchange* (CNI) implementado no programa MEGA, versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Os ramos desta árvore filogenética que têm um suporte estatístico (*bootstrap*) inferior a 50% foram colapsados numa politomia.

1: Espécies pertencentes ao género *Corvus*;

2: Pega-azul (*Cyanopica cyanus*);

3: Espécies pertencentes ao grupo dos "gaios" endémicos do continente Americano.

Na figura é patente o reduzido suporte estatístico de quase todos os ramos pertencentes aos *Corvidae*. A árvore apresenta uma politomia central de onde se ramificam os ramos de todos os géneros de corvídeos. A árvore obtida pelo método UPGMA tem uma topologia quase idêntica à árvore MP pelo que não é aqui apresentada.

3.3 A Origem das Populações Ibéricas de Pega-azul

Na tabela 3.2 resume-se a informação relativa às substituições existentes entre as sequências de Pega-azul (ibéricas e asiáticas) e das espécies incluídas como *outgroups* (*Pica pica, Pica hudsonia, Corvus frugilegus* e *Manucodia keraudrenii*).

Tabela 3.2. Número de transições (abaixo da diagonal) e de transversões (acima da diagonal) entre haplótipos de 434 bp de comprimento, de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*) e das espécies utilizadas como *outgroups*. Os valores entre parêntesis representam a percentagem de transições relativamente ao total das substituições detectadas.

		Espécie													
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
C. cyanus swinhoei	**1**		0	0	0	3	4	3	3	4	5	8	9	17	21
C. cyanus kansuensis	**2**	0 (0)		0	0	3	4	3	3	4	5	8	9	17	21
C. cyanus pallescens	**3**	6 (100)	6 (100)		0	3	4	3	3	4	5	8	9	17	21
C. cyanus **Ásia**	**4**	0 (0)	0 (0)	6 (100)		3	4	3	3	4	5	8	9	17	21
C. cyanus cooki **L**	**5**	16 (84,2)	16 (84,2)	16 (84,2)	16 (84,2)		1	0	0	1	2	11	12	20	24
C. cyanus cooki **ID**	**6**	17 (81,0)	17 (81,0)	17 (81,0)	17 (81,0)	1 (50,0)		1	1	2	3	12	13	21	25
C. cyanus cooki **AZ**	**7**	17 (85,0)	17 (85,0)	17 (85,0)	17 (85,0)	1 (100)	2 (66,7)		0	1	2	11	12	20	24
C. cyanus cooki **P**	**8**	16 (84,2)	16 (84,2)	16 (84,2)	16 (84,2)	0 (0)	1 (50,0)	1 (100)		1	2	11	12	20	24
C. cyanus cooki **A1**	**9**	16 (80,0)	16 (80,0)	16 (80,0)	16 (80,0)	0 (0)	1 (33,3)	1 (50,0)	0 (0)		1	12	13	21	25
C. cyanus cooki **A2**	**10**	16 (76,2)	16 (76,2)	16 (76,2)	16 (76,2)	0 (0)	1 (25,0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)		13	14	22	26
Pica pica	**11**	28 (77,8)	28 (77,8)	29 (78,4)	28 (77,8)	30 (73,2)	29 (70,7)	31 (73,8)	30 (73,2)	30 (71,4)	30 (69,8)		1	11	19
Pica hudsonia	**12**	27 (75,0)	27 (75,0)	26 (74,3)	27 (75,0)	28 (70,0)	29 (69,0)	29 (70,7)	28 (70,0)	28 (68,3)	28 (66,7)	8 (88,9)		12	20
Corvus frugilegus	**13**	27 (61,4)	27 (61,4)	26 (60,5)	27 (61,4)	25 (55,6)	26 (55,3)	26 (56,5)	25 (55,6)	25 (54,3)	25 (53,2)	25 (54,3)	32 (72,7)		24
Manucodia keraudrenii	**14**	30 (58,8)	30 (58,8)	32 (60,4)	30 (58,8)	35 (59,3)	34 (57,6)	36 (60,6)	35 (59,3)	35 (58,3)	35 (57,4)	35 (64,8)	36 (64,3)	37 (60,7)	

Legenda. Ásia: amostra de Pega-azul asiática para a qual não é conhecida a subespécie; **L**: Lagoaça; **ID**: Idanha-a-Velha; **AZ**: Alcafozes; **P**: Pinhel; **A1** e **A2**: Alares.

A comparação entre as sequências de Pega-azul de origem Ibérica revelou a existência de um reduzido número de diferenças nucleotídicas (entre zero e quatro diferenças), existindo mesmo sequências idênticas (sequências P e L). As diferenças detectadas devem-se a transversões e transições entre nucleotídeos, sendo que as primeiras são um pouco mais numerosas. Entre as sequências de Pega-azul de origem asiática as únicas diferenças detectadas foram transições entre nucleotídeos. Estas diferenças foram encontradas apenas nas comparações entre a sequência da subespécie *pallescens* e as restantes, uma vez que estas últimas são idênticas entre si.

A comparação entre as sequências ibéricas e asiáticas revela a existência de um maior número de transições do que transversões. As transições representam 76,2 a 85% do total de

substituições detectadas, enquanto as transversões representam apenas 15,8 a 23,8% do total de substituições entre duas sequências.

A hipótese nula, segundo a qual estas sequências evoluem de um modo neutral, não foi rejeitada , quando se aplicaram os testes de neutralidade *D* de Tajima (P > 0,10), *D** de Fu & Li (P > 0,10) e *F** de Fu & Li (P > 0,10; ver Nei & Kumar, 2000).

Na tabela 3.3 apresentam-se as percentagens de divergência ao nível nucleotídico, existentes entre os diferentes *taxa* usados na reconstrução da filogenia das subespécies de Pega-azul. Os valores apresentados foram calculados seguindo a metodologia proposta por Tamura & Nei (1993) e usando a totalidade das substituições nucleotídicas. Os valores apresentados nesta tabela foram usados para construir as árvores filogenéticas apresentadas na figura 3.4.

Tabela 3.3. Percentagem de diferenças entre as sequências de pegas-azuis ibéricas e asiáticas e os *outgroups*, calculada com o método de Tamura-Nei (1993), com base em todas as substituições nucleotídicas de um fragmento do *cyt b* com 343 bp.

		Espécie												
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
Cyanopica cyanus swinhoei	**1**													
Cyanopica cyanus kansuensis	**2**	0,0												
Cyanopica cyanus pallescens	**3**	1,8	1,8											
Cyanopica cyanus **Ásia**	**4**	0,0	0,0	1,8										
Cyanopica cyanus cooki **L**	**5**	5,9	5,9	5,9	5,9									
Cyanopica cyanus cooki **ID**	**6**	6,5	6,5	6,5	6,5	0,6								
Cyanopica cyanus cooki **AZ**	**7**	6,2	6,2	6,2	6,2	0,3	0,9							
Cyanopica cyanus cooki **P**	**8**	5,9	5,9	5,9	5,9	0,0	0,6	0,3						
Cyanopica cyanus cooki **A1**	**9**	6,2	6,2	6,2	6,2	0,3	0,9	0,6	0,3					
Cyanopica cyanus cooki **A2**	**10**	6,5	6,5	6,5	6,5	0,6	1,2	0,9	0,6	0,3				
Pica pica	**11**	11,7	11,7	12,0	11,7	13,5	13,4	13,9	13,5	13,8	14,2			
Pica hudsonia	**12**	11,6	11,6	11,3	11,6	13,1	13,8	13,5	13,1	13,4	13,8	2,7		
Corvus frugilegus	**13**	14,3	14,3	13,9	14,3	14,6	15,3	15,0	14,6	14,9	15,3	15,4	14,6	
Manucodia keraudrenii	**14**	17,0	17,0	17,8	17,0	20,2	20,1	20,6	20,2	20,6	20,9	18,4	19,2	21,0

Legenda. Ásia: ave asiática da qual se desconhece a identidade subespecífica; **L**: Lagoaça; **ID**: Idanha-a-Velha; **AZ**: Alcafozes; **A1**, **A2**: Alares.

Na tabela 3.4, apresentam-se os valores médios para a distância de Tamura-Nei (incluindo as transições e as transversões) entre os grupos formados por: 1) as sequências de Pega-azul de origem asiática, 2) as sequências de Pega-azul de origem ibérica, 3) as sequências do género *Pica*, 4) a sequência da Gralha-calva (*Corvus frugilegus*) e 5) a sequência ave-do-paraíso da espécie *Manucodia keraudrenii*.

Tabela 3.4. Percentagem de diferenças entre grupos de sequências calculada com o método de Tamura-Nei (1993), com base em todas as substituições nucleotídicas de um fragmento do *cyt b* com 343 bp de comprimento.

		Espécie				
		1	**2**	**3**	**4**	**5**
Cyanopica cyanus Asiáticas	**1**		1,3	1,9	2,1	2,5
Cyanopica cyanus Ibéricas	**2**	6,2		2,0	2,1	2,7
Pica pica + *Pica hudsonia*	**3**	11,7	13,6		2,2	2,5
Corvus frugilegus	**4**	14,2	15,0	15,0		2,8
Ave-do-paraíso (*Manucodia keraudrenii*)	**5**	17,2	20,4	18,8	21,0	

Legenda. Os valores da distância de Tamura-Nei apresentam-se abaixo da diagonal. Acima da diagonal apresentam-se os valores do erro padrão associado a cada uma das estimativas da distância genética.

Na figura 3.5 apresentam-se os resultados da reconstituição da filogenia da Pega-azul, com os métodos de agrupamento NJ e MP.

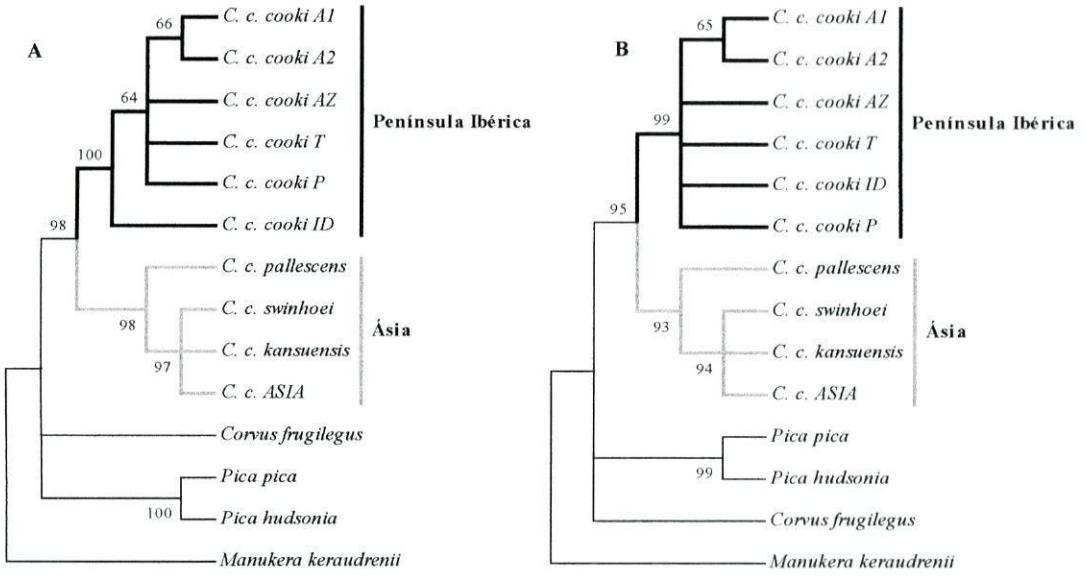


Figura 3.5. A: Árvore filogenética NJ, condensada para os valores de suporte de *bootstrap* inferiores a 50%. Os números junto aos nós da árvore representam os valores de *bootstrap*. **B**: Árvore filogenética MP de consenso de *bootstrap*. O valor de *bootstrap* de cada ramo é apresentado junto à sua base. Em ambas as árvores, as bifurcações suportadas por um valor de *bootstrap* inferior a 50% foram transformados numa politomia.

Em ambas as árvores, a monofilia do ramo que engloba as pegas-azuis tem um suporte estatístico muito elevado. Adicionalmente, existe uma clara separação entre o ramo que contém as subespécies asiáticas e o ramo onde se inserem as aves ibéricas, com um suporte estatístico muito elevado. Na árvore NJ existem ramificações no interior do ramo das pegas-azuis ibéricas, mas o seu suporte estatístico é reduzido. A primeira destas ramificações separa a amostra de

Idanha-a-Velha das restantes e a segunda agrupa as amostras dos Alares. Na árvore MP apenas se observa a última ramificação, a qual é igualmente pouco suportada pelos valores de bootstrap. Em ambas as árvores, a subespécie *C. c. pallescens* separa-se das restantes amostras asiáticas numa ramificação bem suportada estatisticamente. A posição relativa dos géneros *Cyanopica*, *Pica* e *Corvus*, não foi determinada com segurança em nenhuma. As árvores filogenéticas construídas com os métodos de agrupamento ME e UPGMA apresentam topologias idênticas às das árvores NJ e MP, pelo que não são aqui apresentadas.

3.4 Filogeografia da Pega-azul na Península Ibérica

Na figura 3.6 apresenta-se a árvore haplotípica construída com 30 haplótipos de 411 bp (anexo VI), que abrangem a porção terminal do *ND5*, o espaçador intergénico e parte do *cyt b*.

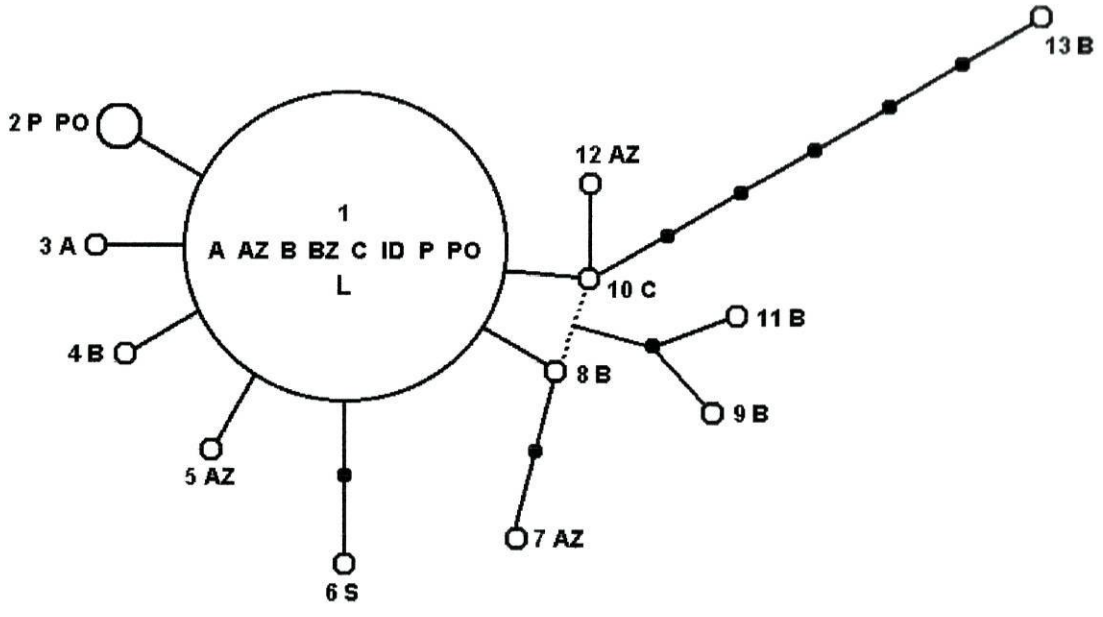


Figura 3.6. Rede haplotípica que representa a genealogia de 30 haplótipos de um fragmento de 411 bp do mtDNA de *Cyanopica cyanus cooki*. Os círculos brancos representam haplótipos existentes na amostra enquanto os círculos pequenos, de cor preta, que dividem as linhas representam haplótipos que não foram detectados. O diâmetro de um círculo é proporcional ao número de indivíduos que apresentam esse haplótipo. Cada linha entre dois círculos simboliza uma mutação. A: Alares; AZ: Alcafozes; B: Barrancos; BZ: Badajoz; C: Congida; ID: Idanha-a-Velha; P: Pinhel; PO: Pocinho; L: Lagoaça; S: Sevilleja De La Jara

A rede haplotípica da figura 3.6 exibe o padrão característico de uma genealogia em estrela. De entre os 13 haplótipos detectados, o haplótipo 1 é o mais frequente (56,7%) e está presente em todas as populações amostradas à excepção de Sevilleja De La Jara. O haplótipo 2 é

o segundo haplótipo mais frequente (6,7%), mas só foi detectado em duas amostras, recolhidas em Pinhel e no Pocinho. Os restantes 11 haplótipos foram detectados em apenas uma amostra cada. A maior parte dos haplótipos diferem do haplótipo 1 em apenas uma ou duas mutações. A população de Barrancos destaca-se das restantes por *i)* apresentar o maior número de haplótipos diferentes (6) e *i)* por apresentar o haplótipo mais divergente de todos (o haplótipo 13).

Na figura 3.7 apresentam-se os resultados da análise *Pairwise Mismatch Distribution*. (PMD) As barras verticais representam o número vezes em que uma diferença de x nucleotídeos (entre zero e onze) foi detectada na comparação de um par de sequências.

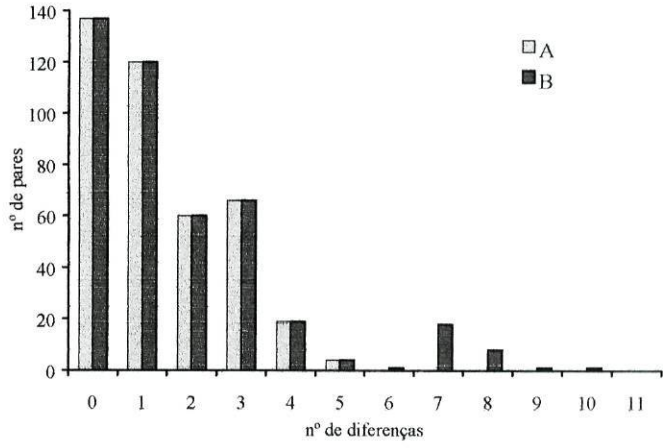


Figura 3.7. Distribuição das diferenças nucleotídicas de um fragmento de 411 bp, entre pares de indivíduos pertencentes à subespécie Ibérica *Cyanopica cyanus cooki*. **A**: análise realizada sem o haplótipo 13. **B**: análise realizada com o haplótipo 13.

O gráfico da figura 3.7 apresenta duas análises PMD realizadas com um conjunto ligeiramente diferente de dados. O fragmento de DNA analisado é o mesmo que serviu de base à elaboração da figura 3.6. A cinzento claro apresentam-se os resultados da análise de PMD realizada com base num conjunto de sequências de Pega-azul que não incluem o haplótipo 13, enquanto os resultados apresentados a cinzento escuro incluem todos os haplótipos apresentados na figura 3.6.

Na parte inicial do gráfico, ambas as distribuições são idênticas. Só na análise que inclui o haplótipo 13 é que foi detectado um número igual, ou superior, a seis diferenças entre pares de sequências (até ao máximo de dez diferenças).

4. Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho vêm preencher uma lacuna existente no estudo genético da família *Corvidae*. A sequenciação de parte do mtDNA do género *Cyanopica* permite, pela primeira vez, estudar a posição filogenética da Pega-azul no seio da família *Corvidae*, enquanto o estudo comparativo de sequências de Pega-azul poderá contribuir para o esclarecimento da problemática da origem das populações ibéricas desta espécie.

4.1 Sequenciação do mtDNA de Pega-Azul

Um dos principais problemas que pode surgir na análise molecular do mtDNA deve-se à existência de zonas do genoma nuclear (nDNA) homólogas a zonas do mtDNA. Na génese destas regiões deverão estar fenómenos de transferência de material genético entre as mitocôndrias e o núcleo, seguidos da sua inserção no nDNA. A presença de regiões do nDNA homólogas ao mtDNA foi já confirmada em diversos grupos de animais, como: os ouriços-do-mar, gafanhotos, ratazanas (*Rattus* sp.), gatos domésticos (*Felis domesticus*), Aves e Primatas (ver revisão em Quin, 1997). A espécie humana é o único Vertebrado para a qual existem dados sobre a abundância de inserções nucleares de mtDNA, tendo-se descoberto a existência de centenas de cópias de sequências mitocondriais dispersas no genoma nuclear. Nas Aves, foi demonstrada a existência de inserções nucleares de regiões homólogas ao *cyt b* em várias espécies de "tapaculos" (*Scytalopus* sp.) e inserções nucleares da região de controlo em patos mergulhadores (*Aythyinae*; Quin, 1997).

A existência de inserções nucleares de mtDNA é particularmente problemática em estudos baseados na técnica de PCR. As extracções de DNA realizadas a partir de amostras de sangue de Aves contêm, geralmente, uma grande quantidade de DNA de origem nuclear, pois os seus eritrócitos são nucleados. Por este motivo, a amplificação, por PCR, de regiões do mtDNA a partir de DNA extraído de amostras de sangue pode favorecer a amplificação de uma inserção nuclear de mtDNA, em vez do fragmento desejado.

Para resolver o problema colocado pela existência de inserções nucleares de material genético de origem mitocondrial existem duas estratégias (complementares) possíveis:

i) Desenvolver técnicas laboratoriais que evitem a amplificação destas regiões. São exemplos destas técnicas a utilização de extractos purificados de mtDNA nas reacções de PCR; a extracção de DNA a partir de tecidos (como o fígado, o coração, o músculo) cujas células tenham um maior número de mitocôndrias; ou, previamente à amplificação da

região pretendida do mtDNA, proceder a uma amplificação integral do genoma mitocondrial (Quin, 1997);

ii) Detectar as sequências de regiões do nDNA homólogas ao mtDNA para que possam ser excluídas da análise dos dados. Estas regiões podem ser detectadas pela análise de zonas de sobreposição entre regiões amplificadas e sequenciadas com diferentes *primers*; pela existência de codões de paragem de transcrição inseridos no meio de sequências codificantes; pela existência de delecções ou inserções de bases que alterem a ordem de transcrição; e pela comparação das sequências obtidas com sequências da mesma espécie (ou de espécies aparentadas) já publicadas.

A primeira destas abordagens não pôde ser realizada uma vez que as técnicas laboratoriais necessárias não se encontram disponíveis no laboratório onde foi realizado o trabalho molecular e, a opção de não sacrificar os animais capturados, assumida no início do trabalho, impossibilitou o recurso a outras fontes de DNA para além do sangue.

Por estes motivos, apenas foi possível desenvolver a segunda abordagem para detectar existência de inserções nucleares de mtDNA. Nas sequências de mtDNA de Pega-azul não foram encontradas inserções e (ou) delecções de nucleotídeos que modificassem a transcrição da informação contida no DNA nem foram detectados codões de paragem da transcrição em localizações anómalas. Os alinhamentos das sequências de mtDNA de Pega-azul e de outras espécies de Aves (principalmente corvídeos) revelaram uma grande concordância, não só na sua constituição nucleotídica mas também na sequência traduzida para aminoácidos do gene do citocromo b. Adicionalmente, a análise das sequências de mtDNA das regiões de sobreposição entre os fragmentos A e B (amplificadas com dois pares de *primers* diferentes) não revelou qualquer discordância.

Pelos motivos acima expostos, considera-se que as sequências obtidas neste trabalho são de origem mitocondrial e não resultam da amplificação de uma inserção nuclear de mtDNA.

4.2 Filogenia dos *Corvidae*

As árvores filogenéticas elaboradas no presente trabalho apresentam diferentes graus de resolução das relações evolutivas entre as espécies analisadas. Pode avaliar-se este aspecto comparando o padrão de ramificação de cada árvore e o suporte estatístico de cada ramificação.

As árvores com um padrão de ramificação mais elaborado e um melhor suporte estatístico, *i.e.*, com um menor número de politomias e valores de *bootstrap* ou IBT mais elevados, têm um maior poder de resolução das relações filogenéticas entre os *taxa*. Assim, pela análise das árvores apresentadas nas figuras 3.2 a 3.4 (inclusive) verifica-se que os métodos de agrupamento NJ e ME permitem construir árvores filogenéticas com maior poder de resolução do que o método MP (e UPGMA).

O estudo comparativo das árvores filogenéticas das figuras 3.2 a 3.4 permite elucidar algumas questões acerca da filogenia dos corvídeos. Num trabalho publicado na década de 90, Cibois & Pasquet (1999), analisaram a mesma região do *cyt b* num número mais reduzido de *taxa*, tendo obtido resultados muito semelhantes aos do presente trabalho. No entanto, o estudo da filogenia desta família deve considerar-se como provisório, uma vez que só foram estudadas as relações entre 16 dos 25 géneros de *Corvidae* existentes (todos aqueles para os quais as sequências de *cyt b* estão disponíveis no *GenBank*). A adição de novos *taxa*, representando géneros ainda não estudados ao nível do *cyt b*, permitirá, provavelmente, construir um esquema das relações filogenéticas entre os *Corvidae* mais próximo da realidade.

4.2.1 O Género *Corvus*

De acordo com os resultados obtidos por Cibois & Pasquet (1999), as espécies do género *Corvus* formam um grupo monofilético, com um suporte estatístico que chega a ser elevado (ver figuras 3.2, 3.3 e 3.4). Para além das espécies deste género analisadas pelos autores supra citados, também foram analisadas neste trabalho sequências das seguintes espécies: *Corvus brachyrhynchos*, *Corvus coronoides* e *Corvus frugilegus*. Com a inclusão destas espécies, foi possível revelar alguns detalhes da estrutura interna do género *Corvus* que não eram aparentes no trabalho de Cibois & Pasquet (1999).

O género *Corvus* é tradicionalmente dividido em dois subgéneros: *Corvus* e *Coleus* (Madge & Burn, 1994). As árvores filogenéticas apresentadas neste trabalho revelam a existência de dois ramos distintos no interior do subgénero *Corvus*. O primeiro ramo é formado pelo Corvo (*Corvus corax*) e a Gralha-calva (*Corvus frugilegus*), enquanto o segundo ramo é formado pela Gralha-preta (*Corvus corone*) e as espécies *Corvus brachyrhynchos* e *Corvus coronoides* (esta última com um menor grau de confiança). O suporte estatístico destes dois ramos não é muito elevado, mas o facto de surgirem em quase todas as árvores filogenéticas reforça a confiança na veracidade deste resultado.

A Gralha-de-nuca-cinzenta e a Gralha-dáurica[1] (*Corvus dauuricus*) são as únicas espécies do subgénero *Coleus* (Madge & Burn, 1994). Em todas as árvores filogenéticas, a Gralha-de-nuca-cinzenta ocupa uma posição basal relativamente ao subgénero *Corvus*, estando bastante diferenciada das espécies que o compõem. Este dado é concordante com a análise de máxima verosimilhança apresentada por Cibois & Pasquet (1999) e constitui um forte indício quanto à existência de uma divisão interna no género *Corvus*. No entanto, a ausência de dados sobre a Gralha-dáurica não permite confirmar a monofilia de cada um dos subgéneros, embora os resultados obtidos sejam congruentes com esta hipótese.

A parafilia do género *Corvus* foi detectada nas árvores das figuras 3.2 A e 3.3 A (ambas calculadas com base nas transversões). A razão desta parafilia reside na inclusão do Quebra-nozes (*Nucifraga caryocatactes*) no interior do ramo formado pelas espécies do género *Corvus*. A proximidade entre os géneros *Nucifraga* e *Corvus* já tinha sido proposta, embora com pouco suporte, por Sibley & Ahlquist (1990), num trabalho baseado na hibridação de DNA, e tinha sido detectada por Cibois & Pasquet (1999) numa análise de máxima parsimónia pouco suportada estatisticamente. Esta situação poderá dever-se: *i)* a um artefacto na reconstrução filogenética ou *ii)* a incorrecções na classificação "tradicional" dos géneros *Corvus* e (ou) *Nucifraga*.

Nas árvores filogenéticas 3.2 A e 3.3 A, o ramo do Quebra-nozes insere-se numa politomia que contém dois ramos adicionais: um formado apenas pela Gralha-de-nuca-cinzenta (*Corvus monedula*) e outro do qual fazem parte todas as outras espécies do género *Corvus* (corvos e gralhas). A ordem de ramificação deste grupo foi transformada numa politomia por ter um suporte estatístico muito fraco, o que significa que o ramo do género *Nucifraga* poderá, na verdade, ser externo ao ramo do género *Corvus*, eliminando-se, assim, a parafilia deste último. A sequenciação do gene do *cyt b* das outras espécies do género *Nucifraga* - *N. (caryocatactes) multipunctata* e *N. columbiana* (Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998) - e a sua inclusão nesta análise, poderá ajudar a definir melhor a posição dos quebra-nozes relativamente aos restantes corvídeos.

Este aspecto é ainda reforçado pelo facto de, nas análises em que se consideram todos os tipos de substituições nucleotídicas (figuras 3.2 B e 3.3 B), não existir parafilia no género *Corvus*. Nestas árvores, o Quebra-nozes insere-se num grupo formado pelos géneros *Pica*, *Cyanopica* e *Ptilostomus*, o qual está bastante afastado do grupo formado pelo género *Corvus*. Consequentemente, é possível que a posição do quebra-nozes esteja afectada por um artefacto

[1] Espécie não incluída neste trabalho e para a qual não existem sequências de DNA publicadas.

da reconstrução filogenética que poderá ter origem, ou numa convergência mutacional entre as transversões existentes nas sequências de *Nucifraga* e *Corvus*, ou numa saturação das transições na terceira posição do codão, que aproxima as sequências de *Pica*, *Cyanopica*, *Ptilostomus* e *Nucifraga*.

Existe uma forte diferenciação morfológica e etológica entre os quebra-nozes[2] e as espécies do género *Corvus*, o que poderá constituir um indício adicional contra a sua inclusão no género *Corvus*. No entanto, não se pode subestimar o importante papel desempenhado pela especialização ecológica na diferenciação morfológica entre espécies aparentadas. Assim, até que estejam disponíveis novos dados, não é possível excluir a existência de uma estreita relação entre os géneros *Corvus* e *Nucifraga*. A diferenciação entre os subgéneros *Corvus* e *Coleus* poderá, também, contribuir para explicar a parafilia do género *Corvus*, se for superior à diferenciação entre outros géneros de *Corvidae* e o género *Corvus*. Assumindo esta hipótese, a parafilia do género *Corvus* seria causada, não pela posição do género *Nucifraga*, mas sim pela inclusão da Gralha-de-nuca-cinzenta no género *Corvus*.

4.2.2 Os Gaios Endémicos do Continente Americano

A monofilia do grupo formado pelas espécies de gaios pertencentes aos géneros endémicos do continente Americano (*Gymnorhinus*, *Calocitta*, *Cyanocitta*, *Aphelocoma*, *Cyanocorax* e *Cyanolyca*) recebeu um elevado suporte nas árvores ME e NJ. Os dados aqui apresentados concordam, no geral, com os resultados de Saunders & Edwards (2000) e De Los Monteros & Cracraft (1997). A única excepção foi a árvore ME da figura 3.3 B, na qual o género *Cyanolyca* foi incluído num ramo diferente, mas com reduzido suporte estatístico (com um valor de *bootstrap* de 67%). Nas outras árvores filogenéticas, este género está diferenciado dos restantes e ocupa uma posição basal no agrupamento dos gaios americanos, concordante com os resultados dos autores acima citados.

O género *Cyanocitta* surge como polifilético nas árvores das figuras 3.2 B e 3.3 B. No entanto, a monofilia deste género é suportada tanto pela semelhança morfológica entre as duas espécies que o constituem (*Cyanocitta cristata* e *Cyanocitta stelleri*) como pela semelhança molecular, ao nível do *cyt b* (De Los Monteros & Cracraft, 1997) e da região de controlo do

[2] As três espécies do género *Nucifraga* têm todas a cauda curta, asas largas e um bico comprido e pontiagudo. São aves típicas de florestas de coníferas de regiões montanhosas ou boreais e têm uma dieta especializada, composta por sementes de coníferas, que abrem com o auxílio do bico (que apresenta uma crista na parte interna da mandíbula inferior que permite à ave abrir o invólucro duro de algumas sementes com relativa facilidade). Nos anos em que a produção de sementes de coníferas é baixa, muitas aves são forçadas a deslocar-se para fora das regiões que habitam (Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998).

mtDNA (Saunders & Edwards, 2000), pelo que é provável que exista uma explicação alternativa para a sua aparente polifilia. As árvores construídas a partir de uma matriz de distâncias calculada com base nas transversões entre nucleotídeos (figuras 3.2 A e 3.3 A) suportam a monofilia deste género (com um valor de 99% de IBT, em ambos os casos) e situam-no na base do ramo formado pelos géneros *Aphelocoma*, *Gymnorhinus*, *Cyanocorax* e *Calocitta*. Nas árvores em que este género surge como polifilético (figuras 3.2 B e 3.3 A), os ramos onde se encontram as espécies *C. cristata* e *C. stelleri* apresentam valores de *bootstrap* reduzidos, o que se traduz numa incerteza quanto ao real padrão de ramificação do grupo onde estas espécies se inserem. Este resultado anómalo poderá dever-se a um fenómeno de saturação das transições, que introduz um "ruído de fundo" no sinal filogenético.

Segundo Madge & Burn (1994), poderiam incluir-se no género *Cyanocorax* os géneros *Aphelocoma*, *Cyanolyca* e *Cyanocitta*, sendo o género *Cyanolyca* o "elo de ligação" entre os outros géneros. De acordo com os resultados deste trabalho e de outros autores (De Los Monteros & Cracraft, 1997; Saunders & Edwards, 2000) esta hipótese carece de fundamento, pois o género *Cyanolyca* é o mais primitivo de todos os gaios do Novo Mundo e o género *Cyanocorax* não tem uma posição basal relativamente aos restantes, sendo apenas confirmada a sua estreita relação com o género *Calocitta*.

4.2.3 A Posição da Pega-Azul no Seio da Família *Corvidae*

A posição filogenética da Pega-azul tem permanecido uma incógnita. Os estudos morfológicos da família *Corvidae* não permitiram mais do que apontar algumas vagas semelhanças entre a Pega-azul e outras espécies. De acordo com Bonaparte (1850 *in* Sacarrão, 1974), o género *Cyanopica* seria intermediário entre os géneros *Garrulus* e *Pica* mas, segundo Amadon (1944 *in* Sacarrão, 1974) teria afinidades com os géneros *Pica* e *Cissa*. Madge & Burn (1994) sugerem que a Pega-azul poderá ser uma espécie próxima do ancestral de todos os gaios endémicos do continente Americano. Até ao momento, a Pega-azul nunca foi alvo de um estudo filogenético baseado em evidências moleculares, pelo que estas hipóteses não foram testadas num contexto filogenético moderno.

Nas árvores filogenéticas apresentadas nas figuras 3.2 e 3.3 verifica-se que o género *Cyanopica* é monofilético e agrupa-se, numa politomia, preferencialmente com os géneros *Pica* e *Ptilostomus* (em três das quatro árvores) e, também, com o género *Nucifraga* (em duas das quatro árvores). O suporte estatístico deste agrupamento só é elevado (89% de *bootstrap*) nas árvores que foram construídas tendo em conta a informação dada por todas as substituições

nucleotídicas (ver figuras 3.2 B e 3.3 B). A inclusão do género *Nucifraga* neste grupo é contraditória face aos resultados das árvores 3.2 A e 3.3 B, pelo que dever-se-á encarar com alguma cautela a posição deste *taxon*. No trabalho de Cibois & Pasquet (1999) os géneros *Pica* e *Ptilostomus* são sempre reunidos num mesmo grupo, embora em ramos afastados e com reduzido suporte estatístico.

As distâncias genéticas apresentadas na tabela 3.1 suportam a existência de uma relação de proximidade entre os géneros *Cyanopica*, *Pica* e *Ptilostomus*. Analisando as distâncias calculadas a partir das transições verifica-se que os *taxa* mais próximos da Pega-azul são os pertencentes aos géneros *Pica* e *Ptilostomus* e, em menor grau, também *Nucifraga*. Nas distâncias calculadas com todas as substituições nucleotídicas não é tão evidente esta relação de proximidade, mas os géneros anteriormente citados encontram-se entre os mais próximos do género *Cyanopica*.

O género *Ptilostomus* é endémico do continente Africano e, à semelhança do género *Cyanopica*, é monoespecífico, não tendo afinidades claras com outros géneros de corvídeos. Morfologicamente, apresenta algumas semelhanças com uma pega (*Pica* sp.), devido à cauda comprida que possui e também com o género *Corvus*, devido à sua plumagem inteiramente preta. No entanto, estas características não são exclusivas destes géneros, sendo partilhadas por espécies pertencentes a géneros não directamente aparentados com os anteriores. A plumagem inteiramente preta existe igualmente nas espécies do género *Pyrrhocorax* e a cauda comprida é típica de várias espécies dos géneros *Cissa*, *Cyanopica*, *Urocissa*, *Dendrocitta*, *Crypsirina* e *Calocitta* (Madge & Burn, 1994).

As pegas do género *Pica* têm uma distribuição Holárctica, tendo-se originado no Velho Mundo e, subsequentemente, colonizado o continente Americano. Embora sejam, superficialmente, semelhantes a uma Pega-azul mais corpulenta, as espécies deste género têm várias diferenças que as distinguem do género *Cyanopica*, nomeadamente ao nível da plumagem, do habitat, do comportamento e da distribuição mundial (Birkhead, 1991; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Snow & Perrins, 1998).

O grupo onde se reúnem os géneros *Cyanopica*, *Pica* e *Ptilostomus*, surge sempre nas árvores filogenéticas numa posição basal relativamente ao ramo que inclui os géneros *Corvus* e *Garrulus*. A sua posição relativamente ao grupo dos gaios americanos é mais incerta, pois estes últimos tanto se inserem no ramo formado pelos géneros *Corvus* e *Garrulus* como ocupam uma posição externa ao conjunto formado por estes dois géneros e pelas espécies do ramo da Pega-azul. No entanto, nenhuma das reconstruções da filogenia dos *Corvidae* sugere que a Pega-azul

é o ancestral directo dos gaios do continente Americano, pelo que a hipótese proposta por Madge & Burn (1994) carece de fundamento. Adicionalmente, não parece existir qualquer relação das pegas tropicais dos géneros *Cissa* (e *Urocissa*) com as pegas dos géneros *Pica* e *Cyanopica*, o que contraria a hipótese de Amadon (1944, *in* Sacarrão, 1974).

Em alternativa, os dados agora apresentados são congruentes com a hipótese de o género *Cyanopica* pertencer a um ramo de corvídeos bastante antigo, já existente à data da separação entre os géneros *Garrulus* e *Corvus*. Este grupo ter-se-á expandido através da região Holárctica, tendo chegado a África, onde originou o género *Ptilostomus*[3]. A partir deste grupo ancestral, ter-se-ão diferenciado, na Eurásia, os géneros *Pica* e *Cyanopica*. A separação entre estes dois géneros deverá ter ocorrido há bastante tempo, pois a distância média entre os géneros é de 14,5% (calculada com transições e transversões). A julgar pela sua actual distribuição, estes dois géneros deverão ter colonizado uma vasta área da região Paleárctica, mas só o género *Pica* atingiu a América do Norte, onde deu origem às espécies *Pica hudsonia* e *Pica nuttalli*.

Assumindo a existência de um relógio molecular, é possível calcular uma data aproximada para a separação entre os géneros *Pica*, *Ptilostomus* e *Cyanopica*. O valor mais usado para calibrar o relógio molecular é de 2% de divergência entre sequências por milhão de anos. Este valor foi inicialmente proposto para espécies de gansos (*Anatidae*; Shields & Wilson, 1987) e, posteriormente, foi comprovado numa espécie de Passeriforme endémico do Hawai (*Hemignathus virens*; Tarr & Fleischer, 1993). Existe ainda uma outra calibração do relógio molecular, que considera uma taxa de divergência de 1,6% entre sequências, por milhão de anos (Fleischer *et al.*, 1998).

A divergência média entre estes géneros é de 14,5% para o par *Pica/Cyanopica*, 14,1% para o par *Ptilostomus/Cyanopica* e 13,1% para o par *Ptilostomus/Pica*, pelo que a divergência destes *taxa* deverá ter-se iniciado no Mioceno, há 6,5-7 milhões de anos (com a primeira taxa de calibração) ou 8,1-9,1 milhões de anos (com a segunda taxa de calibração).

[3] O corvídeo *Zavattariornis stresemanni* é uma outra espécie endémica de África, que pertence um género monoespecífico sem afinidades claras com outros géneros actuais de *Corvidae* (Madge & Burn, 1994). Esta espécie poderá fazer parte do mesmo grupo que *Ptilostomus afer* mas, como não foi ainda alvo de qualquer estudo molecular, não é possível incluí-la nesta análise.

4.3 Origem das Populações Ibéricas de Pega-Azul

Os resultados apresentados nas tabelas 3.3 e 3.4 e resumidos na figura 3.5, indicam a existência de uma profunda separação entre as pegas-azuis ibéricas e asiáticas e confirmam a monofilia do género face aos géneros *Pica* e *Corvus* (que já tinha sido abordada no capítulo anterior). Tanto o grupo formado pelo género *Cyanopica* como os dois subgrupos formados pelas sequências ibéricas e asiáticas de Pega-azul têm um elevado suporte estatístico, igual ou superior a 93% de *bootstrap*.

O grupo de Pega-azul formado apenas pelas sequências de origem asiática apresenta uma divergência interna que separa, com um suporte estatístico muito elevado, o ramo da subespécie *C. c. pallescens* de um grupo formado pelas subespécies *C. c. swinhoei*, *C. c. kansuensis* e uma ave não identificada ao nível subespecífico. A divergência entre estes dois grupos é de 1,8% (ver tabela 3.3), o que sugere que a sua separação ter-se-á iniciado há 900.000 a 1.125.000 anos atrás (usando as taxas de substituição de 2% e 1,6% por milhão de anos, respectivamente). Esta divisão é concordante com a distinção da subespécie *C. c. pallescens* mas os resultados mostram, igualmente, a inexistência de diferenças entre as sequências de *C. c. swinhoei*, *C. c. kansuensis* e a sequência de identidade indeterminada (que poderá ser, ou não, de uma outra subespécie). No seu conjunto, estes resultados sugerem que:

i) existem entidades bem diferenciadas no seio da distribuição asiática da Pega-azul, que justificam um estatuto taxonómico separado; mas

ii) nem todas as subespécies actualmente reconhecidas podem ser diferenciadas do ponto de vista molecular.

Estes dados devem ser considerados como preliminares, pois o fragmento de DNA analisado nesta comparação tem um comprimento de apenas 343 bp, podendo existir variação suficiente para separar estes *taxa* na restante porção do *cyt b*. Apesar destas reservas, dever-se-á proceder a uma reapreciação da validade das oito subespécies de Pega-azul existentes na Ásia, pois os factos aqui apresentados sugerem que a actual classificação não reflecte de uma maneira fiel as divisões existentes nesta espécie.

A média das distâncias de Tamura-Nei entre as sequências ibéricas e asiáticas de *Cyanopica cyanus* é de 6,2% (ver tabela 3.4). A divergência entre estas duas formas deverá ter-se iniciado há 2,5 a 4,7 milhões de anos, conforme se usa uma taxa de calibração do relógio molecular de 2 ou 1,6% (percentagem de divergência entre sequências, por milhão de anos), e

incorporando a correcção do erro padrão (±1,3%) na sua estimativa. Este intervalo situa a divergência de ambos os grupos no Plioceno. As glaciações iniciaram-se no final do Plioceno, há 2,3 a 2,8 milhões de anos, pelo que podem ter desempenhado um papel fulcral na divergência entre as populações de Pega-azul (Dwyer & Cronin, 1994 *in* Finlayson, 1998). A importância das glaciações na modelação da distribuição e diversidade de vários *taxa* de Aves foi confirmada por vários trabalhos (*e.g.* Blondel *et al.*, 1996; Avise & Walker, 1998; Klicka & Zink, 1999; Questiau *et al.*, 1998; Kvist *et al.*, 1999 e 2001).

Como não foram analisadas amostras representativas de todas as subespécies de Pega-azul existentes na Ásia não é possível conhecer o grau de variabilidade interna do grupo definido pelas subespécies asiáticas de *Cyanopica*. Por este motivo, não se pode excluir, *a priori*, um cenário de introdução da espécie na Península Ibérica no século XVI com aves provenientes de uma subespécie ou população não amostrada e, simultaneamente, diferenciada das restantes subespécies ou populações asiáticas. De acordo com este cenário, existiriam na Ásia duas "formas" de Pega-azul bem diferenciadas entre si e não necessariamente concordantes com as subespécies correntemente reconhecidas. As aves introduzidas na Península Ibérica teriam sido provenientes de um destes *taxa*, enquanto as aves amostradas no presente trabalho pertenceriam ao outro *taxon*. Assim, as distâncias entre os dois grupos não reflectiriam diferenças profundas entre as populações Ibéricas e Asiáticas mas sim, uma diferenciação no interior da população Asiática (*sensu* lato).

No entanto, se este cenário se verificasse, a população Ibérica teria que apresentar as características típicas de uma população introduzida há pouco tempo, a partir de um núcleo reduzido de fundadores, pois a hipótese de uma introdução feita com um grande número de indivíduos é muito improvável. As seis sequências de *Cyanopica cyanus cooki* incluídas nesta análise apresentam cinco posições variáveis em 343 bp. Apenas os haplótipos de Pinhel (P) e de Lagoaça (L) são idênticos existindo, portanto, cinco haplótipos distintos. Significativamente, quatro destas sequências provêm de amostras recolhidas na Beira Baixa, em locais situados relativamente próximos entre si: Idanha-a-Velha (ID), Alcafozes (AZ) e Alares (A1 e A2; ver figura 2.1). As quatro sequências asiáticas que, convém recordar, se referem a, pelo menos, três subespécies diferentes, apresentam apenas mais uma posição variável (seis no total). No entanto, se se excluir a sequência de *Cyanopica cyanus pallescens*, as restantes sequências asiáticas não apresentam qualquer posição variável o que, por comparação, torna mais significativa a variabilidade apresentada pelas sequências ibéricas.

Estes dados sugerem que a população Ibérica é bastante mais diversa do que seria de esperar, assumindo a sua introdução num passado recente, a partir de um número reduzido de

indivíduos. Os resultados acima expostos são ainda reforçados pela análise da rede haplotípica da figura 3.6, que foi elaborada a partir de um número superior de sequências de *Cyanopica cyanus cooki*. Nesta figura, verifica-se que 43% das amostras apresentam haplótipos distintos (13 haplótipos em 30 amostras), que diferem entre si em uma a dez posições nucleotídicas, ou seja, 0,2 a 2,4% de divergência.

Quando uma espécie é introduzida numa área continental[4], mesmo que se encontre preparada para sobreviver às condições físicas do meio onde foi introduzida, irá sofrer competição por parte das espécies já instaladas e estará bastante exposta aos predadores naturais, pelo seu desconhecimento inicial do meio. A Pega-azul nidifica preferencialmente em colónias e, mesmo nesta circunstância, o insucesso reprodutor devido à predação dos ninhos é elevado (Muñoz-Pulido *et al.*, 1990; Cramp & Perrins, 1994), o que poderá dificultar o estabelecimento da espécie num novo local. Todos estes factores fariam aumentar a taxa de mortalidade o que se reflectiria numa diminuição do número de aves do núcleo fundador. Após os primeiros anos já só uma proporção reduzida dos haplótipos do núcleo inicial estaria ainda presente na população introduzida e, apesar de a taxa de mutação do mtDNA ser, comparativamente, elevada, esta não seria suficiente para que, em apenas 500 anos, a população introduzida apresentasse uma proporção elevada de haplótipos distintos, diferenciados por várias mutações, como acontece na amostra de *C. c. cooki*.

Assim, para explicar a observação de 13 haplótipos diferentes na população ibérica de Pega-azul, assumindo que a espécie foi introduzida há cinco séculos atrás, ter-se-ia que invocar um cenário em que:

i) fossem introduzidas, pelo menos 13 fêmeas de Pega-azul, portadoras de haplótipos distintos, e que teriam conseguido reproduzir-se com sucesso, pelo menos uma vez;

ii) nenhuma das linhagens haplotípicas se extinguisse até ao presente;

iii) a distribuição dos haplótipos do mtDNA da população introduzida fosse, passados cinco séculos desde a sua introdução, uma imitação perfeita da distribuição esperada assumindo uma expansão populacional pós-glaciar.

Consideradas isoladamente, qualquer uma das condições acima expostas é improvável, pelo que a verificação simultânea de todas as condições se afigura extremamente improvável.

[4] As introduções em ilhas assumem contornos particulares, pela singularidade dos ecossistemas insulares.

Por conseguinte, embora possam ser apresentados cenários consentâneos com ambas as hipóteses para a origem da população ibérica de Pega-azul e, simultaneamente, concordantes com os dados observados, estes não são igualmente parcimoniosos ou prováveis.

Pelo que foi acima exposto, considera-se que a Pega-azul é uma espécie autóctone na Península Ibérica e que a sua actual distribuição geográfica foi, provavelmente, moldada pelas alterações climáticas que se sucederam desde o final do Plioceno até ao presente. Estes resultados suportam a hipótese proposta por Sacarrão (1974) "*segundo a qual Cyanopica cyanus teria ficado localizada* [durante as glaciações] *em certos pontos mais meridionais da Ibéria, na floresta temperada ou em certas áreas muito limitadas, com vegetação mediterrânica*" (em itálico no original).

4.4 Filogeografia da Pega-Azul na Península Ibérica

A frase de Sacarrão (1974) acima transcrita coloca igualmente uma hipótese filogeográfica referente à distribuição ibérica da Pega-azul. Terá a espécie ficado retida em um ou mais refúgios na Península Ibérica?

A rede haplotípica apresentada na figura 3.6 é indicativa de uma filogenia em estrela, com pouca estrutura filogeográfica. O haplótipo 1, que se encontra presente em quase todas as populações, deve ter dado origem, por mutação à maior parte dos haplótipos que dele diferem em apenas uma ou duas mutações. Este padrão é consistente com uma expansão populacional recente (em termos evolutivos), a partir de um número reduzido de indivíduos.

Constituem excepções a esta hipótese os haplótipos 7, 9, 11 e, principalmente, 13, que foram detectados nas amostras de Alcafozes (haplótipo 7) e Barrancos (os restantes haplótipos). As diferenças existentes entre estes e o haplótipo 1 cifram-se em três mutações, para os haplótipos 7, 9 e 11, e em sete mutações, para o haplótipo 13. A acumulação de um maior número de diferenças entre haplótipos sugere que a sua divergência é mais antiga, principalmente no caso do haplótipo 13. Três dos quatro haplótipos mais diferenciados foram detectados na população de Barrancos, no Baixo Alentejo (haplótipos 9, 11 e 13), e apenas um na população de Alcafozes, na Beira Baixa (haplótipo 7).

Estes haplótipos mais diferenciados e, provavelmente, mais antigos só foram encontrados em populações do centro e, principalmente, do Sul da distribuição ibérica da Pega-azul. Esta distribuição sugere que a Pega-azul está presente nas zonas mais meridionais da

Península Ibérica há mais tempo do que na zona Norte da sua actual distribuição. Esta diferença, possibilitou o aparecimento, nas zonas mais a Sul, de novos haplótipos devido ao acumular de mutações. Esta hipótese é ainda reforçada pelo facto de na população de Barrancos se ter encontrado um grande número de haplótipos diferentes - seis haplótipos em sete amostras - o que, mais uma vez, sugere que a presença da espécie nessa área é bastante antiga. Estes dados sugerem que a Pega-azul já teve uma distribuição mais restrita na Península Ibérica e que, posteriormente, se expandiu para Norte, o que terá provocado uma rarefacção na diversidade haplotípica, à medida que aumentava a distância relativamente ao(s) centro(s) de expansão. É provável que esta expansão para Norte se deva à melhoria das condições ambientais que se seguiu ao final das glaciações, na transição Plistoceno para o Holoceno (Finlayson, 1998), uma vez que a melhoria das condições climáticas favoreceu a expansão dos bosques, de que a Pega-azul depende para a sua sobrevivência.

A sobrevivência de espécies durante as glaciações, em refúgios localizados nas zonas mais a Sul é um fenómeno bem conhecido (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1996, 1999 e 2000; Blondel, 2001). Durante as glaciações do Quaternário, vastas áreas da Europa encontravam-se cobertas por glaciares. Na Península Ibérica, os períodos mais frios favoreciam o aparecimento de vegetação estepária (Finlayson, 1998), enquanto a vegetação arbórea, dominada pelo género *Pinus*, ocupava as áreas a Sul das zonas de estepe. Nestes períodos, a vegetação mediterrânica, onde a Pega-azul é actualmente mais abundante, sobrevivia fragmentada em refúgios, nas zonas mais meridionais da Península Ibérica (ver Finlayson, 1998 e as referências aí citadas).

Estes dados permitem considerar a hipótese de a Pega-azul ter sobrevivido em mais do que um refúgio, durante os períodos glaciares. A diferenciação do haplótipo 13 face aos restantes é compatível com a existência de uma linhagem distinta, que se teria refugiado numa outra zona da Península Ibérica. Segundo esta hipótese, a presença deste haplótipo na população de Barrancos seria explicada pela existência de um contacto secundário entre populações que se expandiram a partir de diferentes refúgios. Observando a distribuição actual da Pega-azul na Península Ibérica (ver figura 4.1), verifica-se que existe uma zona no Sul de Espanha, a Sul do rio Guadalquivir, onde a espécie está quase isolada da restante área de distribuição. Adicionalmente, os fósseis de Pega-azul descobertos em Gibraltar[5] (Cooper, 2000) provam que a espécie habitava a zona mais meridional da Península Ibérica há cerca de 40.000 anos, embora actualmente já não se encontre nesta área (De La Cruz, 1997). De acordo com a hipótese acima exposta, teriam existido, pelo menos, dois refúgios glaciares na Península Ibérica: um na região Sudoeste e o outro na zona Sul. De acordo com a actual distribuição da espécie, a separação entre estas duas áreas poderia ser marcada pelo vale do rio Guadalquivir, que poderia actuar

[5] Assumindo como correcta a sua identificação (ver Cooper, 2000; Marco, 2000).

como uma barreira que impedisse o contacto entre as aves dos dois refúgios, antes da sua expansão para Norte.

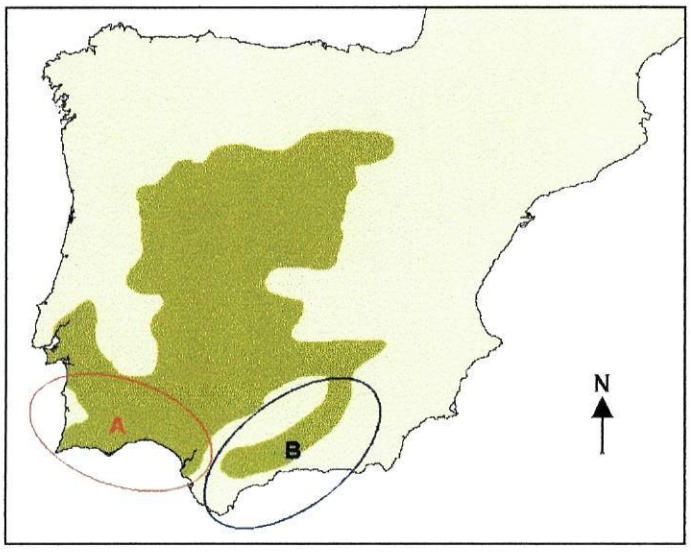


Figura 4.1.
Possível localização dos refúgios glaciares onde a Pega-azul Ibérica (*Cyanopica cooki*) poderá ter sobrevivido durante o Plistoceno. A verde representa-se a actual área de distribuição da espécie (Rufino, 1989; De La Cruz, 1997). Os resultados deste trabalho suportam a existência de, pelo menos, um refúgio glaciar, no Sul da Península Ibérica, cuja possível localização está assinalada pela letra **A** (a vermelho). A Leste desta região, encontra-se uma outra zona, assinalada pela letra **B** (a azul), que poderá ter constituído um segundo refúgio para a espécie. Actualmente, a separação entre estas duas regiões coincide, aproximadamente, com o vale do rio Guadalquivir

No entanto, com as amostras analisadas neste trabalho não é possível excluir a hipótese de ter existido um único refúgio na Península Ibérica e de o haplótipo 13 representar apenas uma linhagem mais antiga. Para que se possa esclarecer melhor as questões relativas à localização e ao número de refúgios glaciares de *Cyanopica cyanus* na Península Ibérica, é necessário proceder a um estudo mais pormenorizado da sua estrutura populacional, através da análise de um maior número de amostras, de localidades situadas, preferencialmente, na metade Sul da actual distribuição da espécie.

O gráfico apresentado na figura 3.7 não apresenta uma distribuição em forma de sino, característica de uma explosão demográfica, como seria de esperar se a população estivesse em crescimento acelerado (Rogers & Harpending, 1992). Ambas as distribuições (A e B), têm uma forma semelhante a um **L**, que pode ser explicada:

i) pela ocorrência recente de um *bottleneck,* ou

ii) pela reduzida variabilidade das sequências analisadas, que reduz o poder informativo deste tipo de análise.

Embora seja provável que a população ibérica de Pega-azul tenha sofrido um *bottleneck* devido às glaciações, o tempo decorrido desde o seu final deveria ser suficiente para que a população recuperasse e exibisse níveis de variabilidade genética compatíveis com a sua

expansão demográfica e populacional. É, portanto, possível que os resultados expostos no gráfico 3.7 se devam ao facto de a variabilidade existente nos haplótipos analisados não ser suficiente para realizar uma análise de PMD com suficiente poder discriminatório.

4.5 O Estatuto Taxonómico da Pega-Azul Ibérica

A distância genética existente entre as pegas-azuis ibérica e asiática, analisada neste trabalho, é elevada (6,2%) e corresponde a uma separação que se terá iniciado há 2,5-4,9 milhões de anos. A divergência máxima, observada entre as sequências ibéricas utilizadas na constituição da rede haplotípica da figura 3.6, foi de 2,4%, entre os haplótipos 13 e 7. Este valor pode ser utilizado para impor um limite cronológico superior no processo de separação entre as formas ibéricas e asiáticas, se se assumir que à data da existência do ancestral comum a todos os haplótipos ibéricos, as formas asiática e ibérica de Pega-azul constituíam dois grupos monofiléticos.

Assim, assumindo que a taxa de mutação é de 2% por milhão de anos, o ancestral comum entre estas sequências terá existido no Plistoceno, há 1,2 milhões de anos. Este facto sugere que o processo de separação entre as pegas-azuis ibéricas e asiáticas ter-se-á prolongado no tempo durante mais de um milhão de anos (entre 1,3 a 3,7 milhões de anos), tendo-se iniciado no Plioceno e finalizado no Plistoceno. Este resultado é concordante com os dados apresentados por Avise & Walker (1998) para a duração do processo de especiação em Aves e, simultaneamente, reforçam a hipótese defendida por Klicka & Zink (1997 e 1999), segundo a qual o processo de especiação de muitas Aves se terá iniciado, não no Plistoceno, mas sim no Plioceno.

As pegas-azuis asiáticas e ibéricas apresentam uma divergência entre si que é o dobro da existente entre as espécies euroasiática e norte-americana de Pega-rabuda - 3,1% (ver tabela 3.1) - que se encontram entre os corvídeos actuais mais próximos do género *Cyanopica*. A divergência entre *Pica hudsonia* e *Pica pica* aqui apresentada é consistente com o valor determinado por Zink *et al.* (1995), através da análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), o que reafirma a confiança na estimativa apresentada.

A determinação do estatuto taxonómico de populações alopátricas, constitui uma das maiores desvantagens do conceito biológico de espécie (Zink & McKitrick, 1995; Cracraft, 1997). A existência de isolamento reprodutor entre *taxa* alopátricos é extremamente difícil de provar, pelo que a determinação deste requisito do conceito biológico de espécie conduz,

frequentemente, a interpretações subjectivas (Zink & McKitrick, 1995; Cracraft, 1997). Por este motivo, julga-se que a situação taxonómica das formas ibérica e asiática de Pega-azul deverá ser analisada no âmbito do conceito filogenético de espécie, que não apresenta estes problemas aquando da análise de populações alopátricas. Os dados aqui apresentados sugerem que as formas ibérica e asiática de Pega-azul atingiram uma diferenciação genética consentânea com a atribuição do estatuto específico a cada uma, em detrimento de ambas serem consideradas como subespécies de uma espécie politípica. O fluxo génico entre as duas espécies de Pega-azul cessou há várias centenas de milhares de anos, pelo que, ao isolamento geográfico, há que somar o isolamento genético. De acordo com esta proposta, a forma ibérica deverá ser designada por *Cyanopica cooki* (Bonaparte, 1850) uma vez que a descrição da forma asiática tem precedência no uso do nome *Cyanopica cyanus* (ver Sacarrão, 1974).

Segundo os dados aqui apresentados, a diferenciação genética entre as duas espécies de Pega-azul não foi acompanhada por uma correspondente diferenciação a outros níveis (morfologia e comportamento, por exemplo; ver o capítulo introdutório deste trabalho). Situações análogas a esta foram já descritas em outras espécies de Aves e, particularmente, em corvídeos como o Corvo (*Corvus corax*), no Oeste da América do Norte (Omland *et al.*, 2000) e as pegas-rabudas (*Pica pica* e *Pica hudsonia*) na região Holárctica (Goodwin, 1986; Birkhead, 1991; Madge & Burn, 1994; Zink *et al.*, 1995).

4.6 Relevância para a Conservação da Pega-azul na Península Ibérica

Pelo que foi atrás exposto, a Pega-azul Ibérica, *Cyanopica cooki*, é uma espécie endémica da Península Ibérica. Esta espécie evoluiu, durante várias centenas de milhares de anos, isolada da sua congénere asiática, *Cyanopica cyanus*, pelo que deverá representar uma linhagem evolutiva independente, provavelmente com adaptações particulares ao ecossistema ibérico.

Esta espécie ocupa, de uma forma descontínua e localizada, uma área de distribuição restrita no contexto Europeu e mundial, o que aumenta a sua vulnerabilidade. A actual situação demográfica de *Cyanopica cooki* não é preocupante, uma vez que:

i) os seus efectivos reprodutores devem ser superiores a 250.000 casais (Rufino, 1989; De La Cruz, 1997), e

ii) encontra-se numa fase de expansão geográfica da sua área de distribuição (Sacarrão, 1982; Rufino, 1989; Madge & Burn, 1994; De La Cruz, 1997).

No entanto, a Pega-azul Ibérica já terá ocupado áreas da Península Ibérica onde actualmente já não existe (Ferrer, 1987), o que permite pensar que a actual tendência demográfica é um fenómeno relativamente recente, de curto ou médio prazo, e facilmente reversível. O facto de a espécie não ter alargado a sua área de distribuição para fora das fronteiras ibéricas é um indício da sua fraca capacidade de dispersão, ou da existência de fenómenos de competição com outras espécies, como a Pega-rabuda (*Pica pica*). Estes aspectos poderão assumir uma especial relevância na eventualidade de se verificar um decréscimo dos seus efectivos.

Actualmente, a perseguição humana é a principal ameaça à sobrevivência da Pega-azul (De La Cruz, 1997; Canário *et al.*, 1999). Em algumas regiões, a Pega-azul Ibérica é perseguida por causar prejuízos em culturas frutícolas, uma vez que parte importante do seu regime alimentar é composta por frutos (Goodwin, 1986; Cramp & Perrins, 1994; Madge & Burn, 1994; Tellería *et al.*, 1999). Este corvídeo é igualmente acusado de predar os juvenis de espécies cinegéticas, o que pode levar a que seja um alvo potencial para programas de "controlo de predadores". Por vezes, as crias de *Cyanopica cooki* são retiradas do ninho para serem consumidas pelo homem, mas esta forma de ameaça parece ser menos importante do que as anteriores, pois deverá ser muito localizada e pouco significativa quantitativamente (apenas foi detectada em Idanha-a-Velha).

O facto de esta espécie nidificar preferencialmente em colónias significa que, durante uma fase crucial do seu ciclo de vida, várias aves se concentram numa área limitada, o que aumenta a sua visibilidade e as torna mais vulneráveis à perseguição humana, seja pela destruição de ninhos ou pelo abate de aves. Estes aspectos deverão ser tomados em consideração pelas autoridades competentes aquando da definição de eventuais medidas de controlo da espécie. Na eventualidade de serem necessárias acções de controlo das populações de Pega-azul Ibérica, estas deverão restringir-se a medidas de prevenção de danos[6], evitando medidas que impliquem a morte de aves.

[6] *e.g.* impedir o estabelecimento de uma colónia reprodutora, translocar indivíduos para áreas menos sensíveis, afugentar as aves de zonas sensíveis, etc.

5. Considerações Finais

Os resultados deste trabalho apresentam, pela primeira vez, uma perspectiva molecular sobre a filogenia e filogeografia do género *Cyanopica*.

O estudo de parte do gene do *cyt b* não permitiu resolver com clareza o padrão de ramificação de todas as espécies de *Corvidae* analisadas neste trabalho. A posição de alguns *taxa* permanece pouco clara (*Nucifraga caryocatactes*, *Corvus monedula*, *Cyanocitta stelleri* e *Cyanocitta cristata*) pelo que, para obter uma melhor representação das relações evolutivas entre os géneros que formam a família *Corvidae*, será aconselhável, em estudos futuros, incluir um maior número de *taxa* de modo a englobar todos os géneros desta família, e analisar outros marcadores genéticos, como a região de controlo do mtDNA ou genes nucleares.

O género *Cyanopica* pertence a um grupo de corvídeos que inclui, também, os géneros *Pica* e *Ptilostomus*. Este grupo representa uma linhagem de corvídeos bastante antiga, que se expandiu por uma grande parte da Eurásia e África, tendo um dos seus membros - o género *Pica* - colonizado a América do Norte. Estes resultados contrariam hipóteses anteriores, segundo as quais o género *Cyanopica* seria um ancestral dos gaios endémicos do continente Americano, ou estaria aparentado com as pegas do género *Cissa*.

As separação entre as pegas-azuis da Península Ibérica e do continente Asiático data do Plioceno, sendo, portanto, muito anterior ao estabelecimento das rotas comerciais entre os reinos ibéricos e o Extremo Oriente. A hipótese da introdução desta espécie na Península Ibérica é igualmente refutada pelo facto de as populações ibéricas apresentarem uma variabilidade genética muito superior à que poderia existir numa população introduzida há cinco séculos atrás. Os grupos ibérico e asiático de pegas-azuis separaram-se há, pelo menos, 2,5 milhões de anos, pelo que as glaciações do final do Plioceno poderão ter desempenhado um papel muito importante neste processo. Os subsequentes episódios glaciares do Plistoceno deverão ter reforçado o processo de separação entre ambos os grupos.

Este trabalho permitiu detectar a existência de uma divisão bastante profunda no seio do grupo formado pelas subespécies de *Cyanopica cyanus*. A subespécie *C. c. pallescens* está claramente diferenciada face às subespécies *C. c. swinhoei* e *C. c. kansuensis*, sendo que estas últimas não se distinguem através da análise da variabilidade de uma região do *cyt b*. Por este motivo, considera-se que as subespécies asiáticas de Pega-azul actualmente reconhecidas podem não corresponder a entidades reais. Para melhor esclarecer esta situação, será necessário realizar um estudo molecular completo, que abranja um numero significativo de exemplares de todas as subespécies de *Cyanopica cyanus*.

Durante as glaciações do Plistoceno, a Pega-azul Ibérica deverá ter tido uma distribuição restrita a um ou, possivelmente, dois refúgios no Sul da Península Ibérica. Após o final das glaciações e a subsequente expansão da vegetação arbórea para Norte, a Pega-azul iniciou uma expansão para fora do(s) refúgio(s), que deixou uma "assinatura genética" detectável na diminuição da diversidade haplotípica das populações mais setentrionais face às populações meridionais.

As pegas-azuis ibéricas e asiáticas encontram-se totalmente isoladas, geográfica e geneticamente, há várias centenas de milhares de anos. Durante este tempo, a Pega-azul Ibérica evoluiu isolada na Península Ibérica, pelo que constitui um *taxa* distinto e endémico desta região. A divergência genética atingida por estas duas formas de Pega-azul é bastante superior à existente entre outras espécies de *Corvidae* estreitamente aparentadas, nomeadamente entre as pegas-rabudas Neárctica e Paleárctica (*Pica hudsonia* e *Pica pica*, respectivamente). Em face destes resultados, a classificação do género *Cyanopica* deverá ser revista, de modo a elevar a forma ibérica à categoria de espécie, sob a designação de *Cyanopica cooki* (originalmente proposta por Bonaparte). Embora, presentemente, não se encontre ameaçada, a situação demográfica da Pega-azul Ibérica deverá ser monitorizada regularmente caso surjam indícios de declínio populacional.

6. Referências Bibliográficas

Alonso, J.A., Muñoz-Pulido, R., Bautista, L.M. & Alonso, J.C. 1991. Nest-site Selection and Nesting Success in the Azure-winged Magpie in Central Spain. *Bird Study* **38**: 45-51.

Araújo, J. 1975. Estudios sobre el Rabilargo (*Cyanopica cyana*) en una Colonia de Cria de Avila. *Ardeola* **21**: 469-485.

Arnold, K.E. & Owens, I.P.F. 1998. Cooperative Breeding in Birds: a Comparative Test of the Life History Hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond.* B **256** : 739-745.

Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the Evolutionary Genetics of Higher Animals. *Philos. Trans R. Soc. London* **312**:328-334.

Avise, J.C. 1998. The History and Purview of Phylogeography: a Personal Reflection. *Mol.Ecol.* 7: 371-379.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography – The History and Formation of Species.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Avise, J.C. & Walker, D. 1998. Pleistocene Phylogeographic Effects on Avian Populations and the Speciation Process. *Proc. R. Soc. Lond.* B **265**: 457-463.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489-522.

Baker, A.J. & Marshall, H.D. 1997. Mitochondrial Control Region Sequences as Tools for Understanding Evolution. *In* Mindell, D.P. (Ed.). *Avian Molecular Evolution and Systematics.* Academic Press, San Diego.

Barker, F.K., Barrowclough, G.F. & Groth, J. 2002. A Phylogenetic Hypothesis for Passerine Birds: Taxonomy and Biogeographic Implications of an Analysis of Nuclear DNA Sequence Data. *Proc. R. Soc. Lond.* B **269**: 295-308.

Barros, João De 1988. *Ásia. Dos Feitos que os Portugueses Fizeram no Descobrimento e Conquista dos Mares e Terras do Oriente.* Imprensa Nacional Casa da Moeda, Lisboa.

Bernis, F. 1997. *La Classe Aves. Un Recorrido por la Taxonomia.* Editorial Complutense, Madrid.

Bilton, D.T., Mirol, P.M., Mascheretti, S., Fredga, K., Zima, J. & Searle, J.B. 1998. Mediterranean Europe as an Area of Endemism for Small Mammals Rather than a Source for Northwards Postglacial Colonization. *Proc. R. Soc. Lond.* B **256** : 1219-1226.

Birkhead, T. 1991. *The Magpies: the Ecology, and Behaviour of Black-Billed and Yellow-Billed Magpies.* T & AD Poyser, London.

Blondel, J., Catzeflis, F. & Perret, P. 1996. Molecular Phylogeny and the Historical Biogeography of the Warblers of the Genus *Sylvia* (Aves). *J. Evol. Biol.* **9**: 871-891.

Blondel, J. 2001. Origine, Histoire et Dynamique de L'Avifaune de France. *In* Dubois, P.J., Le Mréchal, P. Olioso, G. & Yésou, P.. *Inventaire des Oiseaux de France – Avifaune de la France Métropolitaine.* Nathan, Paris.

Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F. & Gérard, A. 1998. Differentiation Between Populations of the Portuguese Oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), Revealed by mtDNA RFLP Analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **226**: 279-291.

Brown, 1974. Avian Communal Breeding Systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **9**: 123-155.

Buroker, N.E., Hershberger, W.K. & Chew, K.K. 1979. Population Genetics of the Family Ostreidae. I. Intraspecific Studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis. Mar. Biol.* **111**: 87-93.

Cabot, E. 1997. *Xesee. The Eyeball Sequence Editor. DOS Protected Mode Version. Version 3.1.* Distribuido pelo autor.

Canário, F. & Cardia, P. 2000. A Pega-Azul na Península Ibérica, Espécie Autóctone ou Introduzida? *Pardela* **13**: 4-6.

Canário, F. & Marín, J.M. 1999. Pega-Azul *Cyanopica cyanus*: Uma Espécie com um Sistema de Cria Cooperativa. *In* Beja, P., Catry, P. & Moreira, F. (Eds.). *Actas do II Congresso de Ornitologia da Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves.* SPEA, Lisboa.

Canário, F., Boieiro, M. & Vicente, L. 1999. Dieta das Crias de Pega-Azul *Cyanopica cyanus* numa Área de Montado de Azinho. *In* Beja, P., Catry, P. & Moreira, F. (Eds.). *Actas do II Congresso de Ornitologia da Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves.* SPEA, Lisboa.

Cibois, A. & Pasquet, E. 1999. Molecular Analysis of the Phylogeny of 11 Genera of the Corvidae. *Ibis* **141**: 297-306.

Cicero, C. & Johnson, N.K. 2001. Higher-level phylogeny of New World vireos (Aves: Vireonidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **20** (1): 27-40.

Clement, P., Harris, A. & Davies, J. 1999. *Finches and Sparrows: an Identification Guide.* Christopher Helm, London.

Clements, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: A Computer Program to Estimate Gene Genealogies. *Mol. Ecol.* **9** (10): 1657-1660.

Cooper, A., Lalueza-Fox, C., Anderson, S., Rambaut, A., Austin, J. & Ward, R. 2001. Complete Mitochondrial Genome Sequences of Two Extinct Moas Clarify Ratite Evolution. *Nature* **409**: 704-707.

Cooper, A 1997. Studies of Avian Ancient DNA: From Jurassic Park to Modern Island Extinctions. *In* Mindell, D.P. (Ed.). *Avian Molecular Evolution and Systematics.* Academic Press, San Diego.

Cooper, A. & Penny, D. 1997. Mass Survival of Birds Across the Cretaceous-Tertiary Boundary: Molecular Evidence. *Science* **275**: 1109-1113.

Cooper, J.H. 2000. First Fossil Record of Azure-winged Magpie *Cyanopica cyanus* in Europe. *Ibis* **142**: 139-158.

Correia, C.P. 2001. *Dodologia - Um Voo Planado sobre a Modernidade.* Relógio D'Água Editores, Lisboa.

Cracraft, J. 1997. Species Concepts in Systematics and Conservation Biology – an Ornithological Viewpoint. *In* Claridge, M.F., Dawah, H.A. & Wilson, M.R. (Eds.). *Species. The Units of Biodiversity.* Chapman & Hall, London.

Cracraft, J. & Feinstein, J. 2000. What is Not a Bird of Paradise? Molecular and Morphological Evidence Places Macgregoria in the Meliphagidae and the Cnemophilinae Near the Base of the Corvoid Tree. *Proc. R. Soc. Lond.* B **267**: 233-241.

Cramp, S. & Perrins, C.M. (Eds.) 1994. *Birds of the Western Paleartic, Vol. VIII.* Oxford University Press, Oxford.

Damião de Góis, 1954. *Crónica do Felicíssimo Rei Dom Manuel.* Coimbra.

De Juana, E. 1980. *Atlas Ornitológico de la Rioja.* Instituto de Estudios Riojanos, Logroño.

De Juana, E. 1992. Classe Aves (Birds). *In* Del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. (Eds.). *Handbook of the Birds of the World. Vol. 1.* Lynx Editions, Barcelona.

De La Cruz, C., De Lope, F. & Silva, E. 1990. Exito Reproductor del Rabilargo (*Cyanopica cyana* Pall.) en Extremadura. *Ardeola* **37**: 179-195.

De La Cruz, C. & Gonzalez, 1993. Comportamento de Cría Cooperativa en el Rabilargo, *Cyanopica cyana. IV Congreso Nacional y I Iberoamericano de Etologia.* Sociedad Española de Etologia, Cáceres.

De La Cruz, C. 1997. Rabilargo *Cyanopica cyanus. In* **Purroy, F.J. (Coord.).** *Atlas de las Aves de España (1975-1995).* Lynx Editions, Barcelona.

De Los Monteros, A.E. & Cracraft, J. 1997. Intergeneric Relationships of the New World Jays Inferred from Cytochrome *b* Gene Sequences. *The Condor* **99**: 490-502.

Del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. (Eds.) 1992. *Handbook of the Birds of the World. Vol. 1.* Lynx Editions, Barcelona.

Dubois, P.J., Le Maréchal, P. Olioso, G. & Yésou, P. 2001. *Inventaire des Oiseaux de France - Avifaune de la France Métropolitaine.* Nathan, Paris.

Elias, G.L., Reino, L.M., Silva, T., Tomé, R. & Geraldes, P. (Coords.) 1998. *Atlas das Aves Invernantes do Baixo Alentejo.* Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves, Lisboa.

Ericson, P.G.P., Christidis, L., Cooper, A., Irestedt, M., Jackson, J., Johansson, U.S. & Norman, J.A. 2002. A Gondwanan Origin of Passerine Birds Supported by DNA Sequences of the Endemic New Zealand Wrens. *Proc. R. Soc. Lond.* B **269**: 235-241.

Feduccia, A. 1995. Explosive Evolution in Tertiary Birds and Mammals. *Science* **267**: 637-638.

Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

Ferrer, X. 1987. Presencia de Rabilargo (*Cyanopica cyana*) en el Cuadrante NE de la Península Ibérica. *Ardeola* **34** (1): 110-113.

Finlayson, J.C. 1998. The Role of the Iberian Peninsula in the Palaearctic-African Migration System : Ecological, Evolutionary, Geographical and Historical Considerations at Varying Spatial and Temporal Scales. *In* Costa, L.T., Costa, H., Araújo, M. & Silva, M.A. (Eds.). *Simpósio sobre Aves Migradoras na Península Ibérica*. SPEA e Universidade de Évora.

Fleischer, R.C., McIntosh, C.E. & Tarr, C.L. 1998. Evolution on a Volcanic Conveyor Belt: Using Phylogeographic Reconstructions and K-Ar-Based Ages of the Hawaiian Islands to Estimate Molecular Evolutionary Rates. *Mol. Ecol.* 7: 533-545.

França, C. 1913. Contribution à L'Étude du Lapin de Porto Santo. *Bulletin de la Société Portugaise de Sciences Naturelle*, Tome VI, Fasc. 2.

Frutuoso, G. 1873. As saudades da Terra. *In* França, C.. Contribution à L'Étude du Lapin de Porto Santo. *Bulletin de la Société Portugaise de Sciences Naturelle*, Tome VI, Fasc. 2.

Goodwin, D. 1986. *Crows of the World*. 2nd Edition. British Museum, London.

Gould, S.J. & Johnston, R.F. 1972. Geographic Variation. *Ann. Rev. Ecol. System.* **3**: 457-498.

Gray, M.W. 1989. Origin and Evolution of Mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **5**: 25-50.

Harlid, A., Janke, A. & Arnason, U. 1998. The complete mitochondrial genome of Rhea americana and early avian divergences. *J. Mol. Evol.* **46** (6): 669-679.

Harrison, R.G. 1989. Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends Ecol. Evol.* **4**: 6-11.

Hedges, S.B. 1994. Molecular Evidence for the Origin of Birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2621-2624.

Helm-Bychowski, K. & Cracraft, J. 1993. Recovering Phbylogenetic Signal from DNA Sequences: Relationships Within the Corvine Assemblage (Class Aves) as Inferred from Complete Sequences of the Mitochondrial DNA Cytochrome-b Gene. *Mol. Biol. Evol.* **10** (6): 1196-1214.

Hewitt, G.M. 1996. Some Genetic Consequences of Ice Ages, and their Role in Divergence and Speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.

Hewitt, G.M. 1999. Post-glacial Re-colonization of European Biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**: 87-112.

Hewitt, G. 2000. The Genetic Legacy of the Quaternary Ice Ages. *Nature* **405**: 907-913.

Hillis, D.M., Mable, B.K. & Moritz, C. 1991. Applications of Molecular Systematics: the State of the Field and a Look to the Future. *In:* Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (Eds.). *Molecular Systematics. 2nd Edition*. Sinauer, Sunderland.

Hosono, T. 1983. A Study of the Life History of the Blue Magpie (11) Breeding Helpers and Nest-Parasitism by Cuckoo. *Misc. Journal Yamashina Inst. Ornith.* **15**: 63-71.

Houde, P., Cooper, A., Leslie, E., Strand, A.E. & Montaño, G.A. 1997. Phylogeny and Evolution of 12S rDNA in Gruiformes (Aves) . *In* Mindell, D.P. (Ed.). *Avian Molecular Evolution and Systematics.* Academic Press, San Diego.

Huvet, A., Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P., Heurtebise, S. & Boudry, P. 2002. Is Fertility of Hybrids Enough to Conclude that the two Oyster *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the Same Species? *Aquat.Living Reour.* **15**: 45-52.

Huvet, A., Lapègue, S., Magoulas, A., & Boudry, P. 2000. Mitochondrial and Nuclear DNA Phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese Oyster Endangered in Europe. *Cons. Genet.* **1**: 251-262.

Irestedt, M., Johansson, U.S., Parsons, T.J. & Ericsson, P.G.P. 2001. Phylogeny of Major Lineages of Suboscines (Passeriformes) Analysed by Nuclear DNA Sequence Data. *Journal of Avian Biology* **32**: 15-25.

Jonsson, L. 1994. *Les Oiseaux d'Europe*. Éditions Nathan, Paris.

Johnston, R.F. & Selander, R.K. 1971. Evolution in the House Sparrow. II. Adaptative Differentiation in North American Populations. *Evolution* **25**: 1-28.

Jenner, B., Bocheński, Z.M. & Tomek, T 2001. Relative Differentiation of Skeletal Elements in European Corvids. *J. Ornithol.* **142**: 30-33.

Klicka, J. & Zink, R.M. 1997. The Importance of Recent Ice Ages in Speciation: A Failed Paradigm. *Science* **277**: 1666-1669.

Klicka, J. & Zink, R.M. 1999. Pleistocene Effects on North American Songbird Evolution. *Proc. R. Soc. Lond.* B **266**: 695-700.

Komeda, S., Yamagishi, S. & Fujioka, M. 1987. Cooperative Breeding in Azure-Winged Magpies, *Cyanopica cyana*, Living in a Region of Heavy Snowfall. *Condor* **89**: 835-841.

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. *Bioinformatics* **17** (12):1244-1245.

Kvist, L., Ruokonen, M., Lumme, J. & Orell, M. 1999. The Colonization History and Present-Day Population Structure of the European Great Tit (*Parus major major*). *Heredity* **82**: 495-502.

Kvist, L., Martens, A., Ahola, A. & Orell, M. 2001. Phylogeography of a Palaearctic Sedentary Passerine, the Willow Tit (*Parus montanus*). *J. Evol. Biol.* **14**: 930-941.

Lee, K., Feinstein, J. & Cracraft, J. 1997. The Phylogeny of Ratite Birds: Resolving Conflicts Between Molecular and Morphological Data Sets. *In* Mindell, D.P. (Ed.). *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego.

Madge, S. & Burn, H. 1994. *Crows and Jays*. Christopher Helm, London.

Marco, A.S. 2000. Objeciones al Caso de los Fósiles Gibraltareños. *Quercus* **170**: 52-53.

Mathers, N.F., Wilkins, N.P. & Walne, P.R. 1974. Phosphoglucose Isomerase and Esterase Phenotypes in *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2**: 93-96.

Mattiucci, S. & Villani, F. 1983. Studio Elettroforetico dei Sistemi Gene-Enzima in Ostriche Classificate come *Crassostrea gigas* (Thunberg,1793) e *Crassostrea angulata*b (Lamarck, 1819) (Mollusca: Ostreidae). *Parasitologia* **25** : 21-27.

Menzel, R.W. 1974. Portuguese and Japanese Oysters are the Same Species. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**: 453-456.

Mindell, D.P., Sorenson, M.D., Huddleston, C.J., Miranda Jr., H.C., Knight, A., Sawchuk, S.J. & Yuri, T. 1997. Phylogenetic Relationships Among and Within Select Avian Orders Based on Mitochondrial DNA. *In* Mindell, D.P. (Ed.). *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego.

Moore, W.S. & DeFilippis, V.R. 1997. The Window of Taxonomic Resolution for Phylogenies Based on Mitochondrial Cytochrome b. *In* Mindell, D.P. (Ed.). *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego.

Morin, P., Moore, J. & Wooddruff, D. 1994. Kin Selection, Social Structure, Gene Flow and the Evolution of Chimpanzees. *Science* **265**: 1193-1201.

Moritz, C. 1996. Molecular Systematics and Evolutionary Biology. *Trends Ecol. Evol.* **4**:6-11.

Moritz, C., Dowling, T.E. & Brown, W.M. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-292.

Mullarney, K., Svensson, L., Zetterström, D. & Grant, P. 1999. *Collins Bird Guide*. HarperCollins Publishers, London.

Muñoz-Pulido, R., Bautista, L.M., Alonso, J.C. & Alonso, J.A. 1990. Breeding Success of Azure-winged Magpies *Cyanopica cyana* in Central Spain. *Bird Study* **37**: 111-114.

Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

O'Foighil, D., Gaffney, P.M., Wilbur, A.E. & Hilbisch, T.J. 1998. Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Gene Sequences Support an Asian Origin for the Portuguese Oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol.* **131**: 497-503.

Omland, K.E., Tarr, C.L., Boarman, W.I., Marzluff, J.M. & Fleischer, R.C. 2000. Cryptic Genetic Variation and Paraphyly in Ravens. *Proc. R. Soc. Lond.* B **267**: 2475-2482.

Patton, T., Haddrath, O. & Baker, A. 2002. Complete Mitochondrial DNA Genome Sequences Show that Modern Birds are not Descended from Transitional Shorebirds. *Proc. R. Soc. Lond.* B **269**: 839-846.

Purroy, F.J. (Coord.) 1997. *Atlas de las Aves de España (1975-1995)*. Lynx Editions, Barcelona.

Questiau, S., Eybert, M.-C., Gaginskaya, A.R., Gielly, L. & taberlet, P. 1998. Recent Divergence Between Two Morphologically Differentiated Subspecies of Bluethroat (Aves: Muscicapidae: *Luscinia sveccica*) Inferred from Mitochondrial Sequence Variation. *Mol. Ecol.* **7**: 239-245.

Quin, T.W. 1997. Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome. *In* Mindell, D.P. (Ed.). *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego.

Ranson, G. 1948. Ecologie et Répartition Géographique des Ostréidés Vivants. *Rev. Sci.* **86**: 469-473

Rivas-Martinez, S. 1987. Introducción. Nociones Sobre Fitosociología, Biogeografía y Bioclimatología. *In* Peinado, M. & Rivas-Martinez, S. (Eds.). *La Vegetación de España*. Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares.

Rogers, A.R. & Harpending, H. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol. Biol. Evol.* **9** (3): 552-569.

Rozas, J. & Rozas, R. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**: 174-175.

Rufino, R. (Coord.) 1989. *Atlas das Aves que Nidificam em Portugal Continental*. SNPRCN, Lisboa.

Sacarrão, G.F. 1967. Remarques sur la Variation Geographique de la Pie-bleue, *Cyanopica cyanus* (Pallas), dans la Peninsule Iberique, Specialment au Portugal. *Arq. Mus. Boc.* (2ª série) **1** (13): 241-248.

Sacarrão, G.F. 1971. *Cyanopica cyanus cooki* BP. Au Portugal. Localités de Capture et D'Observation. *Arq. Mus. Boc.* (2ª série) **3** (6): 133-143.

Sacarrão, G.F. 1972. Contribution à L'Étude de la Distribution de *Cyanopica cyanus cooki* BP (Aves-Corvidae) dans la Péninsule Ibérique. *Arq. Mus. Boc.* (2ª série) **3** (11): 347-354.

Sacarrão, G.F. 1974. Acerca de Alguns Aspectos Problemáticos da Ecologia Geográfica de *Cyanopica cyanus* (Pallas) (Aves: Corvidae). *Est. Fauna Port.* **1**: 1-88.

Sacarrão, G.F. 1982. On the Distributional Area of *Cyanopica cyanus cooki* BP (Aves, Corvidae) in Portugal. *Cyanopica* **11** (3): 1-3.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

Sambrook, E., Fritsch, F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Santos Júnior, J.R. 1968. The Colony of Azure-winged Magpies in the Barca d'Alva Region. *Cyanopica* **1**: 1-28.

Saunders, M.A. & Edwards, S.C. 2000. Dynamics and Phylogenetic Implications of mtDNA Control Region Sequences in New World Jays (Aves: Corvidae). *J. Mol. Evol.* **51**: 97-109.

Schneider, S.D., Roessli, D. & Excofier, L. 2000. Arlequin ver. 2.0: a Software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Shields, G.F. & Wilson, A.C. 1987. Calibration of Mitochondrial DNA in Geese. *Journal of Molecular Evolution* **24**: 212-217.

Sibley, C.G. & Ahlquist, 1990. *Phylogeny and Classification of Birds.* Yale University Press, New Haven and London.

Sibley, C.G. & Monroe Jr., B.L. 1990. *Distribution and Taxonomy of Birds of the World.* Yale University Press, New Haven and London.

Sneath, P.H. & Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy.* W. H. Freeman & Co.

Snow, D. & Perrins, C.M. 1998. *Birds of the Western Paleartic - Concise Edition, Vol. II.* Oxford University Press, Oxford.

SNPRCN 1990. *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Vol. I - Mamíferos, Aves, Répteis e Anfibios.* Serviço Nacional de Parques Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa.

Svensson, L. 1996. *Guía para la Identificación de los Passeriformes Europeos.* SEO, Madrid

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. & Cossons, J. 1998. Comparative Phylogeography and Postglacial Colonization Routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.

Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of mtDNA in Humans and Chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 512-526.

Tarr, C.L. & Fleischer, R.C. 1993. Mitochondrial-DNA Variation and Evolutionary Relationships in the Amakihi Complex. *The Auk* **110**: 825-831.

Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. 1992. A Cladistic Analysis of Phenotypic Association with Haplotypes Inferred from Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. III. Cladogram Estimation. *Genetics* **132**: 619-633.

Tellería, J.L., Asensio, B. & Díaz, M. 1999. *Aves Ibéricas III. Passeriformes.* J.M. Reyero Editor, Madrid.

Tyrberg, T. 1998. *Pleistocene Birds of the Palearctic: a Catalogue.* Publs. Nuttall Ornithol. Club, No. 27.

Ueta, M. 1998. Azure-Winged Magpies Avoid Nest Predation by Nesting Near a Japanese Lesser Sparrowhawk's Nest. *The Condor* **100** (2): 400-402.

Valencia, J., De La Cruz, C. & Carranza, J. 2000. Second Broods in a Mediterranean Cooperatively-Breeding Corvid: the Azure-Winged Magpie. *Etologia* **8**: 25-28.

Wolstenholme, D.R. 1992. Animal Mitochondrial DNA Variation: Structure and Evolution. *Inter. Rev. Cyt.* **141**: 173-216.

Zeuner, F.E. 1963. *A History of Domesticated Animals*. Hutchinson, London.

Zink, R.M. & McKitrick, M.C. 1995. The Debate over Species Concepts and Its Implications for Ornithology. *The Auk* **112** (3): 701-719.

Zink, R.M., Rohwer, S., Andreev, A.V. & Dittmann, D.L. 1995. Trans-Beringia Comparisons of Mitochondrial DNA Differentiation in Birds. *The Condor* **97**: 639-649.

7. Anexos

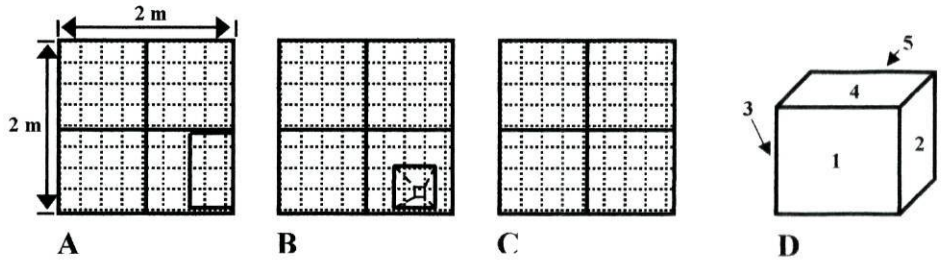
Anexo I

Esquema da armadilha usada para a captura de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*).

Esta armadilha para a captura de Pega-azul (ver figura 1) foi realizada segundo o modelo utilizado pelo Prof. Dr. Carlos De La Cruz (Universidad de Extremadura, Badajoz). A armadilha é composta por 5 painéis de iguais dimensões, em rede metálica com malha de 1,5cm (aproximadamente). Estes painéis formam um cubo, no interior do qual se coloca algum alimento de modo a servir de "isco".

Uma vez montada, as aves apenas podem entrar na armadilha por dois funis de entrada, colocados em duas faces laterais opostas. Após entrarem dentro da armadilha as aves dificilmente conseguem encontrar o caminho de saída, sendo então capturadas com a ajuda de um "camaroeiro". De modo a evitar que as aves permaneçam muito tempo dentro da armadilha, esta é monitorizada continuamente à distância, com o auxílio de binóculos e/ou telescópio.

Figura 1. Representação esquemática da armadilha utilizada para capturar exemplares de Pega-azul (*Cyanopica cyanus*).



Legenda.

A – Esquema do painel 1; este painel possui uma pequena porta no canto inferior direito de modo a permitir entrada dentro da armadilha para capturar as aves que aí se encontram.

B – Esquema dos painéis 2 e 3; estes painéis possuem no canto inferior esquerdo um funil de entrada na armadilha, construído em rede.

C - Esquema dos painéis 2 e 3; estes painéis são constituídos totalmente por rede metálica e não possuem portas ou funis de entrada.

D - Esquema da armadilha montada, onde se indica a posição de cada um dos painéis.

Anexo II

Protocolo de Extracção de DNA

Reagentes.

A - Tampão de lise das células: 0.5M Tris, 0.1M EDTA, 2% SDS, pH 8.8, autoclave

B - Solução de precipitação de proteínas: 5M acetato de amónia, pH 8.0, autoclave

C - Solução de hidratação de DNA (TE): 0.1M Tris, 0.5M EDTA, pH 8.0, autoclave

D - Proteinase K (25mg/mL)

E - RNAase (10mg/mL)

F - Isopropanol (-20°C)

G - Etanol 70% (-20°C)

1. Colocar um pequeno volume de tecido (10 - 20 mg) em 600 µL de **Tampão de lise das células (A)**.
2. Incubar a 65°C durante 15 minutos.
3. Homogeneizar o tecido com cuidado, usando as pontas intermédias das micropipetas.
4. Adicionar 5 µL de **Proteinase K (D)** e agitar no vórtex rapidamente.
5. Incubar a 55°C durante 3 horas (pode ficar a incubar toda a noite). Misturar ocasionalmente por inversão.
6. Adicionar 5 µL de **RNAase (E)** e agitar no vórtex rapidamente.
7. Incubar a 55°C durante 15 minutos.
8. Colocar em gelo de forma a que a temperatura baixe a menos de 20°C .
9. Adicionar ao volume anterior 200 µL de **Solução de precipitação de proteínas (B)**.
10. Agitar no vórtex cerca de 20 segundos e centrifugar 10 minutos a 13 000 rpm.
11. Colocar o sobrenadante em *eppendorfs* de 1.5 mL.
12. Adicionar 600 µL de **Isopropanol** a -20°C **(F)** e misturar bem, invertendo o tubo várias vezes.
13. Colocar no congelador, a -80°C, durante cerca de 30 minutos.
14. Centrifugar durante 30 minutos a 13 000 rpm.
15. Deitar for a o sobrenadante com cuidado, para que a *pellet* não caia.
16. Adicionar 1 mL de **Etanol** 70% a -20°C **(G)** e agitar no vórtex.
17. Centrifugar durante 15 minutos a 13 000 rpm.
18. Deitar for a o sobrenadante cuidadosamente.
19. Centrifugar ligeiramente e retirar os restos de etanol com a ajuda de uma micropipeta.
20. Deixar secar até que o todo o Etanol tenha evaporado.
21. Adicionar 50 a 200 µL de **TE (C)** ou de água ultra pura.

Anexo III

Protocolo de Purificação dos Produtos de Extracção de DNA

Reagentes.

A - Polietilenglicol (PEG) 6000 ou 8000

B - NaCl 5M

C - Etanol 70% (-20°C)

D - Solução de hidratação de DNA (TE): 0.1M Tris, 0.5M EDTA, pH 8.0, autoclave

1. Prepara a **solução de PEG/NaCl**: 24% PEG 6000 (ou 8000), 3M NaCl.
    a. Dissolver num agitador magnético com aquecimento (70°C) 12g de PEG 6000 (**A**) em 30 mL de NaCl 5M (**B**).
    b. Adicionar água ultra pura até perfazer 50 mL.
2. Misturar muito bem o extracto de DNA com a **solução de PEG** (ver ponto 1) na proporção de 1:1.
3. Incubar a 37°C durante 10 minutos.
4. Centrifugar durante 20 minutos a 16 000 rpm, à temperatura de 4°C.
5. Deitar fora o sobrenadante com cuidado, para que a *pellet* não saia.
6. Adicionar 1 mL de **Etanol** 70% a -20°C (**C**) e agitar no vórtex.
7. Colocar em gelo ou no congelador durante 30 minutos.
8. Centrifugar durante 15 minutos a 13 000 rpm.
9. Deitar fora o sobrenadante cuidadosamente.
10. Centrifugar ligeiramente e retirar os restos de etanol com a ajuda de uma micropipeta.
11. Deixar secar até que o todo o Etanol tenha evaporado.
12. Adicionar 50 a 200 µL de **TE** (**D**) ou de água ultra pura.

Anexo IV

Purificação dos Produtos de PCR pelo Método Ezimático

Reagentes.

Produto de PCR
Fosfatase alcalina
Exonuclease

1. Adicionar 1 µL de Exonuclease por cada 5 µL de produto de PCR.
2. Adicionar 0.5 µL de Fosfatase alcalina por cada 5 µL de de produto de PCR.
3. Incubar a 37°C durante 20 minutos.
4. Aumentar a temperatura para 80°C e deixar incubar durante 15 minutos. Este passo destina-se a inactivar ambas as enzimas.

Anexo V

Protocolo de Sequenciação de Fragmentos de DNA

1. Preparação da Reacção de Sequenciação.

Componente da reacção	Quantidade (por cada amostra a sequenciar)
TRR ou BigDye	2 µL
Produto de PCR	≤ 2.5 µL [1]
Primer (2.7 pmol de uma solução 5µM)	0.54 µL
H_2O	Perfazer até 10 µL

[1] Ajustar em função da quantidade de produto e da sua origem.

2. Programação dos Ciclos no Termociclador.

Fase	Duração	Temperatura	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	3 minutos	94°C	X 1
Desnaturação	10 segundos	96°C	X 25
Annealing	5 segundos	50°C [2]	
Extensão	4 minutos	60°C	
	∞	4°C	-

[2] Ajustar a temperatura de *Annealing* em função do Tm do *primer*.

3. Precipitação do Produto da Reacção de Sequenciação.

a. Preparar uma solução de *Sephadex* G50 6,7% (p/v).
b. Lavar as colunas com 550 µL de água ultra pura e centrifugar a 4 000 rpm durante 4 minutos.
c. Agitar **muito bem** a solução de *Sephadex* G 50.
d. Colocar uma coluna num tubo colector e pipetar 750 µL de *Sephadex* G50 (ver ponto *a.*)
e. Centrifugar a 4 000 rpm durante 4 minutos.
f. Desprezar a água e guardar o tubo colector.
g. Colocar a coluna num *eppendorf* de 1.5 mL.

3. Precipitação do Produto da Reacção de Sequenciação (continuação).

h. Adicionar **cuidadosamente** os 10 µL da reacção de sequenciação (ver ponto **1.**); deve ficar todo no centro da coluna de *Sephadex* que se formou.
i. Centrifugar a 4 000 rpm durante 4 minutos.
j. Secar a *pellet* a 96°C por alguns minutos com a tampa do *eppendorf* aberta.

4. Ressuspensão da *pellet*.

a. Adicionar 14 µL de TSR (*Template Supression Reagent*) à *pellet*.
b. Deixar a *pellet* hidratar durante 10 minutos.
c. Misturar bem no vórtex (≈ 40 segundos) e centrifugar brevemente (≈ 10 segundos).
d. Desnaturar o DNA a 94°C durante 3 minutos.
e. Colocar os *eppendorfs* em gelo durante 5 minutos.
f. Misturar bem no vórtex (≈ 40 segundos) e centrifugar brevemente (≈ 10 segundos).
g. Transferir os 14 µL para os tubos de 0.5 mL do ABI 310 e tapar.

Anexo VI

Sequência de mtDNA de *Cyanopica cyanus*

Ásia (ave asiática, cuja identidade subespecífica é desconhecida)

Comprimento: 1190 bp

```
   1  ttaggatctttcgccctatcaatcctcatcatcctcctatcaacatatagaactaacccaatggccctaaatcta   75
  76  cgcaaaaaccacccccctactaaaaatcatcaacgactccttagtcgaccttccaaccccatcaaacatttcaacc  150
 151  tgatgaaactttggatccctactaggcatctgtctcgtcacacaaatcgttacaggtctcctactagccatgcac  225
 226  tataccgcagacacttccttagcctttgcctcagtagctcacacatgccgaaacgtacaattcggatgactaatc  300
 301  cgaaacctgcatgcaaacggagcctctttcttcttcatctgcatctacctacacattggccgaggaatctactac  375
 376  ggatcctacctaaataaagaaacctgaaatgtaggagtaatcctcctcctaaccttaatagcaactgccttcgta  450
 451  ggatatgtactaccttgaggacaaatatccttctgaggcgctaccgttattaccaacctcttctcagcaatccca  525
 526  tacatcggacaaacactagtagagtgactctgaggcggattctcagtggacaacccaacactgactcgatttttc  600
 601  gccctacactttctactccccttgtaatcgcaggcctgacactagtccacctgaccttcctacatgaaacaggc  675
 676  tcaaacaacccactaggaatcccatcagactgcgataaaatcccattccacccttactactctatcaaagaccta  750
 751  ctaggtttcgcgctaatactaatcctactcgccactttagcattattctccccaacctactaggagacccagaa  825
 826  aacttcacgcccgccaacccactagccacacccccctcatattaaacctgagtgatacttcctatttgcctatgcc  900
 901  atcctccgatccatcccaaacaaattaggaggagtcctagccctagccgcctccgtactaatcctattcttaatc  975
 976  cccctgctgcacacctctaaacaacgctcaataaccttccgaccattatcccaaatcctgttttgaactctagta 1050
1051  gccgacctcctcatcctaacatgagtcgggagccaaccagtcgaacacccattcatcatcatcggacaattagct 1125
1126  tcatttgcctacttcacaattatcctaatcctattccccattgtgagtgccctagagaacaaaat            1190
```

Sequência de mtDNA de *Cyanopica cooki*

Lagoaça (L)

Comprimento: 1156 bp

```
   1  -taggatctttcgccctatcaatcctcattatccttatatcaacatacagaaccaacccaatggccccaaatcta   75
  76  cgcaaaaaccacccctactaaaaatcatcaacgactccctaatcgaccttccaactccatcaaacatctcatcc  150
 151  tgatgaaactttggatccctactaggtatctgtctcattacacaaatcgtcacaggcctcctactagccatgcac  225
 226  tataccgcagacacttccttagcctttacctcagtagctcacacatgccgaaacgtacagttcggatgactaatc  300
 301  cgaaacctccacgcaaacggagcttccttcttcttcatttgcatctacctacacattggccgaggaatctactat  375
 376  ggatcatacctaaacaaagagacctgaaatgtcggagtaatcctcctcctgaccttaatagcaaccgccttcgta  450
 451  ggatatgtcctaccttgaggacaaatatccttctgaggcgctaccgttattaccaacctcttctcagcaatccca  525
 526  tacatcggacaaacactagtagaatgactctgaggcgggttctcagtggacaatccaacactaactcggttcttc  600
 601  gccctacatttcctacttccatttgtaatcgcaggcctgacactagttcacctaaccttcctacatgaaacaggc  675
 676  tcaaataacccactaggaattccatcagactgcgataaaatcccattccacccctactactccttcaaagaccta  750
 751  ctaggtttcgcgctaatactaatctcactcgccactttagcattattctccccaacctactaggagacccagaa  825
 826  aacttcacgcccgccaacccgctagccacaccgcctcatattaaacctgaatgatatttcctatttgcctacgcc  900
 901  atcctccgatccattccaaacaaattaggaggagtcctggccctagccgcctctgtactgatcctattcttaatc  975
 976  cccctactacatgtctctaaacaacgctcaataacctttcgaccactatcccaagttctgttctgaaccctagta 1050
1051  gccgacctcctcatcctaacatgagtcggaagccaaccagtcgaacatccattcatcatcatcggacaattagct 1125
1126  tcactcgcctacttcacaattatcctttacct                                            1156
```

Tabela VI. Posições variáveis nas sequências de Pega-azul; os pontos significam identidade com a sequência de referência (L), apresentada no topo da tabela; as letras representam uma diferença de nucleotídeos face à sequência de referência (continua).

Posição	8	16	30	35	36	37	46	48	50	54	68	73	102	105	106	107	108	115	117	118	120	129	132	144	148	168	172	177	187	189	201	207	217	225	230	241	253	279
L	c	c	t	t	t	a	t	c	g	c	c	c	c	c	a	a	c	c	a	a	c	a	t	t	t	c	c	t	a	t	c	c	g	c	c	t	a	c
B 01																																						
B 04																																						
B 05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 06										.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 07																																						
B 08	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a
B 11																																						
B 13																																						
B 15													g		g						g																	
B 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 17	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 18											.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 20																																						
B 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 22																																				g		
B 23	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BZ 10																																	c	g				
BZ 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BZ 40	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 11																																						
A 14													.	.	.	c	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 43			.	a													a		c														t					
A 143	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 144																																						
A 145																											.	g	.	c	.	.	.	g	.	.	.	.
A 148																											g	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.
AZ 12																																						
AZ 13													.	t	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AZ 16	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AZ 17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AZ 18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AZ 19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AZ 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ID 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ID 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
S III	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P 12	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PO 12	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PO 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C.cyanus **Ásia**	.	.	c	.	c	c	.	t	.	t	t	.	.	.	.	.	.	t	.	g	.	.	c	c	a	.	.	c	g	c	t	t	.	.	.	.	g	.
C. cyanus kansuensis																																						
C. cyanus pallescens																																						
C. cyanus swinhoei																																						

Tabela VI. (continuação).

Posição	285	294	306	309	312	324	327	339	353	357	362	366	369	370	372	373	375	378	380	381	390	396	397	402	403	408	409	410	414	426	439	441	442	459	549	564	572	573
L	g	a	c	c	c	t	c	t	a	t	g	a	c	t	c	t	t	a	c	a	c	g	a	a	a	c	g	g	a	g	a	c	g	c	a	g	t	g
B 01																														a								
B 04																														a								
B 05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.
B 07																														a								
B 08	.	.	.	.	.	c	.	.	t	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.
B 10	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 11																																						
B 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																												
B 15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.															
B 16	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.
B 17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.									
B 18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.															
B 19	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	c	c	.	a	t	.	.																					
B 20	.	t	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a								
B 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
B 22	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.										
B 23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	c	c										
BZ 10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	c	.	.					
BZ 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
BZ 40	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.
A 11																													g	a								
A 14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
A 16	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
A 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.
A 43	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
A 143	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	g	.	.					
A 144																														a	.	.	.	.	.	.	.	.
A 145	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	t	.	.	.	.	.									
A 148	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
AZ 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a								
AZ 13	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	c	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
AZ 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.
AZ 17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	g	.	.					
AZ 18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
AZ 19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
AZ 21	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	g	.	.					
ID 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
ID 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	c	.
S III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
P 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
P 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	c					
P 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.
PO 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	c					
PO 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
C 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.									
C 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
C 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.					
C 21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
C.cyanus **Ásia**	a	.	.	g	t	c	t	c	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	c	t	a	.	.	.	a	.	.	.	a	.	t	.	a	g	a	.	.
C. cyanus kansuensis																																				a	.	a
C. cyanus pallescens																																				a	.	a
C. cyanus swinhoei																																						

Tabela VI. (continuação).

Posição	579	582	588	594	595	597	609	612	618	621	624	631	648	654	660	663	681	696	729	738	739	741	763	769	775	776	804	828	831	839	846	858	862	876	878	882	887
L	t	a	a	g	t	c	t	c	t	a	t	g	t	a	c	a	t	t	c	c	t	c	c	c	t	c	c	c	c	c	g	g	c	a	g	t	t
B 01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	g
B 04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 05																																					
B 06																																					
B 07	.	g	.	.	.	.	.	.																											.	.	.
B 08																																					
B 10																								.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 11																																					
B 13																																			.	.	.
B 15																																					
B 16	.	.	.	.	.	.																															
B 17																																					
B 18																																					
B 19																																					
B 20																															.	.	.	.	c	.	.
B 21																																					
B 22																																					
B 23																																	.	.	.	.	.	.
BZ 10																																					
BZ 16																																					
BZ 40	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.																										
A 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.
A 14																																					
A 16																																					
A 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 43																																					
A 143																																					
A 144	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 145																							g	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 148																																					
AZ 12																																					
AZ 13																																					
AZ 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AZ 17																																					
AZ 18																																					
AZ 19																																					
AZ 21																																					
ID 12																												.	t	t	.	.	.	.	.	.	.
ID 13	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	c	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
S III																																					
P 11																																					
P 12																																					
P 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PO 12																																					
PO 21																																					
C 11																																					
C 12																																					
C 13																																					
C 21																																					
C.cyanus **Ásia**	c	.	g	a	.	t	c	t	c	c	.	.	c	g	.	.	c	c	t	t	a	.	.	.	c	t	.	.	.	.	a	c	.	g	.	c	.
C. cyanus kansuensis	c	.	g	a	.	t	c	t	c	c	.	.	c	g	.	.	c	c	t	t	a	.	.	.	c	t	.	.	.	.	a	c	.	g	.	c	.
C. cyanus pallescens	c	.	g	a	.	t	c	t	c	c	.	.	c	g	t	g	c	.	.	t	a	.	.	.	c	t	t	.	.	.	a	c	.	.	.	c	.
C. cyanus swinhoei								t	c	c	.	.	c	g	.	.	c	c	t	t	a	.	.	.	c	t	.	.	.	.	a	c	.	g	.	c	.

Tabela VI. (continuação).

Posição	894	897	911	915	937	939	954	958	960	973	981	984	987	988	989	998	1014	1021	1030	1032	1033	1038	1042	1044	1045	1080	1098	1129	1131	1152	1153	1154
L	c	c	c	t	c	g	t	c	g	a	a	a	t	g	t	a	t	c	g	t	c	c	a	c	c	a	t	c	c	t	t	a
B 01	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 05																																
B 06																																
B 07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 08																																
B 10	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.
B 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 13																																
B 15																																
B 16																																
B 17																																
B 18																																
B 19																																
B 20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B 21																																
B 22																																
B 23	.	.	.	.	.	.	.	a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BZ 10																																
BZ 16																																
BZ 40																																
A 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A 14																																
A 16																																
A 35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	t
A 43																																
A 143																																
A 144	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	t
A 145	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	t
A 148																																
AZ 12																																
AZ 13																																
AZ 16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	a	t
AZ 17																																
AZ 18																																
AZ 19																																
AZ 21																																
ID 12	.	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ID 13	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
S III																																
P 11																																
P 12																																
P 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PO 12																																
PO 21																																
C 11																																
C 12																																
C 13																																
C 21																																
C.cyanus **Ásia**	.	t	.	c	.	a	c	.	a	.	g	g	c	a	c	.	c	t	a	c	.	t	.	t	.	g	c	t	t	a	a	t
C. cyanus kansuensis	.	t	.	c	.	a																										
C. cyanus pallescens	.	t	.	c	.	a																										
C. cyanus swinhoei	.	t	.	c	.	a																										