Sistemática e Biogeografia Histórica da
Família Conopophagidae
(Aves: Passeriformes): Especiação nas
Florestas da América do Sul

Rodrigo Oliveira Pessoa

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento do Genética e Biologia Evolutiva

Sistemática e Biogeografia Histórica da Família Conopophagidae (Aves: Passeriformes): Especiação nas Florestas da América do Sul

Rodrigo Oliveira Pessoa

Orientadora: *Profa. Dra. Cristina Yumi Miyaki*

Co-orientador: *Prof. Dr. Luis Fabio Silveira*

Tese de Doutorado submetida à Banca Examinadora designada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Universidade de São Paulo - IB/USP, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

São Paulo
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Pessoa, Rodrigo Oliveira

Sistemática e Biogeografia Histórica da Família Conopophagidae (Aves: Passeriformes): Eventos de especiação a partir das relações entre áreas de endemismo na América do Sul.
i + XXXX páginas

Orientadores: Dra. Cristina Yumi Miyaki; Dr. Luís Fabio Silveira.
Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo,
Instituto de Biociências.

1. Especiação 2. Vicariância 3. Dispersão 4. Filogeografia
I. Miyaki, Cristina Yumi. II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. III. Título

“E que todo dia em que se não haja dançado, pelo menos uma vez, seja para nós perdido! E toda a verdade que não traga ao menos um riso nos pareça verdade falsa.”

Friedrich Nietzsche

Dedico este trabalho as pessoas
mais importantes da minha vida...
à minha mãe e à Patrícia

Agradecimentos

À Cristina Miyaki pela orientação, paciência, confiança e todas as oportunidades oferecidas, que nem sempre consegui aproveitar.

À Anita Wajntal, por sua calma e todos os conselhos.

Ao Luis Fabio, pela ajuda há anos com as *conopophagas*.

À todos os amigos do LGEMA, Zé Patané, Gustavo, Fábio, Fernandos, Erwin, Renatão, Taninha, Adri, Flávia, Cibebe, Poly, Camila, Erika, Priscila e Janaína pela amizade, ajuda em vários momentos difíceis e aulas (muitas vezes sobre coisas sem sentido).

À Lu por toda a ajuda nos bastidores.

Às pessoas que ajudaram nos trabalhos de campo, Zé, Gustavo e Fernando Horta e Giovanni...

Aos colegas e amigos que ajudaram fornecendo amostras, Alexandre Martensen, Luis Fabio, Renato Gaban, Eloisa, Guilherme Brito...

À Gisele, pelas discussões e dicas.

Ao povo do MZUSP e alunos do Luis Fábio pela ajuda nas idas ao lab. e museu.

À todos da casa dos C.A.R.A.S. e amigos de Montes Claros pela amizade e apoio de longa data, mas em especial à Beta e Lemuca pela ajuda com os “finalmentes” da Tese.

À CAPES, pela bolsa e à FAPESP por tornar essa pesquisa possível.

À todos da minha família, em especial minha mãe pela calma e otimismo em todos os momentos, me ajudando a encarar os problemas.

À pessoa mais linda do mundo, a Patrícia, por tudo, estando sempre comigo e ajudando sempre.

Resumo

Na presente Tese foram usados métodos de inferência filogenética e de filogeografia buscando identificar os processos históricos de diversificação do gênero *Conopophaga* na América do Sul, em especial na Mata Atlântica. O monofiletismo do gênero e a estrutura filogeográfica das espécies distribuídas no sudeste da Mata Atlântica (*Conopophaga lineata* e *C. melanops*), foram testados utilizando seqüências de DNA mitocondrial. Para a filogenia foram utilizadas duas matrizes, sendo uma de 2270 pb (941 pb da subunidade 2 da NADH desidrogenase (ND2), 343 pb do ND3 e 986 pb do citocromo b) e outra de 878 pb (461 pb do ND2 e 417 pb do cit b). Nas análises de filogeografia de *C. lineata* e *C. melanops* foram utilizadas seqüências da região controladora de 472 pb e 439 pb, respectivamente. Os resultados demonstraram que o gênero *Conopophaga* é monofilético e que provavelmente uma rápida radiação ocorreu nesse gênero depois da especiação de *C. melanogaster* e de *C. melanops*. Dessa radiação, foram recuperados dois grupos: (1) Um grupo que se distribui somente na Amazônia e mantém a característica ancestral da coloração negra da mandíbula e (2) um grupo distribuindo-se na Amazônia e também na Mata Atlântica e que possui a mandíbula branca. Nesse último grupo, *C. l. cearae* não se agrupou com *C. lineata*, demonstrando que essa espécie não é uma espécie monofilética. A relação entre as espécies que apresentam a mandíbula branca parece indicar a ocorrência de uma conexão entre o leste da Amazônia e a Mata Atlântica no passado. O estudo filogeográfico de *C. lineata* revelou a existência de possíveis eventos de vicariância: (1) na região compreendida pelo Vale do Rio Paraíba do Sul e (2) à oeste de São Paulo e Paraná, separando as populações mais ao sul. Apesar de as inferências filogenéticas realizadas em *C. melanops* e *C. lineata* não serem totalmente concordantes, é possível que exista um padrão de vicariância nessa região. Concluindo, a ocorrência desses eventos vicariantes, tais como eventos geológicos e ciclos de alterações climáticas tenham influenciado na diversificação da família Conopophagidae. Além disso, eventos de dispersão e/ou seleção também podem auxiliar no entendimento da história biogeográfica do grupo, bem como de outros grupos na América do Sul.

Abstract

In order to identify the historical processes of diversification of the genus *textitConopophaga* in South America, especially in the Atlantic forest, methods of phylogenetic and phylogeography inference were used in the present thesis. The genus phylogeny and the phylogeographic structure of two species (*textitConopophaga lineata* and *textitC. melanops*) which occurs in the Southeast of the Atlantic forest were tested using sequences of mitochondrial DNA. Two matrixes were used to perform the phylogenetic analyses. The first one comprising 2270 bp (941 bp of ND2, 343 bp of ND3 and 986 bp of cytochrome b) and the second one comprising of 878 bp (461 bp of ND2 and 417 bp of cytochrome b). The phylogeography analyses of *textitC. lineata* and *textitC. melanops* were done using sequences from the control region consisting of 472 bp and 439 bp, respectively. The results demonstrated that the genus *textitConopophaga* is monophyletic and probably after *textitC. melanogaster* and *textitC. melanops* speciation, a rapid diversification had occurred in this genus. Following this event two distinct groups were recovered: (1) a group distributed in Amazonian, which maintains the ancestral characteristic of black jaw and (2) a group possessing white jaw occurring in the Amazonian and also in the Atlantic forest. In the last group, the subspecies *C. l. cearae* did not grouped with *textitC. lineata* demonstrating that this species is not monophyletic. Moreover, the distribution pattern of species presenting white jaw indicates a plausible a connection between the east of the Amazonian and the Atlantic forest in the past. The phylogeographic study of *textitC. lineata* revealed the existence of possible vicariant events: (1) in the area of Vale do Rio Paraíba do Sul and (2) in the west of São Paulo and Paraná, separating the southern south populations. Although the phylogeographic structure observed in *textitC. melanops* and in *textitC. lineata* are not in total agreement, the occurrence of vicariant events still remains as a possible explanation for the phylogeographic patterns in this region. Finally, the occurrence of these vicariant events like, geological events and climatic oscilations, may have influenced the diversification of the family Conopophagidae. Moreover, dispersion events and/or selection should also be considered for the understanding of biogeographic history of this group and also other

ones in South America.

Sumário

Resumo	xi
Abstract	xiii
Sumário	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxi
1 Introdução Geral	1
1.1 Apresentação	1
1.2 Biogeografia	1
1.3 Florestas Tropicais da América do Sul	3
1.4 Hipóteses para a diversificação de florestas tropicais	4
1.4.1 Rios como barreira	5
1.4.2 Hipótese dos Refúgios	5
1.4.3 Hipótese dos gradientes ecológicos	5
1.5 Estudos filogenéticos	6
1.6 Classificação de Passeriformes, com ênfase nos Furnarioidea	7
Referências Bibliográficas	9
2 Filogenia e Biogeografia da família Conopophagidae (Aves:Passeriformes)	15
2.1 Introdução	15
2.2 Material e Métodos	24
2.2.1 Amostragem	24
2.2.2 Extração de DNA	24
2.2.3 Amplificação (PCR)	24
2.2.4 Purificação dos fragmentos amplificados	27
2.2.5 Reação de seqüenciamento	27
2.2.6 Precipitação dos produtos para seqüenciamento	27
2.2.7 Seqüenciamento automático	28

2.2.8	Análise das seqüências	28
2.2.9	Reconstruções filogenéticas	28
2.2.10	Análises biogeográficas	29
2.3	Resultados	30
2.3.1	Padrões de variação das seqüências	30
2.3.2	Análises filogenéticas	32
2.3.3	Análises biogeográficas	33
2.4	Discussão	38
2.4.1	Análises moleculares	38
2.4.2	Sistemática	39
2.4.3	Biogeografia	41
	Referências Bibliográficas	45
3	Filogeografia e demografia histórica de <i>Conopophaga lineata</i>	51
3.1	Introdução	51
3.2	Material e Métodos	53
3.2.1	Área de estudo e amostragem	53
3.2.2	Análises moleculares	54
3.3	Resultados	57
3.4	Discussão	62
	Referências Bibliográficas	66
4	Filogeografia comparada entre <i>Conopophaga melanops</i> e <i>C. lineata</i>	71
4.1	Introdução	71
4.2	Material e Métodos	72
4.2.1	Área de estudo e amostragem	72
4.2.2	Análises moleculares	73
4.3	Resultados	76
4.4	Discussão	83
	Referências Bibliográficas	87
5	Considerações Finais	91

Lista de Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucléico
LGEMA	Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves
FMNH	Field Museum of Natural History
ANSP	Academy of Natural Sciences of Philadelphia
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PCR	Reação em cadeia da polimerase
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ND2	subunidade 2 da NADH desidrogenase
ND3	subunidade 3 da NADH desidrogenase
cit b	Citocromo b
DNAmt	DNA mitocondrial
PEG	Polietilenoglicol
NO	norte da América do Sul
SE	sudeste da América do Sul
AmN	norte da Amazônica
AmNO	noroeste da Amazônica
AmNE	nordeste da Amazônia
AmSO	sudoeste da Amazônia
AmSE	sudeste da Amazônia
Ma	Mata Atlântica
MaN	norte da Mata Atlântica
MaS	sul da Mata Atlântica
NAN	Andes Norte
CAN	Andes Central
mels	<i>Conopophaga melanops melanops</i>
nigri	<i>Conopophaga m. nigrifrons</i>
lineata	<i>Conopophaga lineata lineata</i>

vulgaris	<i>Conopophaga lineata vulgaris</i>
cearae	<i>Conopophaga lineata cearae</i>
roberti	<i>Conopophaga roberti</i>
ardes	<i>Conopophaga ardesiaca</i>
casten	<i>Conopophaga castaneiceps</i>
peruviana	<i>Conopophaga peruviana</i>
auraus	<i>Conopophaga aurita australis</i>
aurpalli	<i>Conopophaga aurita pallida/snethlageae</i>
melr	<i>Conopophaga melanogaster</i>
PESM	Parque Estadual Serra do Mar
PETAR	Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira
MP	máxima parcimônia
MV	máxima verossimilhança
AB	análise bayesiana
SH	teste de Shimodaira-Hasegawa
V	vicariância
S	especiação simpátrida
E	extinção
D	dispersão
EnV	eventos sem vicariância
MZUSP	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
VRPS	vale do rio Paraíba do Sul

Lista de Figuras

2.1	Área de distribuição aproximada das espécies do gênero <i>Conopophaga</i> . Desenhos das espécies retirados de Whitney (2003). . .	16
2.2	Áreas de endemismo proposto por Cracraft (1985) para Aves . . .	20
2.3	Classificação das regiões e cladogramas de áreas na região Neotropical proposto por Prum (1988), Amorim & Pires (1996) e Bates et al. (1998). [modificado de Nihei & Carvalho (2007)]	23
2.4	Análise de MV baseada em 2270 pb de seqüências parciais dos genes ND2, ND3 e Cit b. Valores de bootstrap nos nós (MV / MP). . .	33
2.5	Análise de MV baseada em 878 pb de seqüências parciais dos genes ND2 e Cit b. Valores de bootstrap nos nós (MV / MP). . . .	34
2.6	Diagrama de associação entre as relações das áreas de endemismo (à esquerda) e a filogenia de Conopophagidae (à direita). .	35
2.7	Reconstruções biogeográficas com os menores custos para explicar as relações entre áreas de endemismo na América do Sul (Amorim & Pires 1996) e a filogenia de Conopophagidae. □- especiação simpátrida; ●- vicariância; ○- dispersão, sendo ▲ a sua direção e *- extinção.	37
3.1	Area de estudo, localidades amostradas e distribuição das linhagens mitocondriais de <i>Conopophaga lineata</i> . Números correspondentes à Tabela 3.1.	55
3.2	Consenso estrito das 663 árvores mais parcimoniosas (174 passos; CI= 0,781; RI= 0,947), reconstruída a partir de 472 pb da região controladora do DNA mitocondrial. Os números sublinhados representam os nós da Tabela 3.2. Valores de bootstrap nos nós.	59
3.3	Rede de haplotipos baseada em 472 pb da região controladora do DNA mitocondrial. Os agrupamentos desenhados para o NCA estão apresentados.	60

4.1	Área de estudo e localidades amostradas de <i>Conopophaga melanops</i> . Números correspondentes à Tabela 4.1.	74
4.2	Análise de MP baseada em 439 pb (<i>C. melanops</i>) da região controladora do DNA mitocondrial. Valores de bootstrap nos nós (MP / MV).	79
4.3	Redes de haplotipos (MJ) construídas com 439 pb (<i>C. melanops</i> , n=31) e 472 pb (<i>C. lineata</i> , n=77) da região controladora do DNA mitocondrial. As áreas dos círculos representam a frequência dos haplótipos, as cores representam as diferentes linhagens baseada nas árvores filogenéticas e o tamanho das linhas é proporcional ao número de mutações. Os pontos pretos estão representando os haplótipos hipotéticos.	80

Lista de Tabelas

2.1	Táxons amostrados, número na coleção e localidades de coleta. .	25
2.2	Espécies, coleções e número de acesso das seqüências obtidas no Genbank e usadas nesse estudo.	26
2.3	Primers utilizados para amplificar (A) e sequenciar (S)	26
2.4	Números de sítios total, variáveis e informativos para parcimônia, composição de bases e taxa de transição e transversão para cada gene e para os dados combinados.	30
2.5	Médias das distâncias-p (%) para o conjunto de dados concatenados (2270 pb, abaixo da diagonal e 878 pb, acima da diagonal) entre grupos de indivíduos pertencentes a cada táxon. <i>C.m.- Conopophaga melanops</i> , <i>C.a.- C. aurita</i> , <i>C.l.- C. lineata</i>	31
2.6	Características das doze reconstruções com menores custos obtidas baseadas nas hipóteses de áreas de endemismo de três trabalhos e na filogenia de conopofagídeos. Os eventos (V- vicariância; S-simpatria; E- extinção; D- dispersão e EnV, eventos sem vicariância) e seus custos estão apresentados.	36
3.1	Localidades das coletas, haplótipos, tamanho amostral (N) e coordenadas geográficas das amostras de <i>C. lineata</i> utilizadas. . . .	54
3.2	Distância genética, desvio padrão e estimativa de tempo de divergência baseado em duas taxas. Os tempos mínimos e máximos estimados para cada nó (em parenteses) foram calculados baseados no desvio padrão.	61
3.3	Parâmetros relacionados à demografia histórica (Fs de Fu) e tempo de expansão de dados de <i>C. l. vulgaris</i>	61
3.4	Resultados da <i>Nested Clade Analysis</i> para os clados com associação geográfica significativa.	61
4.1	Indivíduos de <i>C. melanops</i> utilizados, número na coleção e localidades de coleta.	75

4.2	Características e variabilidade observadas para a região controle das espécies <i>C. lineata</i> e <i>C. melanops</i>	78
4.3	Parâmetros relacionados a demografia histórica (Fs de Fu) e tempo de expansão de dados de <i>C. l. vulgaris</i> e <i>C. melanops</i>	81
4.4	Distância genética, desvio padrão e estimativa de tempo de divergência baseado em duas taxas. Os tempos mínimos e máximos estimados para cada nó (em parenteses) foram calculados baseados no desvio padrão	82

Introdução Geral

1.1 Apresentação

A presente Tese apresenta as relações evolutivas entre espécies do gênero *Conopophaga*, sendo analisada a história biogeográfica de ambientes florestais da América do Sul e as propostas de origem de sua diversidade. Nesse contexto, é dada ênfase aos processos de diversificação que originaram o padrão de distribuição das linhagens na Mata Atlântica.

O trabalho está organizado em forma de capítulos. Nesse primeiro a disciplina biogeografia é apresentada, abordando seus métodos e algumas hipóteses para explicar a origem da diversidade Neotropical. Também é apresentado um breve resumo sobre as características das espécies e dos blocos florestais da América do Sul analisados. Já nos capítulos 2 a 4 são apresentados os resultados obtidos em forma de manuscritos a serem submetidos para publicação. Finalmente, no último capítulo são feitas as considerações finais e conclusões a respeito dos capítulos apresentados em forma de manuscrito.

1.2 Biogeografia

A biogeografia é a disciplina que tenta explicar a distribuição dos organismos ou táxons sobre a Terra. Dependendo da escala de tempo sendo investigada, seja um curto período ecológico ou um longo período evolutivo, a disciplina é subdividida em Biogeografia Ecológica e Histórica (Myers & Giller 1988). A biogeografia ecológica trata de examinar a distribuição dos táxons e os mecanismos que mantêm ou alteram essa distribuição (Nelson & Rosen 1981). Já a biogeografia histórica tenta explicar a origem da distribuição atual

dos táxons através de processos históricos: especiação alopátrida, simpátrida, extinção e dispersão. Essa disciplina também pode combinar informações sobre a distribuição atual dos táxons com hipóteses sobre as relações de cladogênese entre esses táxons para inferir as conexões históricas entre suas áreas (Rosen 1978).

Dentro da biogeografia histórica, a escola dispersionista explica as distribuições disjuntas de alguns táxons como sendo resultado de um evento de dispersão do táxon ancestral através de uma barreira pré-existente, a partir de um centro de origem. Já para a escola vicariante, a distribuição disjunta é resultado de eventos vicariantes (Myers & Giller 1988). Como resultado desses eventos, o táxon ancestral é dividido em duas populações disjuntas que podem se diferenciar em dois táxons alopátridos descendentes (Nelson & Rosen 1981). Apesar da biogeografia histórica ser dividida em duas escolas, as explicações para a distribuição de grupos monofiléticos não pode ser vista isoladamente como eventos de dispersão ou eventos vicariantes. Táxons amplamente distribuídos e em simpatria indicam que nem todos os padrões biogeográficos são resultados de vicariância isoladamente, e sugerem que a dispersão também foi importante. Sendo assim, mesmo que a biogeografia vicariante assuma *a priori* vicariância, os métodos utilizados devem também considerar a dispersão como um evento possível.

A Biogeografia Vicariante também pode ser dividida em duas disciplinas: Panbiogeografia e Biogeografia Cladística, dependendo de como a história das distribuições é reconstruída (Wiley 1988).

A Panbiogeografia, proposta inicialmente por Croizat (1958), reconstrói a história da distribuição dos táxons através do desenho de linhas em um mapa. Sendo assim, distribuições de espécies ou táxons são conectados por linhas chamadas de traçados ("tracks"). A união de um par de áreas de distribuição disjunta é denominado traçado individual. À concordância entre traçados individuais é dado o nome de traçado generalizado. Esses traçados generalizados têm sua explicação na existência de processos que ocorreram sobre conjuntos de táxons que se distribuem de maneira semelhante geograficamente (Croizat 1958). Para o autor, esse fator comum não poderia ser dispersão, mas sim vicariância.

A biogeografia cladística utiliza métodos que combinam cladogramas de táxons com suas respectivas distribuições geográficas (Morrone & Carpenter 1994; Croizat 1982). Dessa maneira, é possível gerar cladogramas de áreas que podem ser usados para se levantar hipóteses sobre as relações históricas entre as áreas. Vários métodos são utilizados para propor processos de vicariância, extinção e dispersão que possam explicar a distribuição atual dos táxons nessas áreas (Nelson & Rosen 1981; Nelson & Platnick 1981; Rosen

1978). É possível distinguir dois grupos metodológicos dentro da biogeografia cladística (Ronquist & Nylin 1990): *a)* métodos baseados em padrões (Cracraft 1988) e *b)* métodos baseados em eventos (Ronquist 1997; Charleston 1996). O primeiro grupo metodológico é derivado de padrões congruentes encontrados, por exemplo, em cladogramas de áreas. Dessa maneira, hipóteses gerais são inferidas a partir desses cladogramas, para explicar a distribuição dos táxons. Já os métodos baseados em eventos foram propostos para acomodar cenários biogeográficos reticulados (Ronquist & Nylin 1990). Esses cenários são obtidos pela diferenciação de custos para os diferentes processos (vicariância, dispersão e extinção). Com isso, é possível propor seqüências históricas de eventos vicariantes e não somente relatar a relação entre as áreas (Hovenkamp 1997).

1.3 Florestas Tropicais da América do Sul

A diversidade e o alto grau de endemismo encontrados na região Neotropical sempre atraiu a atenção dos evolucionistas. Essa região biogeográfica abrange os trópicos do Novo Mundo, compreendendo a América do Sul, toda a América Central, sul do México e sul da península da Flórida. Dentro dessa região, destaca-se a América do Sul por sua variedade de biomas que abriga a mais diversa biota e avifauna do mundo (Ridgley & Tudor 1989, 1994).

A diversidade de habitats na América do Sul pode ser dividida em florestas úmidas e em áreas secas. Existem diferentes classificações para esses habitats (Hueck & Seibert 1972; Ab'Saber 1977; Mares 1992; Dinerstein et al. 1995), entretanto, na presente Tese somente abordaremos os principais habitats florestais.

Dentre as 3750 espécies de aves da região Neotropical (Stotz et al. 1996), aproximadamente 3200 ocorrem somente na América do Sul (Sibley & Ahlquist 1990). Isso confere às florestas tropicais sul-americanas a maior diversidade de aves do mundo (Haffer 1997; Nores 2000). Os principais habitats florestais sul-americanos são as florestas Amazônica e Atlântica (Leitão-Filho 1987).

A Floresta Amazônica é a região com maior diversidade do planeta, quando se considera a riqueza de espécies de plantas vasculares, peixes, anfíbios, mamíferos e aves. A Amazônia se estende através das florestas das bacias do Rio Amazonas e seus afluentes e florestas das Guianas, ao norte da América do Sul. É formada floristicamente por tipos vegetais bastante distintos, sendo a Mata de Terra Firme a que ocupa a maior área (Leitão-Filho 1987), cerca de 90% de toda a região amazônica, estando sobre solos de fertilidade variável. Nos últimos 30 anos essa região vem sofrendo desmatamento acelerado, principalmente ao sul da Amazônia Brasileira. Sua biogeografia é complexa,

apresentando espécies de distribuição restrita, muitas vezes limitada pelos principais rios. Além dessas, ocorrem também espécies originadas em outros ecossistemas, com influência de elementos atlânticos, por exemplo (Prance 1982). Apesar de alguma similaridade com outros ecossistemas, a Floresta Amazônica é muito distinta das outras formações florestais.

Outro importante bioma florestal sul-americano é a Floresta Atlântica. Esse bioma possui elevado grau de endemismo e biodiversidade, estando as variações de latitude e altitude dentre os fatores mais relevantes para explicar tais características (Rizzini 1997). O clima é outro fator que se altera ao longo da distribuição, variando desde sub-úmido no nordeste, a extremamente úmido no sudeste e sul (Fonseca 1985). Esta variabilidade também é observada em sua formação vegetal, apresentando grande diversidade de tipos, sendo os principais: a) florestas ombrófilas densas; b) florestas ombrófilas mistas (matas de araucárias); c) florestas decíduas e d) florestas semidecíduas. Dentre esta variedade de tipos florestais, a presença de grupos vegetais basais fez com que Joly et al. (1991) sugerissem uma formação muito antiga para a Mata Atlântica, com mais de 140 milhões de anos. Neste contexto, também é sugerido que as Florestas Atlântica e Amazônica foram conectadas no passado através do nordeste ou de corredores de florestas nas bacias do Amazonas, São Francisco e Paraná (Bigarella et al. 1975). Uma hipótese alternativa a estas foi sugerida por Costa (2003), na qual a região central do Brasil teria grande influência na ligação entre estas florestas.

1.4 Hipóteses para a diversificação de florestas tropicais

Segundo Moritz et al. (2000), a maioria das hipóteses para explicar a alta diversidade na região tropical pode ser dividida em duas categorias: aquelas que envolvem baixas taxas de extinção versus aquelas envolvendo altas taxas de especiação. Dessa maneira, uma maior estabilidade ambiental nos trópicos durante o Quaternário levaria esses locais a uma menor taxa de extinção. Além disso, espécies originadas em ambientes mais instáveis como os Andes poderiam ser mantidas, se acumulando ao longo do tempo (Fjeldsa & Lovett 1997; Fjeldsa et al. 1999). Esta teoria pode ser testada comparando grupos irmãos entre regiões tropicais e temperadas Cardillo (1999) ou regiões tropicais com diferentes estabilidades, como tipos diferentes de altitude ou vegetação (Moritz et al. 2000).

Hipóteses alternativas foram sendo propostas contestando essa “estabilidade” e propondo que a instabilidade climática e geológica ocorridas no passado teriam promovido a especiação (Haffer 1997). Neste contexto, foram su-

geridos modelos de processos evolutivos que poderiam ter promovido a diversificação das florestas tropicais. Dentre estes modelos, destacam-se os de “rios como barreira”, “refúgios” e “gradientes ecológicos”.

1.4.1 Rios como barreira

Modelo de especiação alopátrida, no qual rios funcionam como barreira ao fluxo gênico. Desta maneira, as populações isoladas em cada lado divergem-se gradualmente até formarem espécies separadas (Colwell 2000). Este modelo apresenta problemas, pois a influência do rio como barreira ao fluxo gênico pode variar ao longo do seu curso (Ayres & Clutton-Brock 1992), além de a sua localização poder ser extremamente dinâmica em períodos curtos ou longos de tempo (Lundberg et al. 1998). Poucos estudos têm usado técnicas moleculares para testar a influência dos rios como barreira, sendo a maioria concentrado na região da Amazônia (Moritz et al. 2000).

1.4.2 Hipótese dos Refúgios

Este também é um modelo de especiação alopátrida, no qual se assume que mudanças climáticas reduziram as florestas tropicais úmidas em “refúgios” isolados e que este isolamento promoveu a especiação. Inicialmente eram discutidos eventos durante os ciclos climáticos do Pleistoceno. Entretanto, atualmente este modelo foi estendido ao Terciário, assumindo que os ciclos Milankovitch seriam suficientes para promover a especiação (Haffer 1993; Haffer 1997).

Dados moleculares foram coletados em poucos sistemas assim que este modelo foi postulado. Segundo Moritz et al. (2000), estes locais podem ser resumidos a algumas regiões de elevação moderada na África, América do Sul e leste da Austrália. Na América do Sul, a Floresta Atlântica é uma das regiões de maior índice de espécies endêmicas, sendo os refúgios propostos para explicar as áreas em que em essas estão distribuídas (Brown Jr. 1982; Brown 1987). Entretanto, poucos dados moleculares estão disponíveis para essas regiões, e testes filogeográficos analisando o modelo para estes refúgios ainda são escassos (Silva & Patton 1998).

1.4.3 Hipótese dos gradientes ecológicos

Diferentemente dos outros modelos já citados, o modelo dos gradientes ecológicos não tem o isolamento total do fluxo gênico como pré-requisito para que ocorra a especiação (Endler 1977; Orr & Smith 1998). Neste caso, o modelo se baseia na seleção através de um forte gradiente ambiental, resultando em

divergência adaptativa e especiação. Com isto, é esperado que espécies irmãs ocorram em ambientes adjacentes, porém distintos. Exemplos de evidências deste modelo são as freqüentes regiões de hibridação localizadas em ecótonos (Endler 1982).

Testes utilizando dados morfológicos somados aos de divergência genética (dados moleculares) foram utilizados para testar este modelo. Na África Central, Smith et al. (1997, 2000) estudaram espécies de aves que se distribuíam amplamente, tanto em uma floresta úmida central, quanto em um mosaico floresta-savana ao redor. Estes autores utilizaram a divergência genética como medida de fluxo gênico. Apesar da baixa divergência genética entre mosaico e a floresta, foi observada uma maior diferenciação morfológica entre estes habitats do que dentro dos mesmos. No Brasil, Aleixo (2002) testou a importância dos gradientes ecológicos na diversificação de espécies do gênero *Xiphorhynchus* que ocorrem na várzea e terra-firme na região amazônica, rejeitando esta hipótese.

As análises a partir dessas hipóteses ou qualquer outro estudo biogeográfico é dependente de reconstruções filogenéticas corretas. Não há sentido em tentar explicar a distribuição de um táxon a não ser que seus membros realmente constituam grupos monofiléticos. Sendo assim, mais estudos sobre a filogenia de espécies florestais na região Neotropical são necessários para tentar compreender os padrões biogeográficos dessa região.

1.5 Estudos filogenéticos

A filogenia é o ramo da biologia que estuda as relações de ancestralidade entre espécies a partir de organismos atuais ou fósseis que dispomos no presente. Uma árvore filogenética representa então a história evolutiva dos grupos presentes nela (Felsenstein 2004). Desde os anos setenta, estudos filogenéticos têm sofrido mudanças, tornando-se uma ciência mais precisa e objetiva. Vários fatores podem ter contribuído para estas mudanças, sendo os principais: (a) o refinamento e divulgação de métodos cladísticos; (b) a introdução de métodos quantitativos moleculares, e (c) o desenvolvimento de métodos numéricos para tratar novos tipos de dados, auxiliando a estimar e comparar filogenias. Atualmente, dados filogenéticos são considerados essenciais em análises de processos evolutivos históricos (Sheldon & Bledsoe 1993).

A compreensão de processos que geram a diversidade biológica, organizando os organismos em um sistema geral de referência é um dos objetivos principais da sistemática. A sistemática filogenética sugere que este sistema deve refletir as relações filogenéticas entre os táxons incluídos na classificação (Wiley et al. 1991). Segundo Amorin (1994), este é um dos objetivos de

praticamente todos os campos da Biologia.

A filogenia molecular surge com o desenvolvimento de técnicas moleculares, possibilitando o estudo das relações evolutivas entre os organismos utilizando marcadores moleculares. Estes estudos também possibilitaram estimar o tempo de divergência entre grupos, permitindo a associação dessa data a eventos geológicos (Graur & Li 2000). Os primeiros trabalhos de filogenia molecular surgem a partir dos anos oitenta (Sheldon & Bledsoe 1993). Apesar de controvérsias relacionadas a limitações da metodologia empregada, pode-se destacar o trabalho de Sibley & Ahlquist (1981) sobre filogenia molecular de aves ratitas baseada na hibridação DNA-DNA. Em 1990 estes autores publicam seu livro utilizando representantes de praticamente todas as ordens de Aves na tentativa de entender as relações entre esses grupos (Sibley & Ahlquist 1990).

Atualmente, reconstruções filogenéticas de grupos em diferentes níveis taxonômicos têm utilizado seqüências de DNA mitocondrial e nuclear. Johansson et al. (2002) utilizaram seqüências de c-myc e RAG-1 (DNA nuclear) e cyt-b (DNA mitocondrial) com o objetivo de reconstruir a filogenia dos Tyrannoidea (Aves: Suboscines), concluindo que este é um grupo monofilético. Irestedt et al. (2002) também utilizaram seqüências mitocondriais e nucleares objetivando reconstruir a filogenia dos Furnarioidea (Aves: Suboscines), permitindo realizar análises biogeográficas.

1.6 Classificação de Passeriformes, com ênfase nos Furnarioidea

Na presente Tese foi utilizado como modelo de estudo um grupo de aves da família Conopophagidae pertencente à ordem Passeriformes. Esse grupo será brevemente descrito a seguir.

A ordem Passeriformes é um grupo monofilético formado pelo maior número de espécies dentro da classe Aves, abrangendo mais da metade do número total (Sibley & Ahlquist 1990). É dividido em duas subordens com base sobretudo na estrutura da siringe: Oscines (Passeri) e Suboscines (Tyranni) (Ames 1971; Sibley & Ahlquist 1990). A dicotomia da ordem também é sustentada com base em outros caracteres morfológicos (Feduccia 1974; Rainkow 1982) e moleculares (Edwards et al. 1991; Irestedt et al. 2001). A subordem Oscines é adaptada a quase todos os tipos de hábitat, sendo formada por aproximadamente 80% das espécies de Passeriformes em todo o mundo. Já os Suboscines possuem sua distribuição praticamente restrita à região Neotropical, apresentando poucas famílias no Velho Mundo e alguns poucos gêneros na América do Norte (Ericson et al. 2002).

Atualmente são reconhecidas 14 famílias de Suboscines, sendo 11 distribuídas no Novo Mundo e divididas em duas superfamílias (Irestedt et al. 2001). A superfamília Tyrannoidea é composta pelas famílias Tyrannidae, Pipridae, Cotingidae, Oxyruncidae e Phytotomidae, enquanto que a superfamília Furnarioidea é composta pelas famílias Dendrocolaptidae, Furnariidae, Formicariidae, Thamnophilidae, Conopophagidae e Rhinocryptidae.

A superfamília Furnarioidea é endêmica da região Neotropical, sendo atualmente reconhecidas cerca de 560 espécies. As relações filogenéticas entre as famílias desse grupo ainda não são bem resolvidas (Ericson et al. 2003). Vários autores propuseram diferentes relações entre a família Conopophagidae e as demais (Irestedt et al. 2001; Sibley & Ahlquist 1990; Ames 1971; Lovette & Bermingham 2000). Ames (1971), propôs com base na morfologia da siringe, que a família Conopophagidae teria uma história filogenética mais recente com as espécies terrícolas da família Formicariidae. No entanto, Sibley & Ahlquist (1990) utilizando técnicas de hibridação DNA-DNA propuseram que a família Rhinocryptidae é a que estaria mais proximamente relacionada à Conopophagidae. Mais recentemente, Lovette & Bermingham (2000) estudando o proto-oncogene *c-mos* sugeriram que a família Thamnophilidae formaria um grupo monofilético com o gênero *Conopophaga*. No entanto, esse clado só teve suporte na reconstrução por máxima verossimilhança. Posteriormente essa relação também teve suporte nos trabalhos de Irestedt et al. (2001, 2002) e Ericson et al. (2003). Sendo assim, a relação dos conopofagídeos com outras famílias de Furnarioidea ainda é incerta. As características principais das espécies do gênero *Conopophaga* estão descritas no capítulo 2.

Referências Bibliográficas

- Ab'Saber, A. N. (1977). Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. *Geomorfologia* 52, 1–22.
- Aleixo, A. (2002). Molecular systematics and the role of várzea -terra-firme ecotone in the diversification of *Xiphorhynchus* woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Auk* 119, 621–640.
- Ames, P. L. (1971). The morphology of the syrinx in passerine birds. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History* 37, 1–194.
- Amorin, D. S. (1994). *Elementos Básicos de Sistemática Filogenética*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Entomologia.
- Ayres, J. M. C. & T. H. Clutton-Brock (1992). River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist* 140, 531–537.
- Bigarella, J. J., D. Andrade-Lima, & P. J. Riehs (1975). Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 47, 411–464.
- Brown, K. S. J. (1987). Conclusions, synthesis, and alternative hypotheses. In T. C. Whitmore & K. S. Brown (Eds.), *Biogeography and Quaternary History of Tropical America*, pp. 175–196. New York: Oxford University Press.
- Brown Jr., K. S. (1982). Historical and ecological factors in the biogeography of aposematic neotropical butterflies. *American Zoologist* 22, 453–471.
- Cardillo, M. (1999). Latitude and rates of diversification in birds and butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266, 1221–1225.
- Charleston, M. A. (1996). Jungles: a new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem. *Mathematical Biosciences* 149, 191–223.
- Colwell, R. K. (2000). A barrier runs through it... or maybe just a river. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13470–13472.
- Costa, L. P. (2003). The historical bridge between the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30, 71–86.
- Cracraft, J. (1988). Deep-history biogeography: retrieving the historical pattern of evolving continental biotas. *Systematic Zoology* 37, 221–236.
- Croizat, L. (1958). *Panbiogeography*. Caracas: publicado pelo autor.

- Croizat, L. (1982). Vicariance/vicariism, panbiogeography, "Vicariance biogeography", etc.: a clarification. *Systematic Zoology* 31, 291–304.
- Dinerstein, E., D. M. Olson, D. J. Graham, A. L. Webster, S. A. Primm, M. P. Bookbinder, & G. Ledec (1995). *A Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean*. Washington: The World Bank and The World Wildlife Fund.
- Edwards, S. V., P. Arctander, & A. C. Wilson (1991). Mitochondrial resolution of a deep branch in the genealogical tree for perching birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 243, 99–107.
- Endler, J. A. (1977). *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton: Princeton University Press.
- Endler, J. A. (1982). Problems in distinguishing historical from ecological factors in biogeography. *American Zoologist* 22, 441–452.
- Ericson, P. G., M. Irestedt, & U. S. Johansson (2003). Evolution, biogeography, and patterns of diversification in passerine birds. *Journal of Avian Biology* 34, 3–15.
- Ericson, P. G. P., L. Christidis, A. Cooper, M. Irestedt, J. Jackson, U. S. Johansson, & J. A. A. Norman (2002). A Gondwanan origin of passerine birds supported by DNA sequences of endemic New Zealand wrens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269, 235–241.
- Feduccia, A. (1974). Morphology of the bony stapes in New and Old World suboscines: new evidence for common ancestry. *Auk* 91, 427–429.
- Felsenstein, J. (2004). *Inferring Phylogenies*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Fjeldsa, J., E. Lambin, & B. Mertens (1999). Correlation between endemism and local ecoclimatic stability documented by comparing Andean bird distributions and remotely sensed land surface data. *Ecography* 22, 63–78.
- Fjeldsa, J. & J. C. Lovett (1997). Biodiversity and environmental stability. *Biodiversity and Conservation* 6, 315–323.
- Fonseca, G. A. B. (1985). The vanishing Brazilian. *Biological Conservation* 34, 17–34.
- Graur, D. & W. H. Li (2000). Molecular phylogenetics. In D. Graur & W. H. Li (Eds.), *Fundamentals of Molecular Evolution*, pp. 165–247. Sunderland: Sinauer Associates.
- Haffer, J. (1993). Time's cycle and time's arrow in the history of Amazonia. *Biogeographica* 69, 15–45.

- Haffer, J. (1997). Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6, 451–476.
- Hovenkamp, P. (1997). Vicariance events, not areas, should be used in biogeographical analysis. *Cladistics* 13, 67–79.
- Hueck, K. & P. Seibert (1972). *Vegetationskarte von Sudamerika*. Stuttgart: Gustav Fischer.
- Irestedt, M., J. Fjeldsa, U. S. Johansson, & P. G. P. Ericson (2002). Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23, 499–512.
- Irestedt, M., U. S. Johansson, T. J. Parsons, & P. G. Ericson (2001). Phylogeny of major lineages of suboscines (Passeriformes) analysed by nuclear DNA sequence data. *Journal of Avian Biology* 32, 15–25.
- Johansson, U. S., M. Irestedt, T. J. Parsons, & P. G. P. Ericson (2002). Basal phylogeny of the Tyrannoidea based on comparisons of cytochrome b and exons of nuclear c-myc and RAG-1 genes. *Auk* 119, 984–995.
- Joly, C. A., H. F. Leitão-Filho, & S. M. Silva (1991). O patrimônio florístico / the floristic heritage. In I. G. Câmara (Ed.), *Plano de Ação para a Mata Atlântica*, pp. 95–125. São Paulo: Ed. Scritta Oficina.
- Leitão-Filho, H. d. F. (1987). Considerações sobre a florística de florestas tropicais e sub-tropicais do Brasil. *Scientia Forestalis. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais* 35, 41–46.
- Lovette, I. J. & E. Bermingham (2000). c-mos variation in songbirds: Molecular evolution, phylogenetic implications, and comparisons with mitochondrial differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1569–1577.
- Lundberg, J. G., L. G. Marshall, J. Guerrero, B. Horton, M. C. S. L. Malabarba, & F. Wesselingh (1998). The stage for Neotropical fish diversification: a history of South American rivers. In M. C. S. L. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena, & C. A. S. Lucena (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical fishes*, pp. 13–48. Porto Alegre: Edipucrs.
- Mares, M. A. (1992). Neotropical mammals and the myth of Amazonian biodiversity. *Science* 255, 976–979.
- Moritz, C., J. L. Patton, C. J. Schneider, & T. Smith (2000). Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 533–563.
- Morrone, J. J. & J. M. Carpenter (1994). In search of a method for cladistic biogeography - an empirical-comparison of component analysis, brooks parsimony analysis, and 3 area statements. *Cladistics* 10, 99–153.

- Myers, A. A. & P. S. Giller (1988). Process, pattern and scale in biogeography. In A. A. Myers & P. S. Giller (Eds.), *Analytical Biogeography: an Integrated Approach to the Study of Animal and Plant Distributions*, pp. 3–10. London: Chapman and Hall.
- Nelson, G. & D. E. Rosen (1981). Vicariance biogeography: a critique. *Systematic Zoology* 30, 501–506.
- Nelson, G. J. & N. I. Platnick (1981). *Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance*. New York: Columbia University Press.
- Nores, M. (2000). Species richness in the Amazonian bird fauna from an evolutionary perspective. *Emu* 100, 419–430.
- Orr, M. R. & T. B. Smith (1998). Ecology and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 502–506.
- Prance, G. (1982). *Biological Diversification in the Tropics*. New York: Columbia University Press.
- Rainkow, R. J. (1982). Monophyly of the Passeriformes: test of phylogenetic hypothesis. *Auk* 99, 431–445.
- Ridgley, R. S. & G. Tudor (1989). *The Birds of South America (Vol. I - The Oscine Passerines)* (1 ed.), Volume I. Austin: University of Texas Press.
- Ridgley, R. S. & G. Tudor (1994). *The Birds of South America (Vol. II - The Suboscine Passerines)* (1 ed.), Volume II. Austin: University of Texas Press.
- Rizzini, C. (1997). *Tratado de Fitogeografia do Brasil*. Rio de Janeiro: Ambito Cultural.
- Ronquist, F. (1997). Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46, 195–203.
- Ronquist, F. & S. Nylin (1990). Process and pattern in the evolution of species associations. *Systematic Biology* 39, 323–344.
- Rosen, D. E. (1978). Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Systematic Zoology* 27, 159–188.
- Sheldon, F. H. & A. H. Bledsoe (1993). Avian molecular systematics, 1970s to 1990s. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 243–278.
- Sibley, C. G. & J. Ahlquist (1981). The phylogeny and relationships of the ratite birds as indicated by DNA-DNA hybridization. *Proceedings of the Second International Congress of Systematic Evolutionary Biology*, 301–335.
- Sibley, C. G. & J. E. Ahlquist (1990). *Phylogeny and Classification of Birds*. New Haven: Yale Univ. Press.

- Silva, M. N. & J. L. Patton (1998). Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 7, 475–486.
- Smith, T. B., R. K. Wayne, D. Girman, & M. Bruford (1997). A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science* 276, 1855–1857.
- Smith, T. B., R. K. Wayne, D. J. Girman, & M. W. Bruford (2000). Evaluating the divergence with gene flow model in natural populations: the importance of ecotones in rainforest. In C. Moritz, E. Bermingham, & C. Dick (Eds.), *Rainforests: Past and Future*. Chicago: University Chicago Press.
- Stotz, D. F., J. W. Fitzpatrick, T. A. Parker III, & D. K. Moskvits (1996). *Neotropical Birds: Ecology and Conservation*. Chicago: University of Chicago Press.
- Wiley, E. O. (1988). Vicariance biogeography. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19, 513–542.
- Wiley, E. O., D. Siegel-Causey, D. R. Brooks, & V. A. Funk (1991). *The Complete Cladist. A Primer of Phylogenetic Procedures* (19 ed.). Lawrence, Kansas: University of Kansas.

Filogenia e Biogeografia da família Conopophagidae (Aves: Passeriformes)

2.1 Introdução

A família Conopophagidae é um grupo endêmico da América do Sul incluindo oito espécies do gênero *Conopophaga*: (i) *C. lineata*; (ii) *C. aurita*; (iii) *C. roberti*; (iv) *C. peruviana*; (v) *C. ardesiaca*; (vi) *C. castaneiceps*; (vii) *C. melanops* e (viii) *C. melanogaster* (Figura 2.1). Os conopofagídeos são pequenos, com o tarso longo, cauda curta e asa arredondada. A maioria das espécies possui uma listra pós-ocular alongada, geralmente branca. São insetívoros terrestres que vivem nas florestas tropicais e temperadas da Colômbia, Suriname, Brasil, sul e nordeste da Argentina, sul do Paraguai, Bolívia e Peru (Sibley & Ahlquist 1990).

No Brasil, o gênero *Conopophaga* inclui pelo menos seis espécies biológicas. Segundo Sick (1997), as espécies de *Conopophaga* são restritas principalmente a matas altas e úmidas, onde permanecem pousadas em galhos finos, a pouca altura, conservando-se imóveis por tempo considerável. Algumas vezes voam ao solo para apanhar insetos, voltando depois ao poleiro.

Figura 2.1: Área de distribuição aproximada das espécies do gênero *Conopophaga*. Desenhos das espécies retirados de Whitney (2003).

As características principais de cada espécie segundo Sick (1997) e Whitney (2003) são:

Conopophaga lineata

Conopophaga lineata é uma espécie típica das regiões serranas, sobretudo as do Brasil oriental. Ambos os sexos apresentam características morfológicas semelhantes. O macho possui coloração similar ao da fêmea de *C. melanops*, não apresentando porém o desenho negro nas costas, maxila esbranquiçada (e não preta), além de um tufo pós-ocular branco. Ocorrem à beira da mata e mata secundária, em vegetação espessa próximo ao solo. Sua distribuição vai do Ceará ao Rio Grande do Sul, Goiás, leste do Mato Grosso, Paraguai e Argentina (Sick 1997) (Figura 2.1). Segundo Pinto (1978): (a) *Conopophaga lineata lineata* (Wied) se distribui no Brasil oeste-setencional (do sul da Bahia a Pernambuco) e central, no sul de Goiás; (b) *Conopophaga lineata vulgaris* Ménériès, no Brasil, é encontrada do Rio Grande do Sul ao Espírito Santo, Minas Gerais e sudeste de Mato Grosso; (c) *Conopophaga lineata cearae* Cory

se distribui no nordeste brasileiro (de Alagoas ao Ceará), inclusive no nordeste da Bahia (Bonfim).

Conopophaga melanops

A espécie *Conopophaga melanops* é endêmica à Floresta Atlântica, ocorrendo desde a Paraíba até Santa Catarina, sendo comum nas matas das baixadas litorâneas da encosta da Serra do Mar (Sick 1997). Apresenta os sexos bem diferenciados, tendo no macho o boné acastanhado com os lados da cabeça pretos (Ridgley & Tudor 1994; Sick 1997). Segundo Pinto (1978): (a) *Conopophaga melanops melanops* (Vieillot) se distribui no sudeste do Brasil (matas da faixa atlântica), do Paraná (Curitiba) ao Espírito Santo e leste de Minas Gerais (rio Doce); (b) *Conopophaga melanops perspicillata* (Lichtenstein) é restrita ao sudeste da Bahia (Ilhéus); e (c) *Conopophaga melanops nigrifrons* Pinto é encontrada no nordeste do Brasil, da Paraíba a Alagoas (Figura 2.1).

Conopophaga melanogaster

A espécie apresenta os indivíduos grandes (13 cm), possui a mandíbula negra, assim como a cabeça e partes inferiores. Habita florestas húmidas de planície, sendo encontrado em locais de vegetação densa em crescimento (ex.sucessão em uma clareira). Se distribui ao sul do Amazonas, do rio Tocantins ao baixo Tapajós (Pará), rio Madeira (Amazonas) e Bolívia (Figura 2.1). Não apresenta sub-espécies descritas.

Conopophaga peruviana

Os machos apresentam o boné marron escuro, com tufo pós-ocular branco e laterais da cabeça cinza. Já as fêmeas apresentam o boné mais castanho, com os lados da cabeça e o peito avermelhados. Habitam o interior das florestas de Terra-firme, frequentemente em torno de clareiras antigas por queda de árvore. Se distribuem no alto do rio Amazonas sendo encontrados no leste do Equador (oeste e sul do rio Napo) e Peru; oeste do Brasil, além do sul e norte da Bolívia (La Paz) (Figura 2.1).

Conopophaga ardesiaca

Os machos de *C. ardesiaca* possuem a cabeça cinza escuro, com plumagem pós-ocular branca. Já a fêmea possui o tufo pós-ocular bastante reduzido. A espécie ocorre nas florestas húmidas dos Andes. Normalmente encontrada em vegetação mais densa. Se distribui no Peru e Bolívia. A espécie é dividida em duas sub-espécies: (a) *C. ardesiaca saturata* que se distribui a leste dos Andes, no sudeste do Peru (região do “Marcapata Valley”) e (b) *C. a. ardesiaca*

que também se distribui no sudeste do Peru (região de Puno) e Bolívia (La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Tarija, Oruro) (Figura 2.1).

Conopophaga castaneiceps

A espécie apresenta o alto da cabeça castanho avermelhado nos machos, sendo a face cinza escuro. Possuem tufo pós-ocular branco proeminente. As fêmeas possuem o alto da cabeça e peito avermelhado, com o tufo pós-ocular reduzido. Se distribuem na Colômbia, Equador e Peru (Figura 2.1), sendo: (a) *C. castaneiceps chocoensis* no oeste da Colômbia, na porção oeste dos Andes (Baudó Mts); (b) *C. c. castaneiceps* a leste dos Andes, leste da Colômbia e sul do Equador; (c) *C. c. chapmani* leste dos Andes, sendo sul do Equador e Peru (San Martín) e (d) *C. c. brunneinucha* no Peru, de Huánuco até o sul de Cuzco.

Conopophaga roberti

Espécie endêmica do Brasil, possui a cabeça, garganta e peitos negros. Como a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Conopophaga*, possuem também tufos pós-ocular e abdômen brancos. A fêmea no entanto apresenta-se sem o negro na garganta e peito. São relativamente raros, ocorrendo em florestas secundárias úmidas e em estágios mais avançados de sucessão. Ocorrem do Tocantins ao Pará (Belém), Maranhão, Piauí e Ceará. Essa espécie não possui subespécies descritas.

Conopophaga aurita

Os machos apresentam a face negra e alto da cabeça marrom. Peito avermelhado, com exceção de *C. aurita snethlageae*. Nessa subespécie o peito é negro como a cabeça, tendo somente as laterais avermelhadas. As fêmeas possuem a face e o peito avermelhados. Ambos os sexos possuem o tufo branco pós-ocular, sendo esse mais proeminente nos machos. Se distribui por todos os países amazônicos, exceto Bolívia e Venezuela (Figura 2.1). Segundo Whitney (2003), (a) *C. a. aurita* (Gmelin, 1789) se distribui no leste da Guiana até Guiana Francesa e leste de Manaus até o Amapá; (b) *C. a. inexpectata* Zimmer, 1931 está distribuída no sudeste da Colômbia e noroeste do Brasil, à margem oeste do rio Negro; (c) *C. a. occidentalis* Chubb, 1917 é encontrado no nordeste do Equador e do Peru (leste do rio Napo); (d) *C. a. australis* Todd, 1927 está distribuído ao sul do rio Amazonas, desde o nordeste do Peru até o oeste do Brasil (leste do rio Madeira, nos estados do Acre e Rondônia); (e) *C. a. snethlageae* Berlepsch, 1912 se distribui ao sul do Amazonas, desde ambas as margens do baixo rio Tapajós e margem leste do rio Teles Pires até o leste do Pará. A ocorrência à oeste do rio Madeira não é conhecida; (f) *C. a. pallida*

Snethlageae, 1914 está restrita ao leste do Pará até a margem oeste do rio Tocantins.

Ainda não foi realizado um estudo sobre a filogenia da família Conopophagidae, existindo somente algumas propostas sobre as relações entre espécies do gênero *Conopophaga* (Whitney 2003). Segundo o autor, *C. lineata* teria se divergido precocemente, sendo relacionada com espécies andinas (*C. castaneiceps* e *C. ardesiaca*). Essas últimas teriam se divergido mais recentemente de *C. peruviana*. Seria também provável que *C. lineata* tivesse se divergido de *C. roberti* devido à transição de floresta úmida (leste da Amazônia) para áreas secas do interior do nordeste do Brasil (Figura 2.1). O compartilhamento de elementos nas vozes e coloração clara da mandíbula inferior entre todas essas espécies também sugere a íntima relação entre elas (Whitney 2003). Para a espécie *C. melanogaster*, o autor propôs que o táxon possa pertencer a outro gênero devido à sua grande singularidade morfológica dentro do grupo. Entretanto, devido a similaridades entre as vocalizações dessa espécie e as demais já citadas, a hipótese de uma possível relação entre todas essas espécies não foi descartada. Para os demais conopofagídeos foi proposta uma outra radiação que deu origem ao complexo *C. aurita*. A mais antiga divergência dentro desse grupo, e provavelmente dentre todos os conopofagídeos, deu origem à *C. melanops*. Entretanto, devido à ausência de um estudo filogenético bem corroborado, as características morfológicas e comportamentais exclusivas de *C. melanops* poderiam ser interpretadas como derivadas, implicando em uma diversificação mais recente dentro da família, ou, pelo contrário, como a mais basal dentre todos os conopofagídeos.

Como descrito, as relações filogenéticas entre as espécies da família Conopophagidae ainda não estão estabelecidas. Além disso, alguns táxons ameaçados como *C. lineata cearae* e *C. melanops nigrifrons* possuem status taxonômico questionável (Whitney 2003). Desta maneira ficam dificultados esforços para conservação desses táxons ou mesmo para a região onde esses estão distribuídos. A resolução dos limites de distribuição das unidades evolutivas e taxonômicas ajudaria nesse sentido. Somado a isso, a definição das relações filogenéticas entre essas unidades evolutivas pode ajudar a entender a história de diversificação na América do Sul. Isso porque, pelo menos em parte, a maioria das áreas de endemismo descritas na literatura (Cracraft 1985; Amorim & Pires 1996; Haffer 1985) estão representadas nesse estudo por táxons com distribuição alopátridas correspondentes. Nesse sentido, a família Conopophagidae pode ser um bom modelo para se testar as hipóteses biogeográficas de relações entre essas áreas (Cracraft 1988; Bates et al. 1998; Marks et al. 2002; Ribas et al. 2005; de Paula et al. 2007).

Vários estudos vêm tentando explicar a razão da alta diversidade biológica

na região Neotropical (Haffer 1997; Moritz et al. 2000). Para se obter essa resposta, os trabalhos têm buscado entender os padrões de distribuição dos organismos.

As espécies podem ter sua distribuição limitada devido a fatores ecológicos ou históricos. Dessa maneira, várias espécies têm sua distribuição restrita (Brown & Lomolino 1998). Segundo esses autores, espécies endêmicas não estão distribuídas de maneira aleatória, mas sim concentradas em algumas regiões.

Na região Neotropical, várias dessas áreas de endemismo já foram identificadas (Brown Jr. 1977; Cracraft 1985; Haffer 1969; Amorim & Pires 1996; Silva et al. 2004). Apesar dos diferentes grupos de animais e vegetais analisados, existe uma grande congruência entre as áreas delimitadas (Figura 2.2). Isso sugere uma causa comum para a origem desses padrões. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre essa origem e história (Cracraft 1988; Bates et al. 1998).

Figura 2.2: Áreas de endemismo proposto por Cracraft (1985) para Aves

Diferentes hipóteses foram propostas na tentativa de se explicar as relações entre essas áreas e os processos que as levaram ao padrão atual [ver revisões de (Haffer 1997; Patton & Silva 1998)]. Uma grande parte dessas teorias foi elaborada baseando-se em relações filogenéticas de aves florestais (Cracraft 1988; Cracraft & Prum 1988; Prum 1988; Brumfield & Capparella 1996; Ribas et al. 2005). Dentre as principais teorias estão as propostas de Haffer (1969) e Vanzolini & Williams (1970) na qual ciclos de alterações cli-

máticas globais teriam levado a especiação alopátrida dos organismos. Isso porque esses ciclos provocavam contrações e expansões das florestas e áreas abertas, levando as populações ao isolamento em refúgios. Outras hipóteses também muito discutidas basearam-se principalmente em fatores ecológicos (Endler 1977; Bush 1994) ou geológicos (Wallace 1852; Platnick & G.J. 1978; Cracraft & Prum 1988). O modelo dos gradientes ecológicos (Endler 1977) é um exemplo de especiação por fator ecológico, não dependente de isolamento. Nesse caso, a pressão de seleção nos organismos distribuídos em diferentes tipos de habitat levaria-os à especiação parapátrida (Endler 1977). Já o modelo dos “rios” pode ser um exemplo de hipótese de especiação alopátrida por surgimento de uma barreira geológica (Wallace 1852).

Apesar de todas essas teorias propostas, ainda não são claros os fatores responsáveis pela alta diversidade na região Neotropical. Não existe um consenso sobre qual modelo explica melhor as relações atuais entre as áreas. Vários trabalhos têm sugerido que essas hipóteses não são mutualmente exclusivas (Marroig & Cerqueira 1997; Ribas et al. 2005; Cabanne et al. 2007). Sendo assim, a interação entre essas diferentes hipóteses pode ser uma melhor aproximação para reconstruir a complexidade dos processos que originaram a diversidade Neotropical.

Existem várias propostas para divisão da região Neotropical em unidades históricas menores (Nihei & Carvalho 2007). Para realizar essa divisão, foram usados critérios geográficos, paleontológicos, faunísticos e florísticos (Morrone 2001). Como nem todas essas propostas se basearam em critérios evolutivos, algumas subregiões podem não representar unidades biogeográficas naturais (Morrone 2001). Bates et al. (1998) delimitaram regiões de endemismo na região Neotropical baseando-se na distribuição de espécies e subespécies de aves. A relação entre essas áreas não foi compatível com topologias determinadas por estudos filogenéticos (Bates et al. 1998). Dentre as propostas que subdividiram a região Neotropical através de critérios evolutivos estão os trabalhos de Prum (1988) e Amorim & Pires (1996). A congruência encontrada entre as áreas delimitadas nos diferentes trabalhos pode sugerir um padrão geral de relação entre essas áreas.

A primeira separação ocorrida na região Neotropical sugerida nos trabalhos de Prum (1988), Amorim & Pires (1996) e Bates et al. (1998) ocorreu entre o conjunto “América Central + Chocó” e o restante da América do Sul (Figura 2.3). Após essa separação, existem algumas discordâncias entre esses trabalhos, principalmente com relação à posição da Mata Atlântica e da Guiana. Segundo Prum (1988), houve uma separação entre o oeste da Amazônia (Imeri, Napo e Inambari) e o restante da América do Sul. Dessa forma, a Floresta Amazônica não resulta em uma unidade biogeográfica, sendo su-

geridas: a Mata Atlântica irmã do leste da Amazônia (Pará e Rondônia), e a Guiana como a área mais basal dentro desse grupo (Figura 2.3(a)). Já para Bates et al. (1998), a Floresta Amazônica forma uma unidade biogeográfica, tendo um clado formado pelo oeste da Amazônia, incluindo a Guiana, e a Mata Atlântica basal a todo o grupo (Figura 2.3(b)). Amorim & Pires (1996), assim como Prum (1988), também propõe que a Amazônia não forme uma unidade biogeográfica. Entretanto, esse autor sugere outras relações entre essas áreas (Figura 2.3(c)). Nesse caso, a Mata Atlântica brasileira, o nordeste da Argentina, parte do Paraguai e Uruguai, além da porção sudeste da Amazônia estariam incluídos na divisão sudeste do neotrópico (SE). Enquanto isso, a divisão noroeste (NO) inclui a América Central, ambientes tropicais do México e todo o nordeste da América do Sul, incluindo a porção leste da Amazônia, na foz do rio Amazonas (Belém).

Métodos que sugerem dispersão e vicariância têm sido propostos para reconstruir a história das relações entre as áreas biogeográficas (Ronquist 1997). Apesar da variedade de métodos existentes, poucos estudos empíricos têm relatado a função tanto da vicariância quanto da dispersão na região Neotropical. Nesse contexto, a proposta desse capítulo foi formular hipóteses biogeográficas que expliquem a atual distribuição geográfica da família Conopophagidae.

Utilizando as relações filogenéticas entre as espécies de *Conopophaga* obtidas nesse capítulo, foi então realizada uma análise de biogeografia cladística baseada nas propostas de Prum (1988), Amorim & Pires (1996) e Bates et al. (1998). O cladograma de área obtido foi usado para discutir as relações entre as áreas da região Neotropical propostas nesses trabalhos.

(a) Hipótese de Prum (1988)

(b) Hipótese de Bates et al. (1998)

(c) Hipótese de Amorim & Pires (1996)

Figura 2.3: Classificação das regiões e cladogramas de áreas na região Neotropical proposto por Prum (1988), Amorim & Pires (1996) e Bates et al. (1998). [modificado de Nihei & Carvalho (2007)]

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Amostragem

Foram obtidas amostras das oito espécies de Conopophagidae, seguindo a nomenclatura de Sibley & Ahlquist (1990). Foram analisados 31 indivíduos de 13 táxons diferentes pertencentes à família. As amostras de sangue ou músculo analisadas foram coletadas no campo. Os indivíduos amostrados para esse trabalho foram identificados por caracteres de plumagem e/ou vocalização, sendo sua localidade sempre concordante com as distribuições descritas na literatura. Todas essas amostras de *Conopophaga* coletadas durante o trabalho estão depositadas no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (Tabela 2.1). Além dessas, foram também utilizadas amostras gentilmente cedidas pelo Field Museum of Natural History (FMNH) e Academy of Natural Sciences of Philadelphia (ANSP), estando as mesmas depositadas nesses museus nos EUA (Tabela 2.1).

Para testar o monofiletismo da família e inferir suas relações evolutivas com outros gêneros de Furnarioidea, foram incluídas seqüências obtidas do GenBank (Tabela 2.2), como possíveis grupos externos. A espécie *Cnemotriccus fuscatus*, pertencente à superfamília Tyrannoidea, foi escolhida para enraizar a árvore devido à sua maior divergência em relação à família Conopophagidae.

2.2.2 Extração de DNA

As amostras de DNA total foram extraídas individualmente em solução contendo 0,1% de SDS, Tris-HCl 100mM (pH 8.0), EDTA 10 mM e 10 mg/mL de proteinase K, sendo mantidas durante uma noite a 37°C. O DNA foi então purificado por procedimento padrão com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Bruford et al. 1992).

2.2.3 Amplificação (PCR)

As amplificações dos segmentos de DNA analisados foram realizadas por PCR ("Polymerase Chain Reaction") em 10 μ l que continham 0.8mM dNTPs, 1 μ M de cada primer, 0,5U de *Taq* polimerase (Pharmacia), tampão 1x (Pharmacia) e 1 μ l de DNA molde. As condições das reações foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min seguida de 35 ciclos a 94°C (40s), hibridação entre 52 e 56°C (40s) e incubação a 72°C (1min), além de incubação final a 72°C por 5 min.

Tabela 2.1: Táxons amostrados, número na coleção e localidades de coleta.

Táxon	Nº na Coleção	Instituição ¹	Localidade
<i>C. ardesiaca</i>	429998	FMNH	Cuzco, Peru
<i>C. ardesiaca</i>	429999	FMNH	Cuzco, Peru
<i>C. aurita pallida</i>	P69	USP	Aripuanã, MT, Brasil
<i>C. a. pallida</i>	P70	USP	Aripuanã, MT, Brasil
<i>C. a. australis</i>	389956	FMNH	Rio Ji-Paraná (margem oeste), RO, Brasil
<i>C. a. australis</i>	389957	FMNH	Rio Ji-Paraná (margem oeste), RO, Brasil
<i>C. a. snethlageae</i>	391447	FMNH	Serra dos Carajas, PA, Brasil
<i>C. a. snethlageae</i>	391448	FMNH	Serra dos Carajas, PA, Brasil
<i>C. melanogaster</i>	389958	FMNH	Rio Ji-Paraná (margem oeste), RO, Brasil
<i>C. melanogaster</i>	389959	FMNH	Rio Ji-Paraná (margem oeste), RO, Brasil
<i>C. peruviana</i>	433384	FMNH	Moskitania, Peru
<i>C. peruviana</i>	433386	FMNH	Moskitania, Peru
<i>C. melanops nigrifrons</i>	392378	FMNH	Timbauba, PE, Brasil
<i>C. m. nigrifrons</i>	392379	FMNH	Timbauba, PE, Brasil
<i>C. m. perspicillata</i> (?)	P1130	USP	Vitória da Conquista, BA, Brasil
<i>C. m. melanops</i>	P1196	USP	PETAR, Núcleo Caboclos, SP, Brasil
<i>C. m. melanops</i>	P1355	USP	P.N. Itatiaia, RJ, Brasil
<i>C. m. melanops</i>	P1358	USP	P.N. Itatiaia, RJ, Brasil
<i>C. lineata vulgaris</i>	395433	FMNH	Boraceia, SP, Brasil
<i>C. l. vulgaris</i>	P1005	USP	Misiones, Argentina
<i>C. l. vulgaris</i>	P1170	USP	E.E. Bananal, SP, Brasil
<i>C. l. lineata</i>	P1235	USP	Barreiro, Belo Horizonte, MG, Brasil
<i>C. l. lineata</i>	P1126	USP	Serra da Lontras, Arataca, BA, Brasil
<i>C. l. cearae</i>	10413	USP	Serra de Baturité, CE, Brasil
<i>C. l. cearae</i>	P2262	USP	Bonito, BA, Brasil
<i>C. l. cearae</i>	P2264	USP	Bonito, BA, Brasil
<i>C. roberti</i>	P1241	USP	Maju, PA, Brasil
<i>C. roberti</i>	P1242	USP	Maju, PA, Brasil
<i>C. roberti</i>	P1243	USP	Maju, PA, Brasil
<i>C. castaneiceps</i>	4436	ANSP	Panguri, Equador
<i>C. castaneiceps</i>	5298	ANSP	Cordillera del Condor, Equador

¹ANSP: Academy of Natural Sciences of Philadelphia; FMNH: Field Museum of Natural History; USP: Universidade de São Paulo.

Foram amplificadas três regiões mitocondriais: as subunidades 2 e 3 da NADH desidrogenase (ND2 e ND3) e o citocromo b (Cit-b). Procuramos obter produtos amplificados maiores que 1000 pb. Isto foi feito visando diminuir a possibilidade de amplificar cópias inteiras ou parciais dos genes estudados que possam estar translocados para o núcleo ou para outra região do DNAm. Essa possibilidade pode aumentar quando são amplificados produtos menores (Sorenson & Quinn 1998). Para realizar essas reações foram utilizadas as seqüências inicializadoras apresentadas na Tabela 2.3.

Tabela 2.2: Espécies, coleções e número de acesso das seqüências obtidas no Genbank e usadas nesse estudo.

Espécie	Família	Instituição ¹	No. na coleção	No. de acesso ²	Referência
<i>Chemotriccus fuscatus</i>	Tyrannidae	LSU	120152	AF447622, AF447649, AF447676	Cicero & Johnson (2002)
<i>Rhinocrypta lanceolata</i>	Rhinocryptidae	LSU	18813	AY370559, AY370596, -	Rice (2005b)
<i>Thamnophilus torquatus</i>	Thamnophilidae	LSU	B13900	EF030339, EF030308, EF030246	Brumfield & Edwards (2007)
<i>Thamnophilus zarumae</i>	Thamnophilidae	LSU	B191	EF030340, EF030310, EF030248	Brumfield & Edwards (2007)
<i>Myrmornis torquata</i>	Thamnophilidae	FMNH	389880	EF639971, EF640038, EF640105	Brumfield et al. (2007)
<i>Pittasoma michleri</i>	Formicariidae	LSU	11860	AY370557, AY370594, -	Rice (2005b)
<i>Pittasoma rufopileatum</i>	Formicariidae	LSU	2285	AY370556, AY370593, -	Rice (2005b)

¹LSU: Louisiana State University; FMNH: Field Museum of Natural History.

²Número de acesso ao Genbank são Citb, ND2 e ND3, respectivamente.

Tabela 2.3: Primers utilizados para amplificar (A) e sequenciar (S)

Primer (5'-3')	Gene / cadeia	Referência
LMet (A/S) GGCCCATACCCCGAAAATGA	ND2 / L	Ribas et al. (2005)
H5764 (S) GAGAAGCTAGGATTTTCGTG	ND2 / H	Ribas et al. (2005)
L5602 (S) GATTCGCCAGAAGTTCTTCAAGG	ND2 / L	Ribas et al. (2005)
H6313 (A/S) CTCTATTATAAGGCTTTGAAGGC	ND2 / H	Sorenson et al. (1999)
L14841 (A/S) CCATCCCAACATCTCAGCATGATGAAA	Cit b / L	modificado de Kocher et al. (1989)
CBL15298 (S) TGAGGCCAAATATCATCTGAGGGGC	Cit b / L	Cheng et al. (1994)
CBH15764 (S) CCTCCTAGTTTGTGGGATGA	Cit b / H	Miyaki et al. (1998)
H16065 (A/S) GTCTTCAGTTTGTGGTTACAAGAC	Cit b / H	Lougheed et al. (2000)
L10755 (A/S) ACTTCCAATCTTTAAATCTGG	ND3 / L	Chesser (1999)
H11151 (A/S) ATTTGTGAGCCGAAATCAAC	ND3 / H	Chesser (1999)

Uma alíquota do produto amplificado foi carregado em gel de agarose 1% com padrões de concentração e de tamanhos conhecidos (“ladder” 1000 pb - Pharmacia) para verificar se os fragmentos obtidos possuíam tamanho esperado e para estimar a quantidade obtida.

2.2.4 *Purificação dos fragmentos amplificados*

Cerca de 8,5 μ l do produto de PCR constituindo-se de apenas uma banda foram purificados seguindo o protocolo para purificação com Polietileno Glicol (PEG):

- Foram adicionados 25 μ l de PEG ao próprio tubo com produto de PCR;
- As amostras foram colocadas na estufa a 37 °C;
- Retiradas da estufa, as amostras foram centrifugadas durante 15min a 12000 rpm;
- Foi retirado o sobrenadante;
- Foi adicionado 125 μ l de etanol 80% gelado;
- As amostras foram então centrifugadas durante 5 min a 12000 rpm;
- O sobrenadante foi novamente retirado;
- Os passos de 5 a 7 foram repetidos;
- As amostras foram secas;
- Foram então re-suspendidas em 8,5 μ l de água milli-Q.

2.2.5 *Reação de seqüenciamento*

Para as reações de seqüenciamento foi utilizado o kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” ver 3.0 - (Applied Biosystems Inc) seguindo o protocolo do fabricante.

2.2.6 *Precipitação dos produtos para seqüenciamento*

Antes da eletroforese as amostras foram purificadas individualmente por precipitação de acordo com o seguinte protocolo:

- Foram acrescentados 80 μ l de isopropanol 70% em cada amostra e misturou-se em vórtex;
- Foram deixados 20 min na bancada à temperatura ambiente;

- Cada amostra foi centrifugada por 30 min a 12000 rpm e o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta do lado oposto ao precipitado de DNA;
- O precipitado foi lavado com cerca de 200 μ l de Etanol 70%;
- A amostra foi então seca a 90 °C durante 2 min e mantida a -20 °C no caso de não ser imediatamente preparada para seqüenciamento.

2.2.7 Seqüenciamento automático

Para o seqüenciamento das amostras foi utilizado o seqüenciador ABI Prism 377 ou ABI Prism 3700 (Applied Biosystems).

2.2.8 Análise das seqüências

As seqüências obtidas das fitas complementares correspondentes a cada indivíduo foram comparadas no programa “CodonCode Aligner 1.6.3” (Codon-Code Corporation). O alinhamento par a par entre as seqüências táxons foi realizado no programa ClustalX 1.81 (Thompson et al. 1997).

Foram também calculadas a composição de bases, as taxas de transição e transversão e a distância - p (Nei 1987) entre seqüências de nucleotídeos no programa MEGA 3.0 (Kumar et al. 2004). A saturação para cada gene foi avaliada graficamente através do programa DAMBE (Xia & Xie 2001) observando a correlação entre o número absoluto de transições e transversões com as distâncias - p para todas as comparações par a par.

2.2.9 Reconstruções filogenéticas

Primeiramente, o teste de homogeneidade de partições foi realizado utilizando o programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) para avaliar a congruência entre os genes. Da mesma forma, foi realizado o teste de razão de verossimilhança no programa Modeltest 6.03 (Posada & Crandall 1998) para selecionar o modelo de evolução molecular mais simples com verossimilhança mais alta para os dados obtidos. As relações filogenéticas foram reconstruídas pelos métodos de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) utilizando o software PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) e análise Bayesiana (AB) utilizando o software MrBayes 3.0B4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). O modelo de substituição selecionado foi utilizado nas análises de MV e AB. Para as reconstruções realizadas no PAUP 4.0b10, foram usados os parâmetro de busca heurística por “stepwise-addition”, com árvores iniciais obtidas por 10 adições aleatórias de táxons. O suporte dos ramos foi avaliado pela análise de

bootstrap não paramétrico (Felsenstein 1985), com 1000 réplicas para MP e 100 para MV. Para testar as diferentes topologias encontradas foi realizado o teste de Shimodaira-Hasegawa (SH) (Shimodaira & Hasegawa 1999) também no programa PAUP 4.0b10. Esse teste “compara simultaneamente os escores de todas as topologias a partir de um conjunto selecionado a priori” [extraído de (Schneider 2003)].

2.2.10 Análises biogeográficas

Os dados de distribuição geográfica das espécies do gênero *Conopophaga* foram obtidos de (Whitney 2003; Ridgely et al. 2005) e foram plotados sobre um mapa da América do Sul utilizando o programa *ArcView 8.1*.

As relações filogenéticas entre as espécies de Conopophagidae foram utilizadas para testar os padrões biogeográficos encontrados nas florestas da América do Sul (áreas de endemismo). Cladogramas de áreas foram produzidos para ilustrar as conexões históricas entre os táxons e as áreas de endemismo propostas por Prum (1988), Amorim & Pires (1996) e Bates et al. (1998). Para testar essa congruência foi utilizado o programa *TreeMap (Jungle Edition) ver. 2.02* (Charleston & Page 2001).

Foram considerados quatro processos geralmente testados nos modelos biogeográficos: a) *vicariância*, especiação alopátrida causada por uma barreira que afetou o fluxo gênico; b) *duplicação*, especiação simpátrida associada a fatores intrínsecos à população; c) *dispersão* entre áreas isoladas, levando posteriormente à especiação e d) *extinção*, que levou algumas linhagens a desaparecer de uma área na qual poderiam ocorrer (Sanmartin & Ronquist 2004).

Para realizar esses testes foram realizadas analogias, pois o programa utilizado foi originalmente desenvolvido para analisar relações hospedeiro/parasita. Assim, as relações “hospedeiro-associado” foram interpretadas como relações entre “organismo-área”. Da mesma forma, eventos de “co-divergência” são interpretados como “vicariância”; “duplicação” como “simpatria”; “transferência entre hospedeiros” como “dispersão” e “sorting event” como “extinção” (Page & Charleston 1998).

Para representar cada um desses quatro eventos foram utilizados símbolos nas figuras obtidas. A melhor associação entre as relações entre os Conopophagidae e as hipóteses biogeográficas para as áreas de endemismo (de Prum (1988), Amorim & Pires (1996) e Bates et al. (1998)) foi aquela que apresentou o menor custo total (Charleston 1998).

2.3 Resultados

2.3.1 Padrões de variação das seqüências

As amplificações apresentaram bandas únicas nos géis de agarose, com tamanhos compatíveis aos esperados para cada gene. Esses tamanhos são maiores que possíveis cópias de genes mitocondriais incorporadas ao genoma nuclear (Pereira & Baker 2004). Isso sugere que as medidas preventivas para evitar a amplificação accidental de cópias nucleares mostraram-se eficazes.

O alinhamento final das seqüências aqui obtidas resultou em 941 pb do ND2, 343 pb do ND3 e 986 pb do cit b. Não foram encontradas ambigüidades, tais como inserções ou deleções, nem a presença de códons de término inesperados na análise visual dos alinhamentos. Algumas seqüências retiradas do GenBank apresentaram tamanhos menores que os obtidos no presente estudo e, por isso, as regiões ausentes foram preenchidas com “N” (qualquer um das quatro bases) e consideradas como “missing data”. Como o teste de homogeneidade de partições não rejeitou a hipótese de os segmentos apresentarem sinais filogenéticos congruentes, as análises filogenéticas foram conduzidas com duas matrizes de seqüências concatenadas: 1) uma contendo um total de 2270 pb que incluiu os sítios sem dados dos táxons obtidos no GenBank e 2) uma contendo 878 pb sendo 461 pb do ND2 e 417 pb do cit b (Tabela 2.4). Não foi detectada saturação de transições dos genes concatenados. As taxas de transição e transversão para cada marcador estão apresentadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Números de sítios total, variáveis e informativos para parcimônia, composição de bases e taxa de transição e transversão para cada gene e para os dados combinados.

	ND2	ND3	Cit-b	Combinados	
no. pares de bases	941	343	986	2270	878
no. sítios variáveis	473	156	430	1059	459
no. sítios informativos	395	127	362	884	385
%A	0,307	0,269	0,275	0,29	0,30
%C	0,349	0,329	0,333	0,34	0,34
%G	0,09	0,113	0,123	0,11	0,09
%T	0,255	0,289	0,269	0,26	0,27
taxa Ts / Tv	2,5	2,4	2,5	2,5	2,4

Tabela 2.5: Médias das distâncias-p (%) para o conjunto de dados concatenados (2270 pb, abaixo da diagonal e 878 pb, acima da diagonal) entre grupos de indivíduos pertencentes a cada táxon. *C.m.*- *Conopophaga melanops*, *C.a.*- *C. aurita*, *C.l.*- *C. lineata*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>grupo externo</i>	×	10,9	10,9	10,5	11,0	11,1	11,3	11,0	10,2	10,7	10,9	10,0	9,5	10,5
<i>C. melanogaster</i>	10,4	×	13,5	13,1	14,0	12,5	12,5	12,6	11,8	13,1	11,5	11,4	10,7	12,4
<i>C. m. melanops</i>	10,5	13,2	×	1,0	12,7	12,7	11,1	12,1	12,2	12,2	12,5	10,8	10,8	12,2
<i>C. m. nigrifrons</i>	9,9	12,5	1,1	×	12,0	12,0	10,7	11,6	11,3	11,1	11,9	10,2	10,4	11,4
<i>C. peruviana</i>	10,4	12,6	12,7	11,7	×	10,4	10,9	11,2	10,4	11,4	10,3	10,0	10,5	10,8
<i>C. a. australis</i>	10,3	12,2	12,1	11,4	9,2	×	6,8	7,6	8,0	9,6	8,4	7,4	8,1	8,8
<i>C. a. pallida</i>	10,3	11,6	10,9	10,3	9,7	7,2	×	5,2	8,6	9,0	8,2	8,2	8,3	9,2
<i>C. a. snethlagea</i>	10,2	11,1	11,2	10,5	9,1	7,4	3,9	×	8,6	7,5	7,4	8,6	8,7	7,9
<i>C. ardesiaca</i>	9,7	11,4	11,5	10,6	9,7	8,1	8,5	8,2	×	4,8	7,9	6,0	6,4	7,7
<i>C. castaneiceps</i>	10,0	12,3	12,2	11,3	10,4	8,9	8,7	8,5	4,7	×	8,5	7,7	7,6	9,0
<i>C. roberti</i>	10,1	11,3	12,2	11,3	9,6	8,8	8,4	8,2	8,3	9,2	×	5,6	6,0	8,6
<i>C. l. lineata</i>	9,4	11,7	11,0	10,1	9,0	7,8	8,3	7,6	7,6	8,7	6,5	×	3,0	6,5
<i>C. l. vulgaris</i>	8,6	10,9	10,6	9,8	8,6	7,5	7,7	7,0	7,4	8,0	5,9	2,5	×	6,4
<i>C. l. cearae</i>	9,8	11,4	11,9	11,0	9,5	9,0	8,7	8,3	8,3	9,1	9,0	8,2	7,4	×

2.3.2 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas com seqüências obtidas nesse trabalho e no GenBank. Como essas seqüências do GenBank eram menores que as obtidas no presente estudo, foram analisadas duas matrizes contendo 38 terminais (31 do gênero *Conopophaga* e sete do GenBank). Sendo assim, uma matriz apresentou 2270 pb, com os intervalos das seqüências do GenBank completados com “N” e considerados como “missing data”. A outra matriz apresentou 878 pb, sendo retirado os sítios com amostragem incompleta.

As topologias obtidas com os diferentes métodos de inferência são muito semelhantes. Na análise de MP realizada com 2270 pb foram obtidas 12 árvores mais parcimoniosas com 1188 passos, 0,489 de índice de consistência (CI) e 0,703 de índice de retenção (RI). Já a análise realizada com 878 pb resultou em 5 árvores mais parcimoniosas com os mesmo resultados anteriores (1188 passos, CI=0,489 e RI=0,703).

O modelo evolutivo mais adequado obtido pelo programa Modeltest para a matriz de 2270 pb foi o GTR+I+ Γ (Rodríguez et al. 1990) (“General Time Reversible” com proporção de sítios invariáveis de 0,4781 e parâmetro *alpha* da distribuição *gamma* de 1,4145). Para a matriz de 878 pb o modelo selecionado foi o HKY+I+ Γ (Hasegawa et al. 1985), com proporção de sítios invariáveis de 0,4103 e parâmetro *alpha* da distribuição *gamma* de 1,1462. As topologias, bem como os valores de *bootstrap* e as probabilidades posteriores obtidos nessas análises são apresentadas nas figuras 2.4 e 2.5.

Todas as análises recuperaram o clado composto pela família Conopophagidae. Os indivíduos da mesma unidade taxonômica se agruparam formando clados monofiléticos com alto suporte. Entretanto, os representantes da subespécie *C. lineata cearae* não se agruparam no clado com os demais indivíduos de *C. lineata*. Esse clado de *C. l. lineata* e *C. l. vulgaris* se agrupou com *C. roberti* em todas as análises com bom suporte. O clado formado pelas espécies andinas *C. ardesiaca* e *C. castaneiceps* também foi recuperado em todas as análises com bom suporte. Todos os táxons de *C. aurita* analisados se agruparam formando um clado bem suportado. *C. melanops* apareceu como grupo irmão de todos esses táxons já citados. *C. melanogaster* foi a espécie mais basal dentro da família.

A análise com a matriz de 2270 pb apresentou baixa resolução nas relações entre algumas espécies. A politomia apresentada nessas análises se mostrou melhor resolvida nas análises realizadas com 878 pb. Outra diferença encontrada é a que *C. l. cearae* se encontra em uma politomia basal nas análises com a matriz de 2270 pb (Figura 2.4). Entretanto, nas análises com 878 pb *C. l. cearae* se apresenta como espécie irmã do grupo formado por ((*C. lineata*, *C. roberti*), (*C. ardesiaca*, *C. castaneiceps*)), mas sem bom suporte (Figura 2.5).

Como o teste de SH (Shimodaira & Hasegawa 1999) não rejeitou a hipótese de as topologias serem semelhantes ($p=0,156$), as análises biogeográficas foram realizadas utilizando-se a topologia com maior resolução (de 878 pb).

Figura 2.4: Análise de MV baseada em 2270 pb de seqüências parciais dos genes ND2, ND3 e Cit b. Valores de bootstrap nos nós (MV / MP).

2.3.3 Análises biogeográficas

Os diagramas que ilustram a associação entre as hipóteses de relação entre as áreas de endemismo e a filogenia da família Conopophagidae são apresentados na figura 2.6. Não é possível observar um padrão claro de vicariância para todos os táxons. A relação entre os táxons presentes na Amazônia sugeriu que dispersão também pode ser uma explicação para a distribuição atual dessas espécies. Além disso, os táxons que ocorrem na Mata Atlântica não formam um grupo monofilético.

Figura 2.5: Análise de MV baseada em 878 pb de seqüências parciais dos genes ND2 e Cit b. Valores de bootstrap nos nós (MV / MP).

Com base nas diferentes possibilidades de associação mostradas na figura 2.6 e nos diferentes pesos para cada possível processo (vicariância, simpatria, extinção e dispersão) foram sugeridos vários possíveis cenários para explicar a relação entre a história biogeográfica da família Conopophagidae e as áreas de endemismo da América do Sul. O número de cenários possíveis variou de 321 a 446, dependendo da hipótese de relações entre áreas de endemismo. A hipótese de Amorim & Pires (1996) apresentou os menores custos totais na correlação entre as áreas de endemismo e a filogenia dos conopofagídeos (Tabela 2.6). As quatro reconstruções com menores custos obtidas a partir de Amorim & Pires (1996) são mostradas na figura 2.7.

Como esperado, vários eventos foram necessários para tentar relacionar a proposta de Amorim & Pires (1996) com a filogenia dos Conopophagidae (Figura 2.7). As análises realizadas no programa *Treemap* sugeriram algumas hipóteses de eventos para explicar essas relações. Dessa maneira, foram propostos vários processos de especiação para tentar relacionar a relação entre táxons e área. Sendo assim, partindo da premissa que a história das áreas de endemismo proposta por Amorim & Pires (1996) esteja correta, é sugerido que o evento vicariante que teria isolado a região sudeste da Amazônia [Rondônia,

(a) Hipótese de Bates et al. (1998)

(b) Hipótese de Prum (1988)

(c) Hipótese de Amorim & Pires (1996)

Figura 2.6: Diagrama de associação entre as relações das áreas de endemismo (à esquerda) e a filogenia de Conopophagidae (à direita).

Tabela 2.6: Características das doze reconstruções com menores custos obtidas baseadas nas hipóteses de áreas de endemismo de três trabalhos e na filogenia de conopofagídeos. Os eventos (V- vicariância; S-simpatria; E- extinção; D- dispersão e EnV, eventos sem vicariância) e seus custos estão apresentados.

#	Hipóteses	V	S	E	D	EnV	Total
1	Amorim & Pires (1996)	12	10	3	4	17	17
2	Amorim & Pires (1996)	12	10	3	4	17	17
3	Amorim & Pires (1996)	12	10	3	4	17	17
4	Amorim & Pires (1996)	12	10	3	4	17	17
5	Bates et al. (1998)	14	8	8	3	19	19
6	Bates et al. (1998)	14	8	8	3	19	19
7	Bates et al. (1998)	14	8	9	2	19	19
8	Bates et al. (1998)	14	8	9	2	19	19
9	Prum (1988)	10	12	2	5	19	19
10	Prum (1988)	10	12	3	4	19	19
11	Prum (1988)	10	12	2	5	19	19
12	Prum (1988)	10	12	3	4	19	19

(AmSE)] da Mata Atlântica (Ma) também teria isolado o ancestral de *C. melanogaster* (Figura 2.7). Esse isolamento teria levado ao surgimento de *C. melanogaster* no sudeste da Amazônia (AmSE) e *C. melanops* na Mata Atlântica (Ma) (Figura 2.5). Após essa divergência, outro evento vicariante em Ma teria isolado os táxons *C. m. nigrifrons* (MaN) e *C. m. melanops* (MaS). Os táxons na região noroeste da América do Sul (NO) teriam surgido a partir da dispersão de um ancestral da Mata Atlântica, possivelmente antes desse último evento vicariante causador da diversificação dentro de *C. melanops*. O ancestral dos táxons distribuídos em NO teria se dispersado e se divergido em simpatria nessa região (Figura 2.5). Após essa especiação simpátrica ainda em NO, *C. l. cearae* teria se dispersado para os ambientes florestais no nordeste do Brasil - os “brejos de altitude” na Caatinga e norte da Mata Atlântica (MaN). *C. peruviana* seria outro táxon originado nessa divergência. Entretanto, essa espécie teria surgido após o evento vicariante que separou o sudoeste da Amazônia (AmSO), restringido sua distribuição a essa região. *C. ardesiaca* e *C. castaneiceps* também teriam suas origens sugeridas nesses eventos acima citados. No entanto, foi proposto para essas espécies um outro evento vicariante que teria separado as populações dos Andes Norte (NAN) e Andes Central (CAN) (Porzecanski & Cracraft 2005), na região sudoeste da Amazônia (AmSO). O mesmo evento vicariante que isolou as espécies no AmSO também teria restringido os táxons *C. roberti* e *C. a. pallida* na porção nordeste da Amazônia (AmNE). O desaparecimento desses táxons em algumas regiões da área de endemismo “Pará” seriam explicados devido à sua extinção local. Quanto à origem da distribuição atual de *C. lineata* e *C. a. australis*, foram propostas quatro pos-

sibilidades: 1) o ancestral de ambos teria se dispersado depois da vicariância que separou as áreas de endemismo Belém e Pará (Figura 2.7(a)); 2) somente o ancestral de *C. roberti* e *C. lineata* teria se dispersado após essa quebra (Figura 2.7(b)); 3) somente o ancestral de *C. aurita* teria se dispersado após a separação (Figura 2.7(c)), dando origem a *C. a. australis* e 4) para ambos a dispersão teria ocorrido antes da quebra do nordeste da Amazônia em Belém e Pará (Figura 2.7(d)). Após a dispersão de *C. lineata* para a Mata Atlântica, outro evento vicariante explicaria a distribuição dos táxons *C. l. lineata* ao norte da Mata Atlântica (MaN) e *C. l. vulgaris* ao sul da Mata Atlântica (MaS).

Figura 2.7: Reconstruções biogeográficas com os menores custos para explicar as relações entre áreas de endemismo na América do Sul (Amorim & Pires 1996) e a filogenia de Conopophagidae. □- especiação simpátrida; ●- vicariância; ○- dispersão, sendo ▲ a sua direção e *- extinção.

2.4 Discussão

2.4.1 Análises moleculares

Dentre as três regiões analisadas, o ND2 foi o que apresentou o maior número de sítios variáveis e informativos. Entretanto, o citocromo b também apresentou grande variação e sinal filogenético. O ND3, por ser o menor segmento, apresentou poucos sítios informativos (Tabela 2.4). A composição de bases dos genes analisados (Tabela 2.4) foi compatível com valores encontrados em outros estudos com aves (Aleixo 2002; Rice 2005a; Rice 2005b; Ribas et al. 2005; Brumfield & Edwards 2007). Em oposição a outros estudos com Aves (Griffiths 1997), não foi detectada saturação nas seqüências analisadas. Como esperado, a variação entre espécies próximas ocorreu principalmente na forma de substituições sinônimas, sendo na maioria transições.

As distâncias genéticas não corrigidas (distância-p) entre as espécies do gênero *Conopophaga* variaram entre 1% e 14%, sugerindo eventos de especiação antigos (Tabela 4.4). Esses valores são superiores, porém compatíveis a outros estudos com aves neotropicais que utilizaram os mesmos genes (Moreno & Silva 1997; Aleixo 2002; Ribas et al. 2005; Cabanne et al. 2007). Valores elevados de divergência intra-específica dentre subespécies de *C. lineata*, *C. melanops* e *C. aurita* sugerem que a diversidade de espécies pode estar subestimada devido a similaridades morfológicas. Portanto, esses filogrupos bem estruturados podem estar indicando uma incongruência entre diferentes conceitos de espécie. Sendo assim, essas subespécies, descritas sob o conceito biológico de espécie (Mayr 1963; Mayr 1977), merecem uma análise mais cuidadosa com o objetivo de reavaliar sua classificação segundo outros critérios.

No presente estudo foram analisadas inicialmente uma matriz de seqüências de 2270 pb de ND2, ND3 e Cit b de 38 indivíduos. A estratégia era obter uma matriz com a maior riqueza de informação possível para propor as relações filogenéticas entre os táxons da família Conopophagidae. Entretanto, essa matriz não recuperou todas as relações satisfatoriamente (Figura 2.4). A possível explicação seria a grande quantidade de “missing data” (1392 pb no total) em alguns táxons dessa matriz. A ausência de informação se encontrava nas seqüências obtidas do GenBank que são menores. Esses sítios foram retirados da matriz de dados que resultou em 878 caracteres. Essa matriz, apesar de menor, resultou em inferências com as relações entre espécies com melhor resolução (Figura 2.5). Entretanto, o teste de SH (Shimodaira & Hasegawa 1999) não rejeitou a hipótese de as topologias serem semelhantes. Com isso, as análises biogeográficas foram realizadas utilizando-se a topologia com maior resolução.

2.4.2 Sistemática

As análises filogenéticas realizadas nesse trabalho mostraram o gênero *Conopophaga* sendo monofilético (Figuras 2.4 e 2.5). Mesmo a análise com 2270 pb, na qual as relações entre as espécies não ficou clara, a linhagem do gênero foi recuperada. *Pittasoma michleri* e *P. rufopileatum* foram as espécies amostradas mais próximas dos Conopophagidae. Essa relação próxima entre os gêneros *Pittasoma* e *Conopophaga* está em concordância com Rice (2005b) que propôs uma relação mais próxima dessas espécies com *C. lineata* e *C. peruviana* do que com outras espécies de Thamnophilidae. Além disso, Whitney (2003) sugere o gênero *Pittasoma* como um possível irmão de *Conopophaga* devido a características moleculares, morfológicas e de voz. Sendo assim, esses gêneros teriam uma história evolutiva recente comum, na qual *Pittasoma* representaria a radiação nas terras baixas do oeste dos Andes (Whitney 2003). Esse mesmo autor ainda sugere que *C. melanogaster* deveria ser excluída do gênero *Conopophaga* baseado na presença de características exclusivas dessa espécie. Assim, a presença de espécies do gênero *Pittasoma* também nos possibilitou testar essa sugestão de Whitney (2003). No entanto, os dados aqui apresentados indicam que essas apomorfias de *C. melanogaster* sejam resultado de uma especiação muito antiga dentro do grupo. Pois em todas as inferências filogenéticas realizadas nesse estudo, *C. melanogaster* se apresentou como a espécie mais basal dentro do gênero. Sendo assim, esse trabalho não apóia a hipótese de parafiletismo para o gênero *Conopophaga*.

Conopophaga melanops é outra espécie que apresenta algumas características únicas dentro do gênero (Whitney 2003). Por exemplo, a ausência da lista pós-ocular branca e do som emitido pelas asas, presentes em todas as espécies da família, levaram Whitney (2003) a propor diferentes alternativas para a relação com as demais espécies do grupo: a) essas características seriam derivadas, sendo *C. melanops* a mais recente divergência dentro do grupo; b) pelo contrário, essas características seriam basais à radiação de todos os Conopophagidae ou c) a espécie tem origem em mais de uma colonização da Mata Atlântica a partir de táxons da Amazônia ou dos Andes, ou seja teria se divergido mais recentemente. Os dados que obtivemos sugerem que *C. melanops* é basal a todas as demais espécies, exceto *C. melanogaster*. Além disso, o táxon possui uma grande divergência molecular intra-específica, separando os indivíduos ao norte e sul do rio São Francisco. Essa divergência também é observada na coloração da plumagem e na vocalização (Pessoa 2001). Sendo assim, os táxons *C. m. nigrifrons* e *C. m. melanops* formam grupos reciprocamente monofiléticos e possuem caracteres diagnósticos. Esses seriam os pre-requisitos necessários para o reconhecimento desses táxons como espécies válidas segundo o conceito filogenético de espécie [PSC, (Cracraft 1983)].

É sugerido então que esses táxons possam ser reconhecidos como espécies distintas sob o conceito filogenético de espécie. Entretanto, uma amostragem mais ampla é necessária tanto para realizar análises moleculares quanto morfológicas.

A relação entre os demais táxons não foi recuperada na análise realizada com 2270 pb (Figura 2.4). Já as árvores obtidas com 878 pb mostram uma primeira separação com suporte baixo em dois grandes grupos: um formado pelas espécies *C. peruviana* e *C. aurita*; e outro formado pelos demais táxons: [[(*C. l. cearae*,(((*C. l. lineata*, *C. l. vulgaris*), *C. roberti*),(*C. castaneiceps*, *C. ardesiaca*))]] (Figura 2.5). Os curtos ramos que levam a esses agrupamentos sugerem que houve uma rápida radiação. Apesar de uma análise morfológica detalhada não ter sido realizada nesse trabalho, foi possível observar que a coloração da mandíbula seria congruente com a topologia encontrada na análise com 878 pb. Pois esse último grande grupo citado possui a coloração branca da mandíbula como sinapormorfia. Já o outro clado formado por *C. peruviana* e *C. aurita* compartilha a coloração negra da mandíbula com *C. melanops* e *C. melanogaster*.

No grande grupo com mandíbula branca, *C. lineata* não foi recuperada como uma espécie monofilética. *C. l. cearae*, classificada como uma subespécie de *C. lineata*, é apontado como o primeiro táxon a se separar dos demais. Apesar das semelhanças morfológicas, esses táxons ocupam ambientes distintos (Whitney 2003). Enquanto *C. l. lineata* e *C. l. vulgaris* ocorrem em florestas úmidas e semi-úmidas da Mata Atlântica, *C. l. cearae* ocorre nos brejos de altitude de ambientes secos (ex. Caatinga). Whitney (2003) sugeriu elevar esse táxon ao nível de espécie baseado em característica de plumagem e vocalização. Um outro ponto levantado por esse autor é que exemplares de Ibiquera (próximo a Chapada Diamantina, BA) possuem a garganta mais esbranquiçada e o boné mais castanho-avermelhado e, por isso, segundo Whitney (2003), poderiam pertencer a um táxon ainda não descrito. No entanto, essas características morfológicas já foram descritas para *C. l. cearae* (Ridgely & Tudor 1994; Whitney 2003), o que descartaria a hipótese de esses exemplares serem uma espécie nova. Somado a isso, indivíduos coletados em Bonito, BA e analisados no presente trabalho possuíam essas características e se encontram dentro do clado *C. l. cearae*. Sendo assim, esse trabalho sugere que o táxon *C. l. cearae* seja reconhecido com uma espécie válida (*C. cearae*) e os indivíduos do interior da Bahia pertencem a essa espécie.

As demais linhagens que correspondem às espécies que possuem a mandíbula branca possuem nós com suporte alto. Além disso, *C. lineata* e *C. roberti* formam um grupo com bom suporte e cada espécie ocorre em um bioma diferente. Enquanto *C. roberti* se distribui a leste da Floresta Amazônica, *C.*

lineata ocorre na Mata Atlântica e florestas de galeria do Cerrado. Apesar de distintas na coloração da plumagem, essas espécies compartilham algumas características de vocalização. A exemplo de *C. melanops*, *C. lineata* também possui subespécies muito divergentes se distribuindo na Mata Atlântica. Sendo assim, tanto *C. l. lineata*, quanto *C. l. vulgaris* também apresentam características moleculares e morfológicas que apoiam o reconhecimento desses táxons como espécies válidas sob o conceito filogenético de espécie (Cracraft 1983). Entretanto, uma análise mais detalhada e com maior amostragem é necessária para auxiliar no entendimento dos processos que levaram a essa diversificação, além de refinar os limites das distribuições dessas espécies.

2.4.3 Biogeografia

Dentre as três hipóteses analisadas (Prum 1988; Bates et al. 1998; Amorim & Pires 1996), a hipótese de Amorim & Pires (1996) foi selecionada por ter apresentado o menor custo total. Vários eventos foram sugeridos para associar a distribuição atual da família Conopophagidae com as relações entre áreas de endemismo propostas por Amorim & Pires (1996). Com base nessa associação, o programa Treemap indicou alguns possíveis eventos que podem ter resultado na diferenciação dos táxons estudados. Entretanto, como a história biogeográfica tanto do grupo estudado, quanto das áreas de endemismo podem não ter ocorrido de maneira parcimoniosa, os processos a serem sugeridos nesse trabalho tem suas limitações. Além disso, fazer generalizações biogeográficas a partir da associação entre a história de um só grupo de organismos (Conopophagidae) com uma propostas realizadas a partir da análise de vários outros organismos, pode levar a generalizações incorretas. Entretanto, as informações não deixam de contribuir para o entendimento dos padrões biogeográficos que ocorreram na América do Sul.

A distribuição de alguns táxons analisados no presente estudo sugere o modo de especiação alopátrido. Entretanto, dependendo da escola biogeográfica a análise dessa informação pode variar na maneira como a dispersão é interpretada. Sendo assim, sob o paradigma vicariante, eventos de dispersão, tais como expansões populacionais, seriam mais raros e acompanhados por uma série de eventos de isolamento (Zink et al. 2000). Dessa maneira, se os eventos de isolamento afetaram vários organismos simultaneamente, esse processo resultaria em topologias congruentes. Por outro lado, a escola dispersionista considera a expansão como um evento comum. Dessa maneira, inferências conflitantes e incongruentes poderiam ser explicadas como eventos de dispersão através de barreiras pré-existentes em diferentes épocas. Além disso, diferenças encontradas entre os ramos terminais poderiam ser interpretadas como respostas diferentes dos organismos em relação às barreiras

ou mesmo à extinção de algumas linhagens. Sendo assim, quando eventos de dispersão são raros e associados a eventos de vicariância a reconstrução da história biogeográfica torna-se mais coerente.

Muitos autores têm discutido a origem e relações entre áreas de endemismo e não há um consenso. Entende-se que a formação dessas áreas é dependente de um isolamento em comum de organismos em certas regiões (Cox & Moore 2005).

Várias propostas (Brown Jr. 1977; Cracraft 1985; Haffer 1969; Amorim & Pires 1996; Silva et al. 2004) apontam eventos de vicariância como sendo a principal causa dos padrões observados. A maioria dessas propostas associou os eventos à inundações e/ou movimentos tectônicos, sendo a dispersão também aceita em alguns casos.

Os resultados encontrados na família Conopophagidae sugerem a ocorrência de vários tipos de eventos (vicariância, dispersão e extinção) que levaram à diferenciação de táxons. Além disso, a distribuição de alguns táxons coincide pelo menos em parte com áreas de endemismo e por isso parece indicar que esses eventos podem ser compartilhados com outros organismos.

Os quatro cenários de possíveis eventos mais parcimoniosos para explicar a associação entre a filogenia de Conopophagidae e a proposta de áreas de endemismo de Amorim & Pires (1996) (Figura 2.7) indicam que a quebra entre o noroeste (NO) e sudeste da América do Sul (SE) seria um evento mais antigo que a primeira diversificação dentro da família Conopophagidae. Amorim & Pires (1996) apontam como as principais causas dessa quebra NO vs. SE a formação lacustre na bacia Amazônica durante o Cretáceo. Como não foi calculada a divergência entre a família Conopophagidae e o grupo externo, não foi possível avaliar se haveria congruência de datas. Além disso, como ocorreram múltiplos eventos de transgressão marinha na América do Sul (Marroig & Cerqueira 1997) não é possível afirmar que esse seja o evento vicariante responsável pela formação das duas regiões.

Segundo Amorim & Pires (1996), após a primeira divisão da América do Sul, o componente SE se separou em sudeste da Amazônia (AmSE) e Mata Atlântica (Ma). Sendo assim, esses autores sugerem que a Floresta Amazônica não seja uma unidade biogeográfica histórica. Essa hipótese também foi sugerida por Cracraft (1988) e Prum (1988), apesar de as relações entre áreas propostas serem diferentes. Por outro lado, Bates et al. (1998) discordando desses autores, sugeriram que tanto a Floresta Amazônica quanto a Mata Atlântica seriam unidades históricas. Entretanto, o estudo de Bates et al. (1998) não foi baseado em filogenias. Assumindo essa separação entre AmSE e Ma, um evento vicariante teria levado ao isolamento e especiação de *C. melanogaster* no AmSE e de *C. melanops* na Ma. Sendo assim, a filogenia dos

Conopophagidae apóia a hipótese de uma Floresta Amazônica composta. Mais recentemente, Ribas et al. (2005) também propuseram que espécies de aves do oeste da Amazônia seriam basais às demais espécies do leste e centro da América do Sul.

Após a separação do sudoeste da Amazônia, como sugerido por (Amorim & Pires 1996), na filogenia de Conopophagidae deveria ter ocorrido um evento de dispersão do ancestral atlântico para o nordeste da América do Sul (NE). É importante notar que os resultados sugerem outras duas dispersões em sentido contrário, da Mata Atlântica para a Floresta Amazônica. Uma segunda dispersão após a especiação simpátrica em NE teria resultado em *C. l. cearae*. Já uma outra dispersão do nordeste da Amazônia para a Mata Atlântica teria dado origem às demais subespécies de *C. lineata*. Isso sugere que de alguma maneira ocorreram contatos entre a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica através do leste da América do Sul.

Segundo Whitney (2003), *C. l. cearae* ocorre em matas de galeria do Cerrado ou brejos de altitude na Caatinga. Sendo assim, apesar de ser uma espécie florestal, esse táxon ocorre em biomas típicos de áreas abertas. Costa (2003), em seu estudo com pequenos mamíferos, sugere que as matas de galeria do Cerrado poderiam atuar como conexão entre a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica. Sendo assim, a distribuição de *C. l. cearae* e as relações encontradas entre espécies amazônicas e da Mata Atlântica parecem apoiar esse hipótese.

A proposta de dispersão para explicar a relação entre *C. lineata* e *C. roberti* ocorreu devido à associação entre a filogenia dos Conopophagidae e a hipótese de Amorim & Pires (1996) ser mais parcimoniosa. Entretanto, existem trabalhos que sugerem que a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica já foram conectadas através do nordeste do Brasil, onde atualmente ocorre a Caatinga (Bigarella et al. 1975). Segundo Bigarella et al. (1975), esse contato entre as florestas foi resultado de eventos de expansão e retração florestais devido a mudanças climáticas globais. Cracraft (1988) e Prum (1988) sugeriram que o nordeste da Amazônia (Belém e Pará) e a Mata Atlântica fossem áreas mais relacionadas. Mais recentemente, Melo-Santos et al. (2007) também sugeriram que uma conexão entre essas florestas no passado explicaria a relação mais próxima entre a Mata Atlântica do nordeste do Brasil e as Florestas do nordeste da Amazônia.

No presente estudo, ao testar a hipótese de Prum (1988), a relação entre *C. roberti* e *C. lineata* seria explicada por vicariância. A diferença entre a hipótese de Prum (1988) e a de Amorim & Pires (1996) está na posição da área de endemismo Rondônia. Como *C. melanogaster* ocorre nessa área e é basal a todas as outras espécies do gênero, o algoritmo *jungle*, utilizado pelo programa

Treemap, julgou mais parcimoniosa a hipótese de Amorim & Pires (1996). Isso porque a separação mais antiga dessa espécie levaria a um menor custo total quando associado a hipótese de Amorim & Pires (1996) do que à hipótese de Prum (1988).

Segundo Page (1994), nas análises de coevolução devem ser maximizados eventos de co-divergência. Isso seria o equivalente a maximizar eventos de vicariância em problemas biogeográficos. Talvez uma alternativa para generalizar as propostas baseadas na filogenia dos Conopophagidae e que comporte a sugestão de Page (1994), seja combinar as hipóteses de Prum (1988) e Amorim & Pires (1996). Dessa maneira, seria apoiada a hipótese que a Amazônia não constitui uma unidade histórica, sendo Rondônia pertencente ao componente sudeste da América do Sul (SE). Porém, seria sugerido a inclusão do nordeste da Amazônia (AmNE) ao componente SE, ou a inclusão do norte da Mata Atlântica (MaN) na região noroeste da América do Sul (NO).

Concluindo, essas tentativas de se encontrar um único padrão geral biogeográfico para explicar a biodiversidade Neotropical é criticado por alguns autores (Costa 2003). Em alguns casos essas generalizações são consideradas prematuras (Marks et al. 2002). Isso porque essas análises ainda são baseadas em padrões individuais, com diferenças em escalas de tempo e espaço. Sendo assim, as sugestões propostas a partir do gênero *Conopophaga* podem não ser coincidentes com outros grupos. Entretanto, esses resultados podem contribuir para o entendimento dos padrões biogeográficos que ocorreram na América do Sul.

Referências Bibliográficas

- Aleixo, A. (2002). Molecular systematics and the role of várzea -terra-firme ecotone in the diversification of *Xiphorhynchus* woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Auk* 119, 621–640.
- Amorim, D. & M. R. S. Pires (1996). Neotropical biogeography and a method for maximum biodiversity estimation. In C. E. M. Bicudo & N. A. Menezes (Eds.), *Biodiversity in Brazil, a First Approach*, pp. 183–219. São Paulo: CNPq.
- Bates, J. M., S. J. Hackett, & J. Cracraft (1998). Area-relationships in the neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *Journal of Biogeography* 25, 783–793.
- Bigarella, J. J., D. Andrade-Lima, & P. J. Riehs (1975). Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 47, 411–464.
- Brown, J. H. & M. V. Lomolino (1998). *Biogeography* (2 ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Brown Jr., K. S. (1977). Geographical patterns of evolution in Neotropical Lepidoptera: differentiation of the species of *Melinaea* and *Merchanitis* (Nymphalidae, Ithomidae). *Systematic Entomology* 2, 161–197.
- Bruford, M. W., O. Hanotte, J. F. Y. Brookfield, & T. Burke (1992). Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In C. A. R. Hoelzel (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*, pp. 225–269. New York: Oxford University Press.
- Brumfield, R., J. Tello, Z. Cheviron, M. Carling, N. Crochet, & K. Rosenberg (2007). Phylogenetic conservatism and antiquity of a tropical specialization: Army-ant-following in the typical antbirds (Thamnophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 1–13.
- Brumfield, R. T. & A. P. Capparella (1996). Historical diversification of birds in northwestern South America: a molecular perspective on the role of vicariant events. *Evolution* 50, 1607–1624.
- Brumfield, R. T. & S. V. Edwards (2007). Evolution into and out of the Andes: a Bayesian analysis of historical diversification in *Thamnophilus* antshrikes. *Evolution* 61, 346–367.
- Bush, M. B. (1994). Amazonian speciation: a necessarily complex model. *Journal of Biogeography* 21, 5–17.

- Cabanne, G. S., F. R. Santos, & C. Y. Miyaki (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91, 73–84.
- Charleston, M. A. (1998). Jungles: a new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem. *Mathematical Biosciences* 149, 191–223.
- Charleston, M. A. & R. D. M. Page (2001). Treemap for macintosh.version 2.0. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treemap.html>.
- Chesser, R. T. (1999). Molecular phylogenetics of the rhinocryptid genus *Pteroptochos*. *Condor* 101, 439–445.
- Costa, L. P. (2003). The historical bridge between the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30, 71–86.
- Cox, C. B. & D. Moore (2005). *Biogeography: an ecological and evolutionary approach* (7 ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. In R. F. Johnston (Ed.), *Current Ornithology*, pp. 159–187. New York: Plenum Press.
- Cracraft, J. (1985). Historical biogeography and patterns of differentiation within the south american avifauna: areas of endemism. *Neotropical Ornithology* 36, 49–84.
- Cracraft, J. (1988). Deep-history biogeography: retrieving the historical pattern of evolving continental biotas. *Systematic Zoology* 37, 221–236.
- Cracraft, J. & R. Prum (1988). Patterns and process of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. *Evolution* 42, 603–620.
- de Paula, A. S., L. Diotaiuti, & C. Galvao (2007). Systematics and biogeography of rhodniini (heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16s mitochondrial rdna sequences. *Journal of Biogeography* 34, 699–712.
- Endler, J. A. (1977). *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton: Princeton University Press.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Griffiths, C. S. (1997). Correlation of functional domains and rates of nucleotide substitution in cytochrome b. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 352–365.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165, 131–137.

- Haffer, J. (1985). Avian zoogeography of the neotropical lowlands. *Neotropical Ornithology* 36, 113–146.
- Haffer, J. (1997). Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6, 451–476.
- Hasegawa, M., H. Kishino, & T. Yano (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160–174.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Kumar, S., K. Tamura, & M. Nei (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150–163.
- Marks, B. D., S. Hackett, & A. Capparella (2002). Historical relationships among neotropical lowland forest areas of endemism as determined by mitochondrial DNA sequence variation within the Wedge-billed Woodcreeper (Aves: Dendrocolaptidae: *Glyphorhynchus spirurus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24, 153–167.
- Marroig, G. & R. Cerqueira (1997). Plio-Pleistocene South American history and the Amazon Lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *Journal of Computational Biology* 2, 103–119.
- Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Cambridge: Harvard University Press.
- Mayr, E. (1977). *Populações, Espécies e Evolução*. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo.
- Melo-Santos, A. M., D. R. Cavalcanti, J. M. C. d. Silva, & M. Tabarelli (2007). Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *Journal of Biogeography* 34, 437–446.
- Moreno, J. G. & J. M. C. Silva (1997). Interplay between Forest and non-forest South American avifaunas suggested by phylogeny of Lepdocolaptes woodcreepers (*Dendrocolaptinae*). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 32, 164–173.
- Moritz, C., J. L. Patton, C. J. Schneider, & T. Smith (2000). Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 533–563.
- Morrone, J. J. (2001). *Biogeografía de América Latina y el Caribe*. Zaragoza: Sociedad Entomológica Aragonesa.

- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nihei, S. S. & C. J. B. Carvalho (2007). Systematics and biogeography of *Polietina* Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae): Neotropical area relationships and Amazonia as a composite area. *Systematic Entomology* 32, 477–501.
- Page, R. D. & M. A. Charleston (1998). Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 356–359.
- Page, R. D. M. (1994). Parallel phylogenies: Reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics* 10, 155–173.
- Patton, J. & M. N. F. Silva (1998). Rivers, refuges, and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. In D. Howard & S. Berlocher (Eds.), *Endless Forms: Modes and Mechanisms of Speciation*, pp. 202–213. New York: Oxford University Press.
- Pereira, S. L. & A. J. Baker (2004). Low number of mitochondrial pseudogenes in the chicken (*Gallus gallus*) nuclear genome: implications for molecular inference of population history and phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4, 1–8.
- Pessoa, R. O. (2001). Variação Geográfica em *Conopophaga melanops* (Aves: Conopophagidae), uma espécie endêmica da Mata Atlântica. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba.
- Pinto, O. M. O. (1978). *Novo Catálogo das Aves do Brasil*. São Paulo: Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais.
- Platnick, N. & N. G. J. (1978). A method of analysis for historical biogeography. *Systematic Zoology* 27, 1–16.
- Porzecanski, A. L. & J. Cracraft (2005). Cladistic analysis of distributions and endemism (CADE): using raw distributions of birds to unravel the biogeography of the South American aridlands. *Journal of Biogeography* 32, 261–275.
- Posada, D. & K. A. Crandall (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Prum, R. O. (1988). Historical relationships among avian forest areas of endemism in the Neotropics. In *Acta XIX Congressus Internationalis Ornithologici*, pp. 2562–2572.
- Ribas, C. C., R. Gaban-Lima, C. Y. Miyaki, & J. Cracraft (2005). Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography* 32, 1409–1427.

- Rice, N. H. (2005a). Further evidence for paraphyly of the Formicariidae (Passeriformes). *The Condor* 107, 910–915.
- Rice, N. H. (2005b). Phylogenetic relationships of antpitta genera (Passeriformes: Formicariidae). *Auk* 122, 673–683.
- Ridgely, R. S., T. F. Allnutt, T. Brooks, D. K. McNicol, D. W. Mehlman, B. E. Young, & J. R. Zook (2005). *Digital Distribution Maps of the Birds of the Western Hemisphere, version 2.1*. Arlington: NatureServe.
- Ridgely, R. S. & G. Tudor (1994). *The Birds of South America: The Suboscine Passerines*. London: Oxford University Press.
- Ridgely, R. S. & G. Tudor (1994). *The Birds of South America (Vol. II - The Suboscine Passerines)* (1 ed.), Volume II. Austin: University of Texas Press.
- Rodríguez, F., J. L. Oliver, A. Marín, & R. Medina (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142, 485–501.
- Ronquist, F. (1997). Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46, 195–203.
- Sanmartin, I. & F. Ronquist (2004). Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Systematic Biology* 53, 216 – 243.
- Schneider, H. (2003). *Métodos de análise filogenética: um guia prático* (2 ed.). Ribeirão Preto: Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Genética.
- Shimodaira, H. & M. Hasegawa (1999). Multiple comparisons of log likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* 16, 1114–1116.
- Sibley, C. G. & J. E. Ahlquist (1990). *Phylogeny and Classification of Birds*. New Haven: Yale Univ. Press.
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira* (3 ed.). Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Silva, J. M. C., M. C. Sousa, & Castelletti (2004). Areas of endemism for passerine birds in Atlantic fores, South America. *Global Ecology and Biogeography* 13, 85–92.
- Sorenson, M. D., J. C. Ast, D. E. Dimcheff, T. Yuri, & D. P. Mindell (1999). Primers for pcr-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12, 105–114.
- Sorenson, M. D. & T. W. Quinn (1998). Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *Auk* 115, 214–221.

- Swofford, D. L. (2002). *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using with Parsimony (* and other methods)*. Version 4.0b10 (19 ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, & D. Higgins (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- Vanzolini, P. E. & E. E. Williams (1970). South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo* 19, 1–298.
- Wallace, A. R. (1852). On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London* 20, 107–110.
- Whitney, B. M. (2003). Family Conopophagidae. In J. del Hoyo, A. Elliot, & D. A. Christie (Eds.), *Handbook of the Birds of the World: Broadbills to Tapaculos*, Volume 8, pp. 732–747. Barcelona: Lynx Edicions.
- Xia, X. & Z. Xie (2001). DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92, 371–373.
- Zink, R. M., R. Blackwell-Rago, & F. Ronquist (2000). The shifting roles of dispersal and vicariance in biogeography. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267, 497–503.

Filogeografia e demografia histórica de *Conopophaga lineata*: fragmentação histórica no sudeste da Mata Atlântica

3.1 Introdução

A origem da alta diversidade biológica na região Neotropical tem sido tema de vários estudos, principalmente na Amazônia. Apesar da grande riqueza de espécies na Mata Atlântica, poucos trabalhos analisaram os processos históricos que modelaram a distribuição de sua diversidade. Dentre esses estudos, alguns se basearam em dados moleculares que permitiram testar hipóteses biogeográficas (Cabanne et al. 2007; Costa 2003; Costa et al. 2000; Lara & Patton 2000; Mustrangi & Patton 1997; Pellegrino et al. 2005). As principais hipóteses discutidas foram os efeitos dos rios atuando como barreiras ao fluxo gênico, dos refúgios florestais e dos gradientes ecológicos [revisado por (Moritz et al. 2000)].

A teoria dos rios atuando como barreiras foi proposta originalmente por (Wallace 1852). Sua principal predição é que se um rio for uma barreira efetiva, grupos de indivíduos de uma mesma espécie, ao serem isolados em margens opostas do rio por um tempo suficiente, podem originar novas espécies. Além disso, quando mais largo for o rio, mais forte será seu efeito como barreira. Na Mata Atlântica, Pellegrino et al. (2005) propuseram que rios podem ser importantes no processo de diversificação do pequeno lagarto

Gymnodactylus darwini. Silva & Straube (1996) também sugeriram que a formação do curso dos rios e tectonismo podem ser fatores que promoveram a especiação da espécie de ave *Lepidocolaptes squamatus* no vale do rio Paraíba do Sul. Mais estudos seriam necessários para avaliar a importância dessa teoria na diversificação da Mata Atlântica.

A hipótese dos refúgios florestais é uma das teorias mais discutidas dentre os modelos de especiação alopátrido (Haffer 1969; Vanzolini & Williams 1970). Essa hipótese propõe que alterações climáticas geraram contrações e expansões de florestas e savanas, isolando os organismos em refúgios. Dado o tempo suficiente, esse isolamento promoveria especiação. Na Mata Atlântica, foram apresentados padrões de distribuição de espécies de mamíferos que não apoiaram essa hipótese ao longo das escarpas costeiras (Lara & Patton 2000; Mustrangi & Patton 1997). Entretanto, Cabanne et al. (2007) sugeriram que populações ancestrais de *Xiphorhynchus fuscus* podem ter se divergido como consequência da fragmentação do habitat no Pleistoceno. Além disso, as análises de Fjeldsa (1994) sugerem que as espécies mais recentes da Floresta Atlântica ocorrem na região central, nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, devido à formação da Serra do Mar. Seria então importante testar este modelo, já que estas regiões estão atualmente localizadas entre reconhecidos refúgios do Pleistoceno (Moritz et al. 2000). Esses trabalhos sugerem que o modelo dos refúgios pode ser plausível para o entendimento dos processos de especiação na Mata Atlântica e que mais estudos filogeográficos precisam ser desenvolvidos.

Endler (1977) propôs que a heterogeneidade de hábitat promove a cladogenese em ambientes tropicais através de forte seleção divergente em gradientes ecológicos. A principal predição da hipótese dos gradientes ecológicos é que espécies irmãs devem ocupar habitats distintos, porém adjacentes (Moritz et al. 2000). Apesar da grande variação de altitude, latitude e tipos florestais encontrados na Mata Atlântica (Joly et al. 1991), a importância do gradiente ecológico na diversificação desse bioma ainda não foi testada. Em florestas Neotropicais, Patton et al. (1990) e Patton & Smith (1992) analisaram essa hipótese utilizando espécies de roedores dos Andes como modelo. Esses estudos rejeitaram a hipótese dos gradientes e apoiaram modelos de vicariância. No entanto, a Mata Atlântica por apresentar uma grande variação de habitats, torna-se um importante bioma para se testar esse modelo.

A espécie *Conopophaga lineata* se distribui principalmente na Mata Atlântica, ocorrendo também no Cerrado e na Caatinga (Sick 1997). É uma espécie insetívora e generalista, podendo ser considerada dependente florestal. Pode utilizar hábitat de bordas e florestas secundárias, o que facilita a sua vida em ambientes perturbados. Sua distribuição vai do Ceará ao Rio Grande do Sul,

Goiás, leste do Mato Grosso, Paraguai e Argentina. Existem três subespécies (*C. l. lineata* (Wied), *C. l. vulgaris* Ménériès e *C. l. cearae* Cory) reconhecidas pela sua variação de cor, vocalização e proporções morfométricas (Sick 1997; Whitney 2003). O limite da distribuição dessas subespécies ainda não é muito claro. Parece haver uma sobreposição entre *C. l. lineata* e *C. l. vulgaris* em Minas Gerais. Dado sua distribuição e suas características, como a dependência de floresta, *C. lineata* pode ser um bom modelo para investigar a história de diversificação da Mata Atlântica.

Neste capítulo foram analisadas seqüências de DNA mitocondrial de populações de *Conopophaga lineata* do sudeste da Mata Atlântica com o objetivo de reconstruir sua história biogeográfica. Foram avaliadas as predições das hipóteses de rios atuando como barreira, gradiente ecológico, refúgios e neotectonismo na Floresta Atlântica. Os tempos de divergência e de expansão demográfica foram estimados, sendo proposto duas hipóteses filogeográficas para a história de diversificação das linhagens de *C. lineata*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Área de estudo e amostragem

77 amostras de *Conopophaga lineata* foram coletadas em fragmentos de Mata Atlântica nos estados brasileiros da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além da província de Misiones na Argentina (Figura 3.1, Tabela 3.1). Os espécimes coletados foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), sendo extraídas amostras de músculo desses exemplares. Além desses, outros indivíduos foram capturadas com redes de neblina. Amostras de sangue foram coletadas ($\approx 0,1$ ml) com o auxílio de seringas de insulina na veia mais larga da região cervical ou do tarso. Todos os tecidos coletados foram depositados no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo) e no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais), ambos no Brasil.

Tabela 3.1: Localidades das coletas, haplótipos, tamanho amostral (N) e coordenadas geográficas das amostras de *C. lineata* utilizadas.

Num ¹	Localidades	Haplótipos ²	N
1	Serra das Lontras, Arataca, BA	L1	1
2	Barreiro, Belo Horizonte, MG	L2	2
3	Araponga, MG ³	N7	1
4	Nova Lima, MG ³	N4 (2), N7, N8, N9, N10	6
5	P. N. Itatiaia, RJ	N1, N3, N5, N6	4
6	E. E. Bananal, SP	N3, N4, N5	3
7	Morro Grande, SP	S1, S2, S5 (3), S6, S19, S21, N2	9
8	Barreiro Rico, SP	S7	1
9	São Roque, SP	S3, S5 (2), S14	4
10	Morro do Diabo, SP	S22, S23, S24 (3), S25	6
11	Piedade, SP	S3, S15, S18	3
12	Buri, SP	S2, S11, S15 (5), S16, S17, S19	10
13	Wenceslau Bras, PR	S10	1
14	Itabera, SP	S8, S9, S10 (2)	4
15	Juquitiba, SP	S19	1
16	Pinhalão, PR	S19	1
17	PESM, núcleo Curucutu, SP	S5, S12, S25	3
19	PETAR, núcleo Caboblos	S4, S20	2
18	Rancho Queimado, SC	S25 (2), S26, S28, S30, S31	6
20	Misiones, Argentina	S26 (4), S27	5
21	Arroio do Padre, RS	S13, S28, S29 (2)	4

¹Número da localidade no mapa

²Números em parênteses representam o número de indivíduos com o haplótipo correspondente.

³Tecidos depositados na Universidade Federal de Minas Gerais. As demais amostras estão depositadas na Universidade de São Paulo.

3.2.2 Análises moleculares

Foi extraído DNA de amostras de sangue e de músculo pelo método convencional de fenol-clorofórmio (Bruford et al. 1992). Um fragmento de aproximadamente 1200 pb da região controladora (RC) foi amplificado utilizando-se o par de oligonucleotídeo iniciador (“primer”) L1 (5’ TCCACACTCGACATCTCATT 3’; E. Sari, com. pessoal) e H16137 (5’ AAAATRYCAGCTTTGGGAGTTG 3’; Lacerda 2004). As reações de amplificação (PCR) ocorreram em termociclador (Mastercycler - Eppendorf) em tubos de 200 µl contendo: 1 µl de tampão 10x concentrado (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl, Pharmacia), 1 µl de dNTPs (2 mM), 1 µl de cada “primer” (10 µM), 4,9 µl de água milli-Q, 1 µl de DNA (1-20 ng) e 0,1 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl). As reações foram executadas com um passo inicial de 94 °C por 2min e 35 ciclos de 30s a 94 °C, 40s a 57 °C e 90s a 72 °C, seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com Fosfatase alcalina de camarão e Exonuclease I. Para as reações de sequenciamento foram usados os “primers” de

Figura 3.1: Área de estudo, localidades amostradas e distribuição das linhagens mitocondriais de *Conopophaga lineata*. Números correspondentes à Tabela 3.1.

amplificação e “primers” internos LEC2 (5’ TGTACCTGTTGTGGTCGGCGTA 3’; Sari com. pessoal) e H4 (5’ TTGACGAGGTAAAAATATGTCT 3’; Lacerda 2004). Essas reações foram executadas com o “kit Big Dye Terminator” ver3.0 (Applied Biosystems Inc) e precipitados com isopropanol 75% e etanol 70%. As corridas foram realizadas nos sequenciadores ABI Prism 377 ou ABI Prism 3700 (Applied Biosystems).

Inicialmente, foram analisados 1048 pb da região controladora de 28 indivíduos revelando que a porção mais variável compreendia o domínio III. Um segmento de 467 pb dessa região foi então usada nas análises filogeográficas com 77 indivíduos. As seqüências foram alinhadas manualmente com o auxílio do programa Clustal X (Thompson et al. 1997) e Bioedit 7.0.5.2 (Hall 1999). As relações filogenéticas foram reconstruídas pelos métodos de distância de “Neighbor Joining” (Saitou & Nei 1987) no programa MEGA 2.1 (Kumar et al. 2001) e de máxima parcimônia (MP) utilizando o software PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). Foi usado o parâmetro de busca heurística por “stepwise-addition”, com árvores iniciais obtidas por 10 adições aleatórias de táxons. O suporte dos ramos foi avaliado por “bootstrap” não paramétrico (Felsenstein 1985), com 1000 réplicas para ambos os métodos. A distância genética foi corrigida pelo modelo de K. & Nei (1993). *Conopophaga melanops* e *C. roberti* foram utilizados como grupo externo devido à suas proximidades filogenéticas com *C. lineata*. As linhagens obtidas nessa topologia foram consideradas na análise de variância molecular [AMOVA; Cockerham 1969; Excoffier et al. 1992] e testes estatísticos de diversidade genética (diversidade nucleotídica [π], número de diferenças par a par [k] e número de sítios polimórficos [s] e composição de bases) foram conduzidos usando o programa Arlequin 3.01 (Excoffier et al. 2005).

Foi também construída uma rede de haplótipos seguindo Templeton et al. (1992) utilizando o programa TCS 1.21 (Clement et al. 2000). Foram então definidos nessa rede agrupamentos seguindo (Templeton 1998) e as ambigüidades foram resolvidas seguindo (Templeton et al. 1987). Devido à baixa amostragem de *C. l. lineata* e sua grande distância genética para os demais indivíduos, a “nested clade analysis” (NCA) foi usada para testar a hipótese nula de ausência de associação geográfica somente dos haplótipos de *C. l. vulgaris*. A análise desses agrupamentos foi feita no programa Geodis 2.5 (Posada 2000) utilizando-se a chave versão de novembro de 2005.

O tempo de divergência entre linhagens de *C. l. vulgaris* e dessas para *C. l. lineata* foi estimado usando a distância líquida entre grupos e uma taxa de substituição estimada para a região controladora (RC) seguindo Avise & Walker (1998). Como não há uma taxa de substituição específica para a região controladora de passeriformes, uma taxa foi estimada comparando-se com

taxas de mutação conhecidas da literatura para o citocromo b (Cit b). Para tanto, foram seqüenciados 472 pb da RC e 768 pb de cit b de 28 indivíduos. A distância não corrigida par a par foi calculada para ambos os marcadores separadamente (dados não apresentados). A razão entre essas divergências foi utilizada para se calcular a taxa de mutação da RC, multiplicando-se as taxas utilizadas na literatura para citocromo b pela razão encontrada entre as divergências. As taxas para o citocromo b utilizadas foram: a) baseada em calibração geológica, no caso a formação de ilhas (1.6% /milhão de anos(Ma); (Fleischer et al. 1998), e b) calibrada para outras espécies de aves utilizando registro fóssil (2.0% /Ma; (Shields & Wilson 1987; Randi 1996). Essa correção resultou em uma taxa de substituição da RC estimada em $\mu=2,4284 \times 10^{-5}$ e $\mu=3,1849 \times 10^{-5}$ mudanças/nucleotídeo, respectivamente. Foi assumido o tempo de geração da espécie de um ano seguindo (Klicka & Zink 1999).

As divergências genéticas líquidas entre dois grupos de seqüências foram obtidas pela fórmula $\delta = \delta_{xy} - [0.5 (\delta x + \delta y)]$, onde δx e δy são as divergências médias dentro de cada grupo x e y e δ_{xy} é a divergência média entre todas as seqüências (Wilson et al. 1985).

Para testar se há evidência de expansão populacional, foi calculando o F_s de F_u (Fu 1997) usando o programa Dna SP ver. 4 (Rozas et al. 2003). Para isso, as linhagens principais encontradas na análise filogenética foram definidas como populações, seguindo Cheviron et al. (2005). Valores significativamente negativos de F_s indicam expansão demográfica nas linhagens. A significância foi determinada baseada em 1000 simulações de coalescência baseando-se em um modelo de estabilidade populacional usando tamanhos amostrais empíricos e estimativas de θ . Foi utilizado o programa Arlequin 3.01 para se estimar os parâmetros de crescimento exponencial populacional (θ_0 ; θ_1 ; τ). Seguindo Rogers & Harpending (1992), foi calculado o tempo de expansão utilizando os valores superior e inferior dentro do intervalo de 95% de confiança do parâmetro τ empregando a fórmula $t = \tau/2\mu$, onde μ é a taxa de mutação por geração por haplótipo.

3.3 Resultados

Um total de 472 sitios da região controladora mitocondrial (RC) de 77 indivíduos de *Conopophaga lineata* foi obtido. Não há evidências que essa seqüências não possuam origem mitocondrial. A composição de bases encontrada (A=29,16%, C=24,89%, G=8,06% e T=37,89%) é compatível com seqüências da região controladora de aves (Baker & Walker 1998). Amostras de sangue e músculo do mesmo indivíduo produziram seqüências idênticas. Foram detectados 43 haplótipos (Tabela ??), com 102 sítios polimorficos (66 transições e

24 transversões).

Os resultados da análise filogenética (Figura 3.2) revelaram 4 linhagens: um clado mais ao norte da área amostrada (sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais) e três clados com indivíduos amostrados mais ao sul (um do sudeste de Minas Gerais, Rio de Janeiro até nordeste de São Paulo [N], outro em São Paulo e Paraná [SI] e outro do Rio Grande do Sul até Misiones [SII]). O primeiro clado está correlacionado com a subespécie *C. l. lineata* e os outros três com *C. l. vulgaris*. A análise dos haplótipos de *C. l. vulgaris* resultou em três redes, as quais não poderiam se juntar dentro do limite de confiança de 95% sugerido por Templeton et al. (1992). Entretanto, eles poderiam ser conectados quando um mínimo de 24 passos mutacionais são permitidos (Figura 3.3). No entanto, essas conexões devem ser analisadas com precaução, apesar dos agrupamentos não apresentarem ambigüidades. As distâncias líquidas não corrigidas e os tempos de divergência estão mostrados na Tabela 3.2. A AMOVA revelou em termos globais ($F_{ST}=0,787$, $P<0,001$) e F_{ST} par a par significativos (significância baseado em 1023 permutações) (Tabela ??). De maneira similar, os testes exatos de diferenciação populacional indicaram uma diferença significativa ($P<0,001$) entre qualquer par de linhagem, Esses resultados indicam uma alta estruturação e, assim, as linhagens foram tratadas como populações.

O teste F de Fu sugeriu a existência de expansão demográfica nas populações mais ao sul (SI e SII), mas não na linhagem N (Tabela 3.3). As estimativas do início da expansão das linhagens ao sul de *C. l. vulgaris* baseadas em estimativa τ são mostradas na Tabela 3.3.

Figura 3.2: Consenso estrito das 663 árvores mais parcimoniosas (174 passos; CI= 0,781; RI= 0,947), reconstruída a partir de 472 pb da região controladora do DNA mitocondrial. Os números sublinhados representam os nós da Tabela 3.2. Valores de bootstrap nos nós.

Figura 3.3: Rede de haplotipos baseada em 472 pb da região controladora do DNA mitocondrial. Os agrupamentos desenhados para o NCA estão apresentados.

Tabela 3.2: Distância genética, desvio padrão e estimativa de tempo de divergência baseado em duas taxas. Os tempos mínimos e máximos estimados para cada nó (em parenteses) foram calculados baseados no desvio padrão.

Nó	Separação	Distância líquida	Data 5,2% (Ma)	Data 6,82% (Ma)
1	<i>C. l. lineata</i> - <i>C. l. vulgaris</i>	7,52 ± 1,215	1,44 (1,21 - 1,68)	1,01 (0,92 - 1,28)
2	N - (SI+SII)	5,50 ± 1,085	1,06 (0,85 - 1,27)	0,86 (0,65 - 0,97)
3	SI-SII	2,16 ± 0,640	0,42 (0,29 - 0,54)	0,32 (0,22 - 0,41)

Tabela 3.3: Parâmetros relacionados à demografia histórica (Fs de Fu) e tempo de expansão de dados de *C. l. vulgaris*.

Clado	n	Fs de Fu	P(Fs)	Tempo de expansão (anos)
SI	38	-6,932	0,006	75.087 - 183.639
SII	21	-3,991	0,021	42.857 - 126.276
N	15	-1,138	0,221	83.375 - 215.985

Tabela 3.4: Resultados da *Nested Clade Analysis* para os clados com associação geográfica significativa.

Clado	Associação geográfica	Conclusão
2-9	p = 0,006	Fluxo gênico restrito com isolamento pela distância
3-2	p = 0,001	Fluxo gênico restrito com isolamento pela distância
4-1	p = 0,000	Fluxo gênico restrito com isolamento pela distância
4-2	p = 0,000	Fragmentação alopátrida
Todos	p = 0,000	Fragmentação antiga seguida por expansão

A NCA rejeitou a hipótese de associação aleatória dos haplótipos com a distribuição geográfica ($P=0,000$), e vários subclados (2-9, 3-2, 4-1, 4-2, Figura 3.3 e Tabela 3.4) exibindo uma variação geograficamente estruturada. Apesar da incerteza de como estão conectadas as linhagens entre *C. l. lineata* e *C. l. vulgaris*, além de N com as outras linhagens mais ao sul, a NCA indicou que o ancestral de *C. l. vulgaris* foi inicialmente separado por uma fragmentação histórica que isolou as linhagens ao norte e sul do vale do rio Paraíba do Sul. Após esta fragmentação, ambas linhagens se expandiram. A NCA também indicou uma fragmentação alopátrida entre as linhagens SI e SII. Além disso, foi sugerido a presença de fluxo gênico restrito com isolamento pela distância para haplótipos dentro da linhagem SII. Finalmente, foi indicado também um fluxo gênico restrito para haplótipos dentro da linhagem SI.

3.4 Discussão

Os dados da região controladora de *C. lineata* indicaram uma estruturação genética significativa ao longo da área de distribuição no sudeste do Brasil. Isso é concordante com o padrão encontrado em outras aves Neotropicais (Aleixo 2004; Cheviron et al. 2005; Cabanne et al. 2007). Quatro linhagens mitocondriais foram reveladas no presente estudo, sendo uma associada à subespécie *C. l. lineata* e outras três associadas a *C. l. vulgaris*. Pelo menos duas grandes divergências foram observadas: uma separando as duas subespécies (*C. l. lineata* e *C. l. vulgaris*), e outra que levou à divergência entre linhagens sul e norte de *C. l. vulgaris*. Além dessas divergências antigas, o NCA também indicou três possíveis separações mais recentes dentro das linhagens ao sul do vale do rio Paraíba do Sul (VRPS): a) a fragmentação alopátrida entre as linhagens SI e SII, b) o baixo fluxo gênico entre as populações do interior de São Paulo e as florestas da Serra do Mar e Paraná e c) o isolamento pela distância das populações no extremo sul da Mata Atlântica.

A separação entre as duas subespécies de *C. lineata* foi estimada entre 0,9 e 1,7 milhões de anos (Ma) atrás. Durante esse período ocorria uma importante transição climática do Plioceno para o Pleistoceno mais frio. Mudanças climáticas globais nesse período Plio-Pleistoceno poderiam ter influenciado na evolução das aves em habitats locais. Uma região de contato entre as linhagens N de *C. l. vulgaris* e *C. l. lineata* possivelmente ocorre dentro do estado de Minas Gerais. Mas uma melhor amostragem nessa região seria necessária para investigar essa questão.

Dentre as divergências observadas nas linhagens de *C. l. vulgaris*, foi estimado o período entre 0,2 e 0,5 Ma atrás como a provável separação entre as linhagens SI e SII. Atualmente não existe nenhum acidente geográfico que

possa justificar tal isolamento. Uma hipótese para explicar a atual divergência entre essas linhagens, seria o modelo dos refúgios (Haffer 1969; Vanzolini & Williams 1970). De acordo com esse modelo, alterações climáticas globais resultaram na fragmentação das florestas, ocorrendo substituição dessas por diferentes tipos de vegetação aberta. Conseqüentemente, populações de organismos florestais, isolados nesses fragmentos poderiam se diferenciar, dado o tempo suficiente. A predição para essa hipótese é que clados envolvidos em contado secundário poderiam exibir evidências de expansão da distribuição (Moritz et al. 2000). Como foi detectado expansão em ambas as linhagens, é possível que essas tenham se isolado em paleorefúgios durante o Pleistoceno. O mesmo talvez possa ser sugerido para explicar a proposta da NCA de baixo fluxo gênico ou isolamento pela distância entre as populações do interior de São Paulo e a Serra do Mar. No entanto, como nesse caso a distribuição das populações se faz em tipos florestais distintos (estacional semidecídua no interior de São Paulo e ombrófila na Serra do Mar), também é possível imaginar a diversificação causada por gradiente ecológico como um fator importante na história evolutiva dessas populações (Endler 1977). Sendo assim, a seleção constante por diferentes tipos de hábitat poderia resultar em isolamento reprodutivo ao longo do tempo (Moritz et al. 2000; Smith et al. 2001). Entretanto, segundo Smith et al. (2001), populações que se divergiram devido à seleção continuam mantendo altos níveis de fluxo gênico. Portanto, os resultados encontrados para as populações da linhagem SI não seriam compatíveis com a proposta de diversificação causada por gradiente ecológico. Com isso, seria mais plausível que a causa da diversificação entre essas populações seja o isolamento em refúgios com posterior expansão populacional.

Outra importante divergência entre linhagens de *C. l. vulgaris* parece estar relacionada ao VRPS. Os resultados das análises indicaram uma região de contato entre as linhagens N e SI à sudoeste do vale. O VRPS é uma depressão localizada entre as duas maiores montanhas do sudeste brasileiro, a Serra da Mantiqueira e a Serra do Mar (Petri & Fúlfaro 1983). A separação associada ao VRPS foi encontrada em outros estudos (Silva & Straube 1996; Mustrangi & Patton 1997; Pellegrino et al. 2005; Cabanne et al. 2007). Três hipóteses principais foram propostas até o momento para explicar esse padrão de divergência no sudeste da Mata Atlântica: a) rios atuando como barreira; b) modelo dos refúgios e c) neotectonismo.

Os resultados da NCA sugeriram expansão após um evento de fragmentação histórica nas linhagens do norte para o sul do VRPS. A direção da expansão foi indicada pelo fato de a linhagem norte ser interior (antiga) na NCA. Entretanto, a estimativa de crescimento baseada em coalescência (F_s de F_u) não apoiou a expansão para a linhagem N. É possível que a causa desse resul-

tado seja a baixa amostragem da linhagem N (Ramos-Onsios & Rozas 2002).

Moritz et al. (2000) propuseram que para a hipótese dos rios ser aceita, agrupamentos irmãos devem ocorrer em lados opostos do rio e não ao longo da mesma margem. Além disso, essas linhagens não poderiam apresentar sinais de expansão demográfica. Como as linhagens mostraram sinais de expansão demográfica (Tabela 3.3) e não estão limitadas pelo rio Paraíba do Sul (Figura 3.1), conseqüentemente os dados obtidos com *C. lineata* não apóiam as predições da hipótese dos rios atuando como barreira. É interessante mencionar que Pellegrino et al. (2005) estudaram a estrutura genética populacional do lagarto *Gymnodactylus darwini* amostrando em uma região comparável com a de *C. lineata*. Esses autores descreveram três linhagens mitocondriais, sendo esse padrão filogeográfico gerado pela ação dos rios atuando como barreira ao fluxo gênico. Sendo assim, isso mostra que dois organismos podem apresentar diferentes respostas para os mesmos eventos. Ou seja, o rio Paraíba do Sul apesar de ser uma barreira ao fluxo gênico dos lagartos, parece não ser para *C. lineata*.

Uma hipótese alternativa para explicar separação das linhagens correspondendo ao VRPS é o modelo dos refúgios (Haffer 1969; Vanzolini & Williams 1970). De acordo com esse modelo, alterações climáticas globais resultaram na fragmentação das florestas, ocorrendo substituição dessas por diferentes tipos de vegetação aberta. Conseqüentemente, populações de organismos florestais, isolados nesses fragmentos poderiam se diferenciar, dado o tempo suficiente. A predição para essa hipótese é que clados envolvidos em contado secundário poderiam exibir evidências de expansão da distribuição (Moritz et al. 2000).

Cabanne et al. (2007) sugeriram que duas linhagens de *Xiphorhynchus fuscus* que estão em contato ao longo do VRPS poderiam ter se diferenciado devido a influência de mudanças climáticas. De acordo com esses autores, linhagens de *X. fuscus* possivelmente retraíram e então se expandiram a partir da Serra do Mar ou a partir de refúgios ao longo do rio Paraná, estando atualmente em contato secundário. Uma possível expansão nas linhagens de *C. l. vulgaris* foi indicada através de teste Fs de Fu e da NCA. O tempo de divergência estimado entre as linhagens N e S (I e II) é compatível com o Pleistoceno (0,65 - 1,27 Ma). O início da expansão demográfica foi estimada entre 43.000 e 216.000 anos atrás. Embora esse período não corresponda ao último máximo glacial (≈ 18.000), é possível que outro período de retração das florestas tenha isolado as populações de *C. l. vulgaris*. Com isso, não é possível rejeitar a hipótese que variações climáticas ocorridas no passado tenham influenciado na divergência encontrada atualmente em *C. l. vulgaris*.

Silva & Straube (1996) postularam que mudanças geológicas ocorridas no

VRPS teriam sido um evento vicariante para as espécies florestais. De acordo com esses autores, a floresta era contínua antes dessa mudança geológica ocorrer. Sendo assim, essas florestas teriam sido substituídas por outros tipos vegetais, quebrando o fluxo gênico dos organismos dependentes de florestas. Silva & Straube (1996) sugeriram que a idade do evento vicariante que levou à diferenciação dos clados norte e sul da ave *Lepdocolaptes squamatus* ocorreu entre 2,0 e 2,5 milhões de anos atrás (Plio-Pleistoceno). Esse período é compatível com eventos de sedimentação por ação neotectônica na região (Mohriak & Barros 1990; Saadi et al. 2005; Himura et al. 2001). Portanto, é possível que a formação do VRPS não tenha resultado na diferenciação dessas populações, mas eventos neotectônicos no Pleistoceno. Sendo assim, não é possível rejeitar a hipótese que os mesmos eventos neotectônicos que causaram o isolamento de *Lepdocolaptes squamatus* tenham também isolado as populações N e S de *C. l. vulgaris* durante o Pleistoceno.

Apesar de informativo, a NCA foi incapaz de indicar o papel das mudanças paleoclimáticas e do neotectonismo dentre os eventos históricos que influenciaram nas populações de *C. l. vulgaris*. Não é possível distinguir entre esses mecanismos vicariantes com os dados atuais. Entretanto, esses processos não são mutuamente exclusivos e os padrões encontrados no VRPS podem ser resultados da interação de diferentes fatores. Mais estudos são necessários para o entendimento dos processos evolutivos na Mata Atlântica. Uma análise comparativa entre outros passeriformes que se distribuem através do VRPS pode ser um modelo para esse estudo.

Referências Bibliográficas

- Aleixo, A. (2004). Historical diversification of a *terra-firme* forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58, 1303–1317.
- Awise, J. C. & D. Walker (1998). Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265, 457–463.
- Baker, A. J. & D. Walker (1998). Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265, 457–463.
- Bruford, M. W., O. Hanotte, J. F. Y. Brookfield, & T. Burke (1992). Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In C. A. R. Hoelzel (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*, pp. 225–269. New York: Oxford University Press.
- Cabanne, G. S., F. R. Santos, & C. Y. Miyaki (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91, 73–84.
- Cheviron, Z. A., S. J. Hackett, & A. P. Caparella (2005). Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypothesis of the origin of Neotropical diversity. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 36, 338–357.
- Clement, M., D. Posada, & K. A. Crandall (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657–1660.
- Cockerham, C. C. (1969). Variance of gene frequencies. *Evolution* 23, 72–84.
- Costa, L. P. (2003). The historical bridge between the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30, 71–86.
- Costa, L. P., Y. L. R. Leite, G. A. B. da Fonseca, & M. T. da Fonseca (2000). Biogeography of South American forest mammals: Endemism and diversity in the atlantic forest. *Biotropica* 32, 872–881.
- Endler, J. A. (1977). *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton: Princeton University Press.
- Excoffier, L., L. G., & S. Schneider (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47–50.

- Excoffier, L., P. Smouse, & J. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Fjeldsa, J. (1994). Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodiversity and Conservation* 3, 207–226.
- Fleischer, R. C., C. E. McIntosh, & C. L. Tarr (1998). Evolution on a volcanic conveyor belt: using phylogeographic reconstructions and K-Ar-based ages of the Hawaiian Islands to estimate molecular evolutionary rates. *Molecular Ecology* 7, 533–545.
- Fu, Y. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165, 131–137.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Himura, S. T., C. Riccomini, & M. C. Modenesi-Gauttieri (2001). Neotectônica no planalto de Campos do Jordão, SP. *Revista Brasileira de Geociências* 31, 375–384.
- Joly, C. A., H. F. Leitão-Filho, & S. M. Silva (1991). O patrimônio florístico / the floristic heritage. In I. G. Câmara (Ed.), *Plano de Ação para a Mata Atlântica*, pp. 95–125. São Paulo: Ed. Scritta Oficina.
- K., T. & M. Nei (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512–526.
- Klicka, J. & R. M. Zink (1999). Pleistocene effects on North American songbird evolution. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 266, 695–700.
- Kumar, S., K. Tamura, & M. Nei (2001). *MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University.
- Lacerda, D. R. (2004). *Filogeografia Comparada e Filogenia de Espécies de Thamnophilidae (Aves: Passeriformes) de Mata Atlântica de Minas Gerais*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- Lara, M. C. & J. L. Patton (2000). Evolutionary diversification of spiny rats (genus *Trinomys*, Rodentia: Echimyidae) in the Atlantic Forest of Brazil. *Zoological Journal of the Linnean Society* 130, 661–686.
- Mohriak, W. U. & A. Z. N. Barros (1990). Novas evidências de tectonismo cenozóico na região sudeste do Brasil: o gráben de Barra de São João na plataforma de Cabo Frio, RJ. *Revista Brasileira de Geociências* 20, 187–196.
- Moritz, C., J. L. Patton, C. J. Schneider, & T. Smith (2000). Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 533–563.
- Musttrangi, M. A. & J. L. Patton (1997). Phylogeography and systematics of the slender mouse opossum *Marmosops* (Marsupialia: Didelphidae). *University of California Publications, Zoology* 130, 1–86.
- Patton, J. L., P. Myers, & M. F. Smith (1990). Vicariant versus gradient models of diversification: the small mammal fauna of eastern Andean slopes of Peru. In G. Peters & R. Hutterer (Eds.), *Vertebrates in the Tropics*, pp. 355–371. Bonn: Museum Alexander Koenig.
- Patton, J. L. & M. F. Smith (1992). MtDNA phylogeny of Andean mice: a test of diversification across ecological gradients. *Evolution* 46, 174–183.
- Pellegrino, K. C. M., M. I. Rodrigues, A. N. Waite, M. Morando, Y. Y. Yassuda, & J. W. Sites (2005). Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85, 13–26.
- Petri, S. & V. J. Fúlfaro (1983). *Geologia do Brasil*. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Posada, D. (2000). How does recombination affect phylogeny estimation? *Trends in Ecology and Evolution* 15, 489–490.
- Ramos-Onsios, S. & J. Rozas (2002). Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2092–2100.
- Randi, E. (1996). A mitochondrial cytochrome b phylogeny of the *Alectoris* partridges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6, 214–227.
- Rogers, A. R. & H. Harpending (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552–569.

- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, & R. Rozas (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Saadi, A., F. H. R. Bezerra, R. D. da Costa, H. L. S. Igreja, & E. Franzinelli (2005). Neotectônica da plataforma brasileira. In C. R. G. Souza, K. Su-
guio, A. M. S. Oliveira, & P. E. de Oliveira (Eds.), *Quaternário do Brasil*,
pp. 221–234. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Saitou, N. & M. Nei (1987). The neighbor-joining method: a new method
for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4,
406–425.
- Shields, G. F. & A. C. Wilson (1987). Calibration of mitochondrial DNA evo-
lution in geese. *Journal of Molecular Evolution* 24, 212–217.
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira* (3 ed.). Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Silva, J. M. C. & F. C. Straube (1996). Systematics and biogeography of sca-
led woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Studies on Neotropical Fauna
and Environment* 31, 3–10.
- Smith, T. B., C. J. Schneider, & K. Holder (2001). Refugia isolation ver-
sus ecological gradients: testing alternative mechanisms of evolutionary
divergence in four rainforest vertebrates. *Genetica* 112-113, 383–398.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using with Parsimony (*
and other methods). Version 4.0b10* (19 ed.). Sunderland, Massachusetts:
Sinauer.
- Templeton, A. R. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data:
testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular
Ecology* 7.
- Templeton, A. R., E. Boerwinkle, & C. F. Sing (1987). A cladistic analysis of
phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonu-
clease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase
activity in *Drosophila*. *Genetics* 117, 343–351.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall, & C. F. Sing (1992). A cladistic analysis
of phenotypic association with haplotypes inferred from restriction en-
donuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation.
Genetics 132, 619–633.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, & D. Higgins
(1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple
sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Rese-
arch* 25, 4876–4882.

- Vanzolini, P. E. & E. E. Williams (1970). South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo* 19, 1–298.
- Wallace, A. R. (1852). On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London* 20, 107–110.
- Whitney, B. M. (2003). Family Conopophagidae. In J. del Hoyo, A. Elliot, & D. A. Christie (Eds.), *Handbook of the Birds of the World: Broadbills to Tapaculos*, Volume 8, pp. 732–747. Barcelona: Lynx Edicions.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, & S. M. Carr (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26, 375–400.

Filogeografia comparada entre *Conopophaga melanops* e *Conopophaga lineata*: padrões de estruturação genética na Mata Atlântica

4.1 Introdução

A Filogeografia é um campo de estudo com interesse nos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genéticas (Avice 2000). A interpretação e a análise destas distribuições geralmente dependem de estudos de filogenia, paleontologia, demografia histórica e genética populacional. Estudos de filogeografia estão sendo realizados na tentativa de se distinguir, entre as várias hipóteses biogeográficas, as que melhor explicam os processos de diversificação (Patton & Silva 1998; Silva & Patton 1998; Loughheed et al. 1999; Moritz et al. 2000; Costa 2003; Ribas & Miyaki 2004; Cabanne et al. 2007).

Um enfoque complementar é a comparação de padrões filogeográficos intra-específicos (Avice et al. 1987) entre diferentes espécies com distribuição concordante. Dessa maneira, busca-se identificar regiões nas quais toda a comunidade teria se submetido a períodos de evolução independente devido a eventos vicariantes (Bermingham & Avice 1986; Avice 1992; Moritz & Faith 1998). Esses padrões podem ser visualizados por meio de árvores de genes

desses organismos (Avice 1992).

Segundo Moritz & Faith (1998), alguns passos são necessários para realizar uma filogeografia comparada com esse propósito. Primeiramente definir a área a ser analisada, podendo ser usado para isso tanto informações genéticas quanto outros critérios (ex.: geomorfologia da região). Posteriormente, determinar se existe uma história de vicariância entre as áreas a serem comparadas. Isso pode ser indicado pelo padrão biogeográfico congruente entre espécies ou por congruência entre as divisões filogeográficas intra-específicas, além do conhecimento prévio de barreiras geográficas reconhecidas (Avice & Ball 1990).

A Mata Atlântica destaca-se pelo número de espécies e endemismos que abriga. Nesse cenário, é possível imaginar séries de padrões filogeográficos concordantes. Além disso, a Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados do mundo, existindo atualmente apenas 7,4% da sua superfície original (Myers et al. 2000). Apesar da urgência de ações voltadas à sua conservação, praticamente inexistem estudos dedicados à compreensão dos seus processos evolutivos e padrões biogeográficos. Este conhecimento seria muito importante para ajudar a definir áreas prioritárias à sua conservação. Para entender como sua diversidade está organizada seria necessário avaliar os processos temporais e espaciais que formaram sua distribuição atual (Costa et al. 2000).

Atualmente, pelo menos duas espécies pertencentes à família Conopophagidae estão distribuídas na Mata Atlântica (Sick 1997). A espécie *Conopophaga melanops* é endêmica desse bioma, sendo mais comum em matas de baixadas (Sick 1997; Ridgely & Tudor 1994). Em comparação com a outra espécie, é relativamente mais rara e ocorre em ambientes mais preservados. Já *C. lineata* é relativamente comum em matas secundárias, ambientes em regeneração e bordas de floresta (Ridgely & Tudor 1994).

Nesse contexto, análises de seqüências de DNA mitocondrial de *C. melanops* foram comparadas às de *C. lineata* com o objetivo de verificar a existência de um padrão histórico biogeográfico. Baseado nesses padrões, modelos de vicariância foram avaliados como possíveis responsáveis pela diversificação na Mata Atlântica.

4.2 *Material e Métodos*

4.2.1 *Área de estudo e amostragem*

Para se comparar as filogeografias das espécies de *Conopophaga* distribuídas na Mata Atlântica, foram utilizados as mesmas amostras de *C. lineata*

do Cap. 3. Além dessas, 32 amostras de *C. melanops* foram coletadas em fragmentos de Mata Atlântica nos estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (Figura 4.1, Tabela 4.1). Os espécimes coletados nos estados da Bahia e São Paulo foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Os tecidos desses exemplares coletados especificamente para esse estudo foram depositados no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo). As amostras coletadas nos estados de Pernambuco e Alagoas foram gentilmente cedidas pelo Field Museum of Natural History (FMNH) em Chicago, EUA e estão depositadas nesse museu (Tabela 4.1). A sequência de *C. melanops* de Minas Gerais foi enviada pela Mestre Eloísa Sari do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais).

4.2.2 Análises moleculares

Da mesma maneira que em *C. lineata* (Cap. 3), foi extraído DNA de amostras de sangue e de músculo de *C. melanops* pelo método convencional de fenol-clorofórmio (Bruford et al. 1992). Um fragmento de aproximadamente 1200 pb da região controladora (RC) foi amplificado utilizando-se o par de oligonucleotídeo iniciador (“primer”) L1 (5’ TCCACACTCGACATCTCATT 3’; E. Sari, com. pessoal) e H16137 (5’ AAAATRYCAGCTTTGGGAGTTG 3’; Lacerda 2004). As reações de amplificação (PCR) ocorreram em termociclador (Mastercycler - Eppendorf) em tubos de 200 μ l contendo: 1 μ l de tampão 10x concentrado (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl, Pharmacia), 1 μ l de dNTPs (2 mM), 1 μ l de cada “primer” (10 μ M), 4,9 μ l de água milli-Q, 1 μ l de DNA (1-20 ng) e 0,1 μ l de *Taq* polimerase (5 U/ μ l). As reações foram executadas com um passo inicial de 94 °C por 2min e 35 ciclos de 30s a 94 °C, 40s a 57 °C e 90s a 72 °C, seguido por uma extensão final de 10min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com Fosfatase alcalina de camarão e Exonuclease I. Para as reações de sequenciamento foram usados os “primers” de amplificação e “primers” internos LEC2 (5’ TGTACCTGTTGTGGTCGGCGTA 3’; Sari com. pessoal) e H4 (5’ TTGACGAGGTAAAAATATGTCT 3’; Lacerda 2004). Essas reações foram executadas com o “kit Big Dye Terminator” ver3.0 (Applied Biosystems Inc) e precipitados com isopropanol 75% e etanol 70%. As corridas foram realizadas nos sequenciadores ABI Prism 377 ou ABI Prism 3700 (Applied Biosystems).

Um segmento de 439 pb (*C. melanops*) e 467 pb (*C. lineata*) do domínio III da região controladora foi usado nas análises filogeográficas por ser a porção mais variável para esse grupo (ver Cap. 3). As sequências de cada espécie foram alinhadas manualmente com o auxílio do programa Clustal X (Thomp-

Figura 4.1: Área de estudo e localidades amostradas de *Conopophaga melanops*. Números correspondentes à Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Indivíduos de *C. melanops* utilizados, número na coleção e localidades de coleta.

Amostra	Nº na Coleção	Instituição ¹	Localidade ²
Tim1	392378	FMNH	1 - Timbauba, PE
Tim2	392379	FMNH	Timbauba, PE
MEs1	399263	FMNH	2 - Mata do Estado, PE
MEs2	399264	FMNH	Mata do Estado, PE
MEs3	399265	FMNH	Mata do Estado, PE
MEs4	399266	FMNH	Mata do Estado, PE
MEs5	399267	FMNH	Mata do Estado, PE
MEs6	399268	FMNH	Mata do Estado, PE
SEs1	392454	FMNH	3 - Serra do Espelho, PE
Iba1	399269	FMNH	4 - Eng. Coimbra, Usina Serra Grande, AL
Iba2	399270	FMNH	Eng. Coimbra, Usina Serra Grande, AL
Iba3	399271	FMNH	Eng. Coimbra, Usina Serra Grande, AL
Iba4	399272	FMNH	Eng. Coimbra, Usina Serra Grande, AL
Iba5	399274	FMNH	Eng. Coimbra, Usina Serra Grande, AL
Iba6	399275	FMNH	Eng. Coimbra, Usina Serra Grande, AL
Iba7	399278	FMNH	Eng. Coimbra, Usina Serra Grande, AL
Pil1	P1705	USP	4 - Faz. Horizonte, Pilar, AL
Pil2	P1706	USP	5 - Faz. Varrela, São Miguel dos Campos, AL
Pil3	P1707	USP	Faz. Horizonte, Pilar, AL
BA	P1130	USP	6 - Vitória da Conquista, BA
Ita1	P1355	USP	7 - P.N. Itatiaia, RJ
Ita2	P1358	USP	P.N. Itatiaia, RJ
BaR1	P1650	USP	8 - Faz. Barreiro Rico, SP
BaR2	P1698	USP	Faz. Barreiro Rico, SP
Pic1	P1314	USP	9 - Picinguaba, SP
Pic2	P1316	USP	Picinguaba, SP
Ber1	10318	USP	10 - Praias de Boracéia, Bertioga, SP
Ber2	10325	USP	Praias de Boracéia, Bertioga, SP
Pet1	P1194	USP	11 - PETAR, Núcleo Caboclos, SP
Pet2	P1196	USP	PETAR, Núcleo Caboclos, SP

¹FMNH: Field Museum of Natural History; USP: Universidade de São Paulo.

²Números que representam a localidade no mapa da Figura 4.1.

son et al. 1997) e Bioedit 7.0.5.2 (Hall 1999). Foi então realizado o teste de razão de verossimilhança no programa Modeltest 6.03 (Posada & Crandall 1998) para selecionar o modelo de evolução molecular mais simples com verossimilhança mais alta para os dados obtidos para cada espécie separadamente. As relações filogenéticas foram reconstruídas pelos métodos de máxima verossimilhança (MV) e de máxima parcimônia (MP) utilizando o software PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). Foi usado o parâmetro de busca heurística por “stepwise-addition”, com árvores iniciais obtidas por 10 adições aleatórias de táxons. O suporte dos ramos foi avaliado por “bootstrap” não paramétrico (Felsenstein 1985), com 100 réplicas para ambos os métodos. Nas reconstruções filogenéticas de cada espécie, foi utilizado como grupo externo um exemplar

da outra espécie a ser comparada, devido à sua proximidade filogenética. A distribuição geográfica das linhagens obtidas em *C. lineata* (Cap. 3) foi considerada para definir os grupos de *C. melanops*. Esses grupos foram utilizados na análise de variância molecular [AMOVA; Cockerham 1969; Excoffier et al. 1992], testes estatísticos de diversidade genética (diversidade nucleotídica [π], número de diferenças par a par [k], número de sítios polimórficos [s] e composição de bases). Essas análises foram conduzidas usando os programas Arlequin 3.01 (Excoffier et al. 2005) e DnaSP 4.0 (Rozas et al. 2003).

Foi também construída uma rede de haplótipos pelo método “*median-joining*” (MJ) (Bandelt et al. 1999) com o auxílio do programa *Network 4.0* para cada espécie. As redes (“*networks*”) produzidas pelo método *median-joining* permitem visualizar as relações entre os haplótipos dos diferentes locais de coleta através de diagramas multidimensionais. Com isto, tentou-se descrever os padrões de correlação geográfica entre estes locais, apesar de não ter sido feito nenhum teste estatístico de suporte das relações. Foi verificada a concordância ou não entre os agrupamentos formados pelas maiores divergências encontradas em *C. melanops* e *C. lineata* (Cap.3). O tempo de divergência entre os agrupamentos foi estimado usando a distância líquida entre grupos e uma taxa de substituição estimada para a região controladora seguindo Avise & Walker (1998) [ver Cap. 3]. As taxas de substituição da região controladora calculadas para *C. melanops* (439 pb) foram $\mu=2,282 \times 10^{-5}$ (5,2%) e $\mu=2,994 \times 10^{-5}$ (6,82%) mudanças/nucleotídeo. Da mesma maneira, foi também assumido o tempo de geração da espécie de um ano seguindo (Klicka & Zink 1999).

As divergências genéticas líquidas entre dois grupos de seqüências foram obtidas pela fórmula $\delta = \delta_{xy} - [0.5 (\delta x + \delta y)]$, onde δx e δy são as divergências médias dentro de cada grupo x e y e δ_{xy} é a divergência média entre todas as seqüências (Wilson et al. 1985).

4.3 Resultados

As análises de cada espécie realizadas separadamente apresentaram os seguintes resultados. A composição de bases encontrada em ambas as espécies (*C. melanops*: A: 30,03%, C: 22,55%, G: 7,01% e T: 40,41%; *C. lineata*: A: 29,16%, C: 24,89%, G: 8,06% e T: 37,89%) é compatível com aquelas encontradas na região controladora de outras aves (Baker & Walker 1998). Além disso, amostras de sangue e músculo do mesmo indivíduo produziram seqüências idênticas. Sendo assim, não há evidências que essas seqüências não possuam origem mitocondrial.

Um total de 439 pb foi analisado em 32 indivíduos de *C. melanops* apresen-

tando 43 sítios polimórficos (26 transições e 17 transversões) e resultando em 20 haplótipos. Para *C. lineata*, foram detectados 43 haplótipos, com 102 sítios polimórficos (66 transições e 24 transversões) em 472 pb de 77 indivíduos (Tabela 4.2). A diversidade de haplótipos (h) foi igualmente alta para ambas as espécies, sendo $92,5\% \pm 2,9$ em *C. melanops* e $97,6\% \pm 0,6$ em *C. lineata* (Tabela 4.2). O número médio de diferenças entre haplótipos (k) observado em *C. melanops* foi menor que o encontrado em *C. lineata* (9,14 e 15,42, respectivamente). Da mesma forma, a diversidade nucleotídica (π) em *C. melanops* também foi ligeiramente menor que o encontrado em *C. lineata* ($0,022 \pm 0,002$ e $0,035 \pm 0,003$, respectivamente) (Tabela 4.2).

As reconstruções filogenéticas realizadas em *C. melanops* e *C. lineata* parecem ter recuperado linhagens de distribuição semelhante no sudeste da Mata Atlântica (Figura 4.2 e 3.2 do Cap. 3). Foi possível distinguir dois grupos bem suportados pela análise de *bootstrap* em *C. melanops* (Figura 4.2). Um clado com distribuição nos estados de Pernambuco (PE) mais Alagoas (AL) [Ni] e outro formado por indivíduos coletados nos demais estados [Me]. Esses agrupamentos correspondem à distribuição das subespécies *C. m. nigrifrons* e *C. m. melanops*, respectivamente. A análise de MV em *C. melanops* ainda conseguiu recuperar, com baixo suporte, dois outros agrupamentos em Ni. No entanto, no clado sul de *C. melanops* não foi possível observar as relações entre os grupos [MeN1, MeN2 e MeS], definidos a partir das linhagens com distribuição semelhante em *C. lineata* (Figura 4.2). Mesmo sem encontrar a mesma resolução nas inferências filogenéticas, foram testados os agrupamentos dos indivíduos de *C. melanops* nas análises populacionais seguindo o que foi encontrado para *C. lineata* a fim de permitir sua comparação.

Conforme apresentado no Cap. 3, a análise filogenética de *C. lineata* apresentou 4 linhagens (L, N, SI e SII). Dessa maneira, é possível observar que o clado L, correspondendo à subespécie *C. l. lineata* (Figuras 3.2 e 3.3; Cap. 3), possui distribuição mais ao norte (sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais) e pode corresponder à linhagem MeN1 de *C. melanops*. Já a linhagem N em *C. lineata*, distribuída desde o sudeste de Minas Gerais, Rio de Janeiro até nordeste de São Paulo pode corresponder ao clado MeN2 em *C. melanops*. Enquanto que as linhagens SI e SII de *C. lineata*, distribuídas desde São Paulo até Rio Grande do Sul e Misiones na Argentina podem corresponder ao agrupamento dos exemplares de MeS de *C. melanops*.

Tabela 4.2: Características e variabilidade observadas para a região controle das espécies *C. lineata* e *C. melanops*.

espécie	No. de haplótipos	No. de localidades	Tamanho da seqüência	No. de sítios polimórficos ts	h	k	π
<i>C. lineata</i>	43	21	472	66	0,98 ± 0,006	15,42	0,04 ± 0,003
<i>C. melanops</i>	20	11	439	26	0,93 ± 0,029	9,14	0,02 ± 0,002

Figura 4.2: Análise de MP baseada em 439 pb (*C. melanops*) da região controladora do DNA mitocondrial. Valores de bootstrap nos nós (MP / MV).

As redes de haplótipos geradas pelo método *median-joining* também indicam uma tendência de correspondência entre as linhagens encontradas em *C. lineata* e *C. melanops* (Figura 4.3). As distâncias líquidas não corrigidas entre esses agrupamentos e os tempos de divergência para cada espécie estão mostrados na Tabela 4.4. O AMOVA revelou em termos globais [*C. melanops* ($F_{ST}=0,877$ $p=0,000$) e *C. lineata* ($F_{ST}=0,787$, $P=0,000$)] e F_{ST} par a par entre linhagens de cada espécie valores significativos (significância baseado em 1023 permutações). Esses resultados indicam uma alta estruturação entre as linhagens de ambas as espécies.

(a) *C. melanops*

(b) *C. lineata*

Figura 4.3: Redes de haplótipos (MJ) construídas com 439 pb (*C. melanops*, n=31) e 472 pb (*C. lineata*, n=77) da região controladora do DNA mitocondrial. As áreas dos círculos representam a frequência dos haplótipos, as cores representam as diferentes linhagens baseada nas árvores filogenéticas e o tamanho das linhas é proporcional ao número de mutações. Os pontos pretos estão representando os haplótipos hipotéticos.

O teste F de Fu sugeriu a existência de expansão demográfica em algumas populações de ambas espécies (Tabela 4.3). As estimativas do início da expansão das linhagens ao sul de *C. l. vulgaris* baseadas em estimativa τ também são mostradas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Parâmetros relacionados a demografia histórica (Fs de Fu) e tempo de expansão de dados de *C. l. vulgaris* e *C. melanops*.

Espécie	Clado	n	Fs de Fu	P(Fs)	Tempo de expansão (anos)
<i>C. lineata</i>	SI	38	-6,932	0,006	75.087 - 183.639
	SII	21	-3,991	0,021	42.857 - 126.276
	N	15	-1,138	0,221	83.375 - 215.985
<i>C. melanops</i>	Ni	19	-4,363	0,007	16.589 - 60.088
	MeS	8	-4,303	0,002	13.612 - 86.557

Tabela 4.4: Distância genética, desvio padrão e estimativa de tempo de divergência baseado em duas taxas. Os tempos mínimos e máximos estimados para cada nó (em parenteses) foram calculados baseados no desvio padrão

Espécie	No	Separação	Distância líquida	Data 5,2% (Ma)	Data 6,82% (Ma)
<i>C. lineata</i>	1	<i>C. l. lineata</i> - <i>C. l. vulgaris</i>	7,5 ± 1,21	1,44 (1,21 - 1,68)	1,01 (0,92 - 1,28)
	2	N - (SI+SII)	5,5 ± 1,1	1,1 (0,85 - 1,27)	0,86 (0,65 - 0,97)
	3	SI-SII	2,2 ± 0,6	0,42 (0,29 - 0,54)	0,32 (0,22 - 0,41)
<i>C. melanops</i>	1	<i>C. melanops</i> - <i>C. nigrifrons</i>	2,7 ± 0,7	0,52 (0,39 - 0,65)	0,39 (0,29 - 0,49)
	2	MeN1 - (MeN2 + MeS)	1,8 ± 0,7	0,35 (0,21 - 0,48)	0,26 (0,16 - 0,36)
	3	MeN2 - MeS	0,7 ± 0,4	0,13 (0,05 - 0,20)	0,10 (0,04 - 0,16)

4.4 Discussão

O estudo comparativo entre regiões homólogas do DNA mitocondrial de *Conopophaga melanops* e *C. lineata* mostrou que mesmo espécies simpátricas e filogeneticamente próximas (mas não irmãs) podem apresentar diferenças no padrão de diversidade genética. Esse resultado era esperado, dado as particularidades ecológicas e históricas das duas espécies. Entretanto, apesar da diferença encontrada entre as duas espécies, esses valores são compatíveis com outros estudos com aves neotropicais (Aleixo 2002; Ribas et al. 2005; Cabanne et al. 2007).

O presente estudo parece indicar que as populações de *C. melanops* estão mais estruturadas do que as populações de *C. lineata* ($F_{ST}=0,877$, $P=0,000$ e $F_{ST}=0,787$, $P=0,000$, respectivamente). *C. melanops* também apresentou valores de diversidade nucleotídica ligeiramente menores que *C. lineata* ($\pi=0,021 \pm 0,0021$ e $\pi=0,035 \pm 0,0027$, respectivamente). Já os valores de diversidade de haplótipos foram muito semelhantes entre as duas espécies ($h=0,928 \pm 0,0021$ e $h=0,976 \pm 0,0021$, respectivamente). A partir desses dados, é possível inferir que *C. melanops* também possui o número efetivo de fêmeas (N_e) 1,67 vezes menor que o encontrado para *C. lineata*. *C. melanops* é comum em florestas mais conservadas ou em um estágio mais avançado de regeneração (Whitney 2003). Já *C. lineata* é uma espécie mais abundante em matas secundárias, principalmente em ambientes nos primeiros estágios de regeneração e/ou bordas de floresta (Ridgely & Tudor 1994; Whitney 2003). Diamond (1974) descreveu espécies com essa maior capacidade de se dispersar para novos habitats como espécies “supertramp”. São esperados valores menores de estruturação genética e maiores de diversidade nucleotídica para essas espécies. Nesse caso, os resultados de estruturação e diversidade nucleotídica apresentados no presente estudo estão de acordo com o esperado, considerando *C. lineata* com características ecológicas típicas de espécies “supertramp”. Já a análise comparativa de valores de diversidade de haplótipos não é a mais aconselhada quando se trabalha com DNAm, pois esse índice é fortemente influenciado pelo tamanho amostral (Nei & Li 1979). Desde modo, como a amostragem de *C. melanops* foi menos representativa do que em *C. lineata*, a diferença entre os valores de diversidade de haplótipos é pouco informativa (Nei & Li 1979).

Os cladogramas gerados para *C. melanops* revelaram dois filogrupos principais distintos correspondentes às subespécies *C. m. melanops* e *C. m. nigrifrons* (Figura 4.2). Pessoa (2001) analisando dados de morfometria e variação de coloração de plumagem em espécimes taxidermizados de coleções de museus encontrou o mesmo padrão de separação. Foi sugerido pelo autor que

o complexo de três subespécies em *C. melanops* é na verdade composto por duas espécies válidas (*C. melanops* e *C. nigrifrons*). Nesse trabalho é sugerido que o evento vicariante responsável pela especiação seria a formação do curso atual do rio São Francisco (Pessoa 2001). Além disso, segundo Pessoa (2001), somente os dados morfológicos não forneceram informações suficientes para apoiar a teoria dos refúgios (Haffer 1969). Isso porque segundo o autor, se o isolamento em um refúgio florestal levou à especiação de *C. nigrifrons*, o mesmo seria esperado nos refúgios florestais ao sul do rio São Francisco para *C. melanops*. No entanto, conclusões baseadas somente na uniformidade morfológica podem encobrir a estruturação genética (Omeland et al. 2000). Dessa maneira, apesar da baixa variação morfológica encontrada entre os exemplares coletados ao sul do rio São Francisco e analisados por Pessoa (2001), o presente estudo demonstrou que essas populações estão estruturadas geneticamente. Lunardi (2004) analisando amostras de três populações em um contínuo de 250 Km de Mata Atlântica utilizando RAPD-PCR, mostrou a existência de estruturação entre essas populações. Dentre as possíveis explicações da divergência genética encontrada neste trabalho, foi sugerido o isolamento em refúgios florestais durante o Pleistoceno (Lunardi 2004). Uma das predições da hipótese dos refúgios (Haffer 1969) é a observação de expansão populacional (Moritz et al. 2000). Como foi observado sinal de expansão nas linhagens Ni e MeS, não é possível rejeitar a hipótese que essas linhagens tenham se isolado no passado em refúgios nos centros de endemismo Pernambuco e Serra do Mar, expandindo-se posteriormente. Da mesma maneira, também não foram detectados haplótipos compartilhados em ambas as margens do rio São Francisco. Os dois principais grupos do complexo *C. melanops* são irmãos e estão separados pelo rio São Francisco. Além disso, possuem somente haplótipos exclusivos. Segundo Moritz et al. (2000), uma predição para a hipótese de rios atuando como barreira é que agrupamentos irmãos ocorram em lados opostos do rio. Dessa maneira, também não é possível rejeitar a hipótese que o rio São Francisco tenha isolado as linhagens de *C. melanops*. Sendo assim, é possível que os dois eventos tenham influenciado na distribuição das linhagens genéticas de *C. melanops*. Dessa maneira, talvez mesmo após as expansões das florestas durante os ciclos glaciais, os ancestrais da linhagem Ni e MeS tenham expandido suas distribuições até o limite do rio São Francisco. Nesse caso, o rio São Francisco passaria a atuar como barreira secundária ao contato das linhagens previamente isoladas em refúgios de floresta.

Os resultados apresentados sobre a linhagem Ni de *C. melanops* sugerem que o limite sul do centro de endemismo Pernambuco não ultrapasse o rio São Francisco. Essa proposta coincide com o sugerido por Silva et al. (2004) em seu trabalho realizado com aves endêmicas da Mata Atlântica. Entretanto

é contraditório com o proposto por Muller (1973) em seu trabalho sobre Biogeografia Dispersionista de vários vertebrados terrestres na região Neotropical. Apesar disso, parece ser mais plausível indicar o limite do centro de endemismo Pernambuco como sendo o rio São Francisco, pois assim contemplaria as duas hipóteses biogeográficas que podem ter influenciado na distribuição das espécies naquela região: i) hipótese dos rios como barreira e ii) hipótese dos refúgios.

A investigação de existência de um padrão no processo de diversificação entre os táxons de *C. lineata* e *C. melanops* que se distribuem no nordeste do Brasil também seria aqui analisada. Entretanto, a filogenia dos Conopophagidae indicou que *C. l. cearae* não compartilha um ancestral comum recente com *C. l. lineata* e *C. l. vulgaris* (ver Cap. 2). Sendo assim, uma melhor amostragem de *C. lineata* na região do centro de endemismo Pernambuco seria importante para entender os processos que ocorreram nessa região. Uma análise detalhada de exemplares coletados nos enclaves de florestas nas regiões de área aberta e mata seca poderia se constituir um modelo para tal projeto.

A região do Vale do Paraíba tem sido evidenciada como uma região de transição entre táxons de vários organismos (Silva & Straube 1996; Mustrangi & Patton 1997; Pellegrino et al. 2005; Cabanne et al. 2007). Segundo Petri & Fúlfaro (1983), essa região é uma depressão localizada entre as duas maiores montanhas do sudeste brasileiro, a Serra da Mantiqueira e a Serra do Mar. Várias hipóteses vêm sendo discutidas na tentativa de se entender os processos ocorridos na região, podendo ser sintetizadas em: a) rios atuando como barreira; b) modelo dos refúgios e c) neotectonismo (ver Cap. 3). Os resultados das análises de demografia histórica de *C. lineata* sugeriram que um evento vicariante teria separado as populações no sentido norte e sul do vale. A existência de uma linhagem com limites geográficos similares em *C. melanops* poderia sugerir esses padrões vicariantes (Cracraft 1988; Ronquist & Nylin 1990). Sendo assim, foram comparados os cladogramas e redes de haplótipos na tentativa de identificar esses padrões. Em *C. lineata* as divisões entre as linhagens possuem uma clara correlação geográfica, enquanto que em *C. melanops* essa relação não foi tão evidente. Apesar disso, os dados parecem indicar a existência de um padrão na separação entre linhagens de *C. lineata* e *C. melanops*, reforçando a hipótese de vicariância. Entretanto, uma maior amostragem em *C. melanops* seria necessária para entender melhor esse processo. Como não houve amostragem suficiente para se testar a importância do gradiente ecológico (mata estacional vs mata ombrófila) não se deve descartar essa hipótese. Estudos futuros nesses diferentes tipos de floresta na região sudeste podem ajudar no entendimento dos padrões de diversificação

da Mata Atlântica.

Referências Bibliográficas

- Aleixo, A. (2002). Molecular systematics and the role of várzea -terra-firme ecotone in the diversification of *Xiphorhynchus* woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Auk* 119, 621–640.
- Avise, J. C. (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63, 62–76.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, & N. C. Saunders (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489–522.
- Avise, J. C. & R. M. Ball (1990). Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys of Evolutionary Biology* 7, 45–68.
- Baker, A. J. & D. Walker (1998). Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265, 457–463.
- Bandelt, H.-J., P. Forster, & A. Rohl (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37–48.
- Bermingham, E. & J. C. Avise (1986). Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics* 113, 939–965.
- Bruford, M. W., O. Hanotte, J. F. Y. Brookfield, & T. Burke (1992). Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In C. A. R. Hoelzel (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*, pp. 225–269. New York: Oxford University Press.
- Cabanne, G. S., F. R. Santos, & C. Y. Miyaki (2007). Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91, 73–84.
- Cockerham, C. C. (1969). Variance of gene frequencies. *Evolution* 23, 72–84.
- Costa, L. P. (2003). The historical bridge between the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30, 71–86.

- Costa, L. P., Y. L. R. Leite, G. A. B. da Fonseca, & M. T. da Fonseca (2000). Biogeography of South American forest mammals: Endemism and diversity in the atlantic forest. *Biotropica* 32, 872–881.
- Cracraft, J. (1988). Deep-history biogeography: retrieving the historical pattern of evolving continental biotas. *Systematic Zoology* 37, 221–236.
- Diamond, J. M. (1974). Colonization of exploded volcanic islands by birds: the supertramp strategy. *Science* 184, 803–806.
- Excoffier, L., L. G., & S. Schneider (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47–50.
- Excoffier, L., P. Smouse, & J. Quattro (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165, 131–137.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Klicka, J. & R. M. Zink (1999). Pleistocene effects on North American songbird evolution. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 266, 695–700.
- Lacerda, D. R. (2004). *Filogeografia Comparada e Filogenia de Espécies de Thamnophilidae (Aves: Passeriformes) de Mata Atlântica de Minas Gerais*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Lougheed, S. C., C. Gascon, D. A. Jones, J. P. Bogart, & P. T. Boag (1999). Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266, 1829–1835.
- Lunardi, V. O. (2004). Análise genética molecular (RAPD) de *Conopophaga melanops*, Vieillot 1818 (Aves, Conopophagidae), em escala fina da Mata Atlântica e sua implicação para a conservação da espécie. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos.
- Moritz, C. & D. P. Faith (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7, 419–429.

- Moritz, C., J. L. Patton, C. J. Schneider, & T. Smith (2000). Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 533–563.
- Muller, P. (1973). *The Dispersal Centres of Terrestrial Vertebrates in the Neotropical Realm. A Study in the Evolution of the Neotropical Biota and Its Native Landscapes*. The Hague: Junk.
- Mustrangi, M. A. & J. L. Patton (1997). Phylogeography and systematics of the slender mouse opossum *Marmosops* (Marsupialia: Didelphidae). *University of California Publications, Zoology* 130, 1–86.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. Fonseca, & J. Kent (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
- Nei, M. & W.-H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 5269–5273.
- Omland, K., J. Marzluff, W. Boarman, C. Tarr, & R. Fleischer (2000). Cryptic genetic variation and paraphyly in ravens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267, 2475–2482.
- Patton, J. & M. N. F. Silva (1998). Rivers, refuges, and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. In D. Howard & S. Berlocher (Eds.), *Endless Forms: Modes and Mechanisms of Speciation*, pp. 202–213. New York: Oxford University Press.
- Pellegrino, K. C. M., M. I. Rodrigues, A. N. Waite, M. Morando, Y. Y. Yassuda, & J. W. Sites (2005). Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 85, 13–26.
- Pessoa, R. O. (2001). Variação Geográfica em *Conopophaga melanops* (Aves: Conopophagidae), uma espécie endêmica da Mata Atlântica. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba.
- Posada, D. & K. A. Crandall (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Ribas, C. C., R. Gaban-Lima, C. Y. Miyaki, & J. Cracraft (2005). Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography* 32, 1409–1427.
- Ribas, C. C. & C. Y. Miyaki (2004). Molecular systematics in *Aratinga*: species limits and historical biogeography in the 'solstitialis' group, and the

- systematic position of *Nandayus nenday*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 663–675.
- Ridgely, R. S. & G. Tudor (1994). *The Birds of South America: The Suboscine Passerines*. London: Oxford University Press.
- Ronquist, F. & S. Nylin (1990). Process and pattern in the evolution of species associations. *Systematic Biology* 39, 323–344.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, & R. Rozas (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira* (3 ed.). Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Silva, J. M. C. & F. C. Straube (1996). Systematics and biogeography of scaled woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 31, 3–10.
- Silva, M. N. & J. L. Patton (1998). Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 7, 475–486.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using with Parsimony (* and other methods). Version 4.0b10* (19 ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, & D. Higgins (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- Whitney, B. M. (2003). Family Conopophagidae. In J. del Hoyo, A. Elliot, & D. A. Christie (Eds.), *Handbook of the Birds of the World: Broadbills to Tapaculos*, Volume 8, pp. 732–747. Barcelona: Lynx Edicions.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, & S. M. Carr (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26, 375–400.

Considerações Finais

O presente trabalho buscou inicialmente entender as relações filogenéticas entre as espécies da família Conopophagidae e associa-las às relações históricas entre as áreas de endemismo da América do Sul. As análises filogenéticas resultaram:

- A família Conopophagidae como um grupo monofilético nas topologias a partir de 878 pb e 2270 pb. Desde modo, a presente Tese não apóia a hipótese de parafiletismo para o gênero *Conopophaga*. *C. melanogaster* seria a divergência mais antiga dentro do grupo, seguida pelo isolamento de *C. melanops* na Mata Atlântica;
- Os clados formados por indivíduos da mesma unidade taxonômica foram recuperados com alto suporte. Com exceção da espécie *C. lineata*, todas as espécies formaram grupos monofiléticos. *C. l. cearae* não se agrupa com os demais indivíduos de *C. lineata*, sendo sugerido o reconhecimento desse táxon como uma espécie válida (*C. cearae*);
- Após a especiação de *C. melanops*, aparentemente ocorreu uma rápida radiação no gênero *Conopophaga*, sendo observados dois grandes grupos com possíveis diversificações leste vs oeste da Floresta Amazônica (*C. roberti* e *C. aurita pallida/snethlageae* - leste) e (*C. ardesiaca* mais *C. castaneiceps* e *C. aurita australis* - oeste);
- Um clado formado somente por indivíduos com a mandíbula branca, sendo *C. l. cearae*, distribuído ao norte da Mata Atlântica, basal dentro desse grupo;

- O agrupamento de *C. lineata* e *C. roberti*, sendo esse podendo ser explicado por duas hipóteses:
 1. os blocos florestais (Floresta Amazônica e Mata Atlântica) já estariam isolados desde a especiação de *C. melanops* e um evento de dispersão de um ancestral amazônico para a Mata Atlântica seria uma possível explicação para a origem de *C. lineata*. Essa seria a hipótese com associação mais parcimoniosa nas análises biogeográficas;
 2. um segundo evento vicariante, após o que isolou *C. melanops*, teria isolado o ancestral de *C. lineata* na Mata Atlântica e de *C. roberti* no nordeste da Amazônia.
- Ainda dentro do grupo formado por indivíduos com mandíbula branca, a possível especiação por vicariância entre *C. castaneiceps* e *C. ardesiaca*, isolados à oeste da Floresta Amazônica.
- Um outro grande grupo, com *C. peruviana* basal à diversificação dentro de *C. aurita*.
- A possível vicariância separando, à oeste da Floresta Amazônia, a subespécie *C. aurita australis* das demais subespécies de *C. aurita* estudados.

A história das áreas de endemismo descritas para a América do Sul e espécies da família Conopophagidae foram analisadas por métodos de biogeografia cladística. A associação entre a filogenia do gênero *Conopophaga* e relações entre áreas de endemismo permitiu sugerir que:

- A Floresta Amazônica não é uma unidade biogeográfica, apresentando porções mais relacionadas a Mata Atlântica;
- Os vários eventos de dispersão propostos para explicar a relação entre os táxons da Mata Atlântica e da Floresta Amazônica parecem indicar que ocorreram mais de um contato entre esses dois blocos florestais. Sendo assim, duas possíveis hipóteses poderiam explicar esses contatos:
 1. Eventos de expansão e retração florestais devido a mudanças climáticas globais teriam isolado e conectado as florestas Amazônica e Atlântica mais de uma vez através do leste da América do Sul;
 2. As matas de galeria do Cerrado no Brasil Central poderiam ter atuado como conexão entre esses blocos florestais. Nesse caso, o ancestral dos indivíduos da família Conopophagidae com mandíbula branca possivelmente teria se distribuído na Amazônia, Mata Atlântica e enclaves florestais de áreas abertas (Cerrado e Caatinga). Posteriormente, a seleção diferenciada por hábitat poderia ter causado

a especiação de *C. l. cearae* nesses enclaves. Esse processo teria então causado o isolamento e diversificação dos táxons distribuídos na Mata Atlântica e Floresta Amazônica.

- Devido à forte relação entre o nordeste da Amazônia (Belém e Pará) e o norte da Mata Atlântica, talvez essas duas regiões devessem ser consideradas monofiléticas. Sendo assim, seria sugerido que o “componente SE” seja composto por sudeste da Amazônia (Rondônia), Mata Atlântica (MaN mais MaS) e o nordeste da América do Sul.

A análise mais detalhada da distribuição das linhagens genéticas de *C. lineata* sugere que:

- a espécie *C. lineata* dividida em quatro filogrupos:
 1. um clado mais ao norte da área amostrada (sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais), associado à subespécie *C. l. lineata*;
 2. um do sudeste de Minas Gerais, Rio de Janeiro até nordeste de São Paulo [N];
 3. outro em São Paulo e Paraná [SI];
 4. e outro do Rio Grande do Sul até Misiones [SII]
- as três linhagens acima são associadas a subespécie *C. l. vulgaris*;
- um evento vicariante na região compreendida pelo Vale do Rio Paraíba;
- uma fragmentação histórica entre as linhagens SI e SII;
- mudanças paleoclimáticas e neotectonismo na região do VRPS são os possíveis eventos históricos que influenciaram nas populações de *C. l. vulgaris*
-

A análise comparativa entre a filogeografia de *C. melanops* e *C. lineata* sugere que:

- existem dois grupos separados pelo rio São Francisco
- a divisão entre os grupos corresponde à distribuição das subespécies *C. m. nigrifrons* ao norte e *C. m. melanops* ao sul do rio São Francisco.
- que a subespécie *C. m. nigrifrons* seja reconhecida como espécie válida (*C. nigrifrons*)

- apesar de as inferências filogenéticas realizadas em *C. melanops* e *C. lineata* não serem totalmente concordantes, é possível que existam padrões de vicariância na região do VRPS
- é possível que os mesmos fatores que afetaram a distribuição das linhagens de *C. lineata*, tais como ciclos de alterações climáticas, tenham influenciado na diversificação de *C. melanops*.