



Pós-Graduação
ZOOLOGIA
MPEG/UFPA



MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ZOOLOGIA

**Filogeografia e limites inter-específicos em *Dendrocolaptes certhia* (Aves:
Dendrocolaptidae)**

ROMINA DO SOCORRO DA SILVA BATISTA

BELÉM – PARÁ

2012

**MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ZOOLOGIA**

**Filogeografia e limites inter-específicos em *Dendrocolaptes certhia* (Aves:
Dendrocolaptidae)**

ROMINA DO SOCORRO DA SILVA BATISTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Curso de Mestrado, do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Zoologia.

Orientador: Dr. Alexandre Aleixo

BELÉM – PARÁ

2012

ROMINA DO SOCORRO DA SILVA BATISTA

**Filogeografia e limites inter-específicos em *Dendrocolaptes certhia* (aves:
Dendrocolaptidae)**

Prof. Dr. Alexandre Aleixo (Orientador)
Coordenação de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi

Dr. Fernando Mendonça D'Horta (Universidade de São Paulo)

**Dr. Gustavo Sebastián Cabanne (Museo Argentino de Ciencias Naturales "B.
Rivadavia)**

Dr. Fábio Raposo do Amaral (Universidade Federal de São Paulo)

Dr. Marcos Maldonado Coelho (Universidade de São Paulo)

Dr. Pérciles Senna (Universidade Federal do Pará - Campus Bragança)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa de pesquisa e auxílio ao trabalho de laboratório, financiado pelo projeto INCT em Biodiversidade e Uso da Terra da Amazônia (processo no. 574008/2008-0).

Ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal do Pará em convênio com o Museu Paraense Emílio Goeldi, pela oportunidade do mestrado.

Ao Prof. Dr. Alexandre Aleixo, pela orientação, amizade, críticas construtivas ao trabalho, apoio, ensinamentos e por ter confiado em mim para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luis Fábio Silveira curador da coleção ornitológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo pelo acesso ao material dessa coleção.

A Louisiana State University por ceder amostras de tecido essenciais para a realização do trabalho.

A Fátima Lima pela ajuda no acesso ao material da coleção Ornitológica do Museu Paraense Emílio Goeldi, e pela amizade e conselhos.

Cynthia Helena Miléo de M. Bandeira pelos ensinamentos e ajuda durante os procedimentos laboratoriais desenvolvidos nesse projeto.

A Dorotéia Albuquerque e Vanessa Sousa, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Zoologia do MPEG, pela ajuda nas tarefas burocráticas.

Aos amigos do MPEG pela ajuda e amizade: Gregory Thom, Lucas Eduardo, Tibério Burlamaqui, Carla Sardeli, Leonardo Moura, Leonardo Miranda, Lincoln Carneiro, Carlos Eduardo Portes, Denise Martins, Shirliane Araujo, Luciano dos Anjos, Sidnei Dantas, Maya Faccio, Elinete Rodriguez, Antonita Santana, Mateus Ferreira, Bruno Almeida, Rodrigo Pena, Marina Mendonça, Paula Almeida, Alessandro Menks. Em especial Sarah Scalercio pelos conselhos, confidências, incentivos.

Aos meus pais, Ronald Wanzeller Batista e Rosângela Maria Soares da S. Batista por toda ajuda, amor, ensinamentos e incentivo. Se não fosse por vocês eu não chegaria até aqui. E aos meus irmãos Romulo Batista e Rochelle Batista, pelos conselhos, amor e incentivos.

SUMÁRIO

Sumário	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Abstract	vi
Resumo	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
ARTIGO	6
1. Introdução	7
1.1. Breve revisão da taxonômica de <i>Dendrocolaptes certhia</i> (Aves: Dendrocolaptidae)	8
2. Material e Métodos	10
2.1 Amostras dos táxons e seleção do grupo externo	10
2.2 Genes e Procedimentos Laboratoriais	10
2.3. Análises Filogenéticas	12
2.3.1 Faseamento alélico	12
2.3.2. Inferências Filogenéticas Bayesianas	12
2.3.3. Reconstrução da árvore de espécies	12
2.3.4. Datação Molecular	13
2.4. Análises Populacionais	13
3. Resultados	14

3.1 Filogenia	14
3.2 Tempos de divergência	17
3.3 Variação e Estruturação Populacional	20
3.3.1 DNA mitocondrial (cyt <i>b</i> e ND2, 2061pb)	20
3.3.1.1 Divergência genética	20
3.3.1.2 Diversidade haplotípica, nucleotídica e AMOVA – mtDNA .	20
3.3.1.3 Rede de Haplótipos	22
3.3.2 Loci nucleares (bf5, G3PDH e MUSK, 1601pb)	23
3.3.2.1 Diversidades no banco de DNA nuclear	23
3.3.2.2 Rede de Haplótipos	25
4. Discussão	26
4.1 Implicações taxonômicas para a espécie politípica <i>D. certhia</i>	26
4.2 Diversificação de <i>D. certhia</i> na Amazônia	29
REFERÊNCIAS	33
Apendice A – Lista de indivíduos utilizados e suas respectivas localidades de coleta	40
Apêndice B – Divergência genética (distância-<i>p</i>) entre e dentro das populações que compõe a espécie politípica <i>D. certhia</i>.	44

Lista de Figuras

- Figura 1.** Mapa de distribuição dos táxons agrupados na espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* segundo Marantz e colaboradores (2003) e Peters (1951). O táxon *D. certhia ridgwayi*, reconhecido por Peters (1951) não é tratado por Marantz e colaboradores (2003) devido a problemas na sua diagnose. Em destaque as Áreas de Endemismo para a Amazônia (sensu Silva et al., 2005), principais tributários da drenagem deste bioma, e pontos de coleta referente a amostragem utilizada 9
- Figura 2.** Filogenia inter-específica de *Dendrocolaptes certhia* obtidas por Inferência Bayesiana (Bay) a partir de (2A) 2061 pares de base dos genes mitocondriais ND2 e *cyt b* e (2B) 3662 pares de base dos genes mitocondriais e os loci nucleares BF 5, G3PDH e MUSK. Números acima dos nós indicam valores de probabilidade posterior 16
- Figura 3.** Árvore de espécies estimada para as linhagens da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* com o aplicativo *BEAST a partir de 3662 pares de base de genes mitocondriais (ND2 e *cyt b*) e três loci nucleares (-f 5, G3PDH e MUSK). Números associados aos nós indicam valores de probabilidade posterior obtidos na análise com 300 milhões de gerações. O mapa ilustra as distribuições das diferentes linhagens de *D. certhia* tratadas como espécies na análise 17
- Figura 4.** Cronogramas de diversificação das linhagens da espécie politípica *D. certhia* estimados pelo aplicativo BEAST com base em: (A) dados mitocondriais e critério inferência Bayesiana e (B) dados multilocus e abordagem coalescente (ST). Em ambas estimativas foi utilizada a taxa de calibração de 2.1% para cada milhão de anos para o gene *cyt b* (Weir e Schluter, 2008) 19
- Figura 5.** Rede e distribuição geográfica de haplótipos mitocondriais (2061) pb de *cyt b* e ND2 obtida para *D. certhia* pelo método *Median Joining* mostrando as relações e diferenciação entre as principais populações de *D. certhia*. Tamanhos dos círculos são proporcionais à frequência de ocorrência dos haplótipos. População da área de endemismo Inambari (*juruanus*) - Verde; Imeri (*radiolatus*) - Rosa Pink; Rondônia (*concolor*) - Marrom; Guiana (*certhia*) - Azul escuro;

Tapajós (<i>ridgwayi</i> A) - Verde Musgo; Xingu (<i>ridgwayi</i> B) - Azul claro; Belém (<i>medius</i>) – Rosa	22
---	----

Figura 6. Rede e distribuição geográfica de haplótipos nucleares (-f 5 – A, G3PDH – B, e MUSK – C) obtida para *D. certhia* pelo método *Median Joining* mostrando as relações e diferenciação entre as principais populações de *D. certhia*. Tamanhos dos círculos são proporcionais a frequência de ocorrência dos haplótipos. População da área de endemismo Inambari (*juruanus*) - Verde; Imeri (*radiolatus*) - Rosa Pink; Rondônia (*concolor*) - Marrom; Guiana (*certhia*) - Azul escuro; Tapajós (*ridgwayi* A) - Verde Musgo; Xingu (*ridgwayi* B) - Azul claro; Belém (*medius*) – Rosa

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de <i>primers</i> utilizados e informações gerais sobre cada gene sequenciado	11
Tabela 2. Diversidades haplotídica e nucleotídica para populações monofiléticas de <i>D. certhia</i> a partir de 2061 pb de dois genes mitocondriais (<i>cytb</i> + <i>nd2</i>).....	20
Tabela 3. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) entre populações reciprocamente monofiléticas de <i>D. certhia</i> separadas por alguns dos principais rios da Amazônia	21
Tabela 4. Diversidades haplotídica e nucleotídica para populações monofiléticas de <i>D. certhia</i> a partir de 1601 pb de três loci nucleares (<i>Bf5</i> , <i>G3PDH</i> , e <i>MUSK</i>).....	22

Abstract

The systematics of the polytypic species *Dendrocolaptes certhia* (Aves: Dendrocolaptidae) has been studied so far only through morphological characters, which have been unable to resolve relationships and provide consistent diagnoses for many described taxa grouped under this species. Molecular characters thus become a potential tool to provide a higher degree of resolution concerning the evolutionary history of this polytypic species. We used a *multilocus* database combining two mitochondrial and three nuclear genes from different *loci*, which was analyzed with different approaches (Bayesian, coalescent, and population genetics), to propose the first phylogeographic hypothesis for this polytypic species. The molecular data indicate that traditional taxonomy contrasts strongly with the evolutionary history of *Dendrocolaptes certhia*, with the recognition of seven diagnosable independent species rather than a single polytypic species. These seven species are distributed coincidentally with the main areas of endemism in the Amazon, and their diversification appears to be strongly correlated with the formation of the modern Amazonian drainage during Plio-Pleistocene times.

Key-words: Amazonia, historical biogeography, population genetics, hypotheses of diversification, coalescent approach.

Resumo

A sistemática da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* (Aves: Dendrocolaptidae) foi estudada até hoje apenas com base em caracteres morfológicos e até então não se conseguiu delimitar as relações e propor diagnoses consistentes para todos os táxons / populações agrupados na espécie. Caracteres moleculares se tornam assim uma ferramenta potencial para fornecer um grau maior de resolução acerca da história evolutiva desta espécie politípica. Para tal, foi utilizado um banco de dados *multilocus* composto de dois genes mitocondriais e três *loci* diferentes de genes nucleares, e a partir de análises com diferentes abordagens (bayesianas, coalescentes e genético populacionais) foi então proposta a primeira filogeografia para esta espécie. Os dados moleculares sugerem alterações na taxonomia de *Dendrocolaptes certhia* em relação a arranjos propostos onde propomos um novo tratamento taxonômico que reconhece sete espécies diagnosticáveis ao invés de uma única espécie politípica reunindo todos os táxons de *D. certhia*. Estas sete espécies estão distribuídas de maneira a corroborar com as principais áreas de endemismo na Amazônia, e sua diversificação parece estar fortemente correlacionada com a formação da drenagem moderna da Amazônia durante os períodos do Plio-Pleistoceno.

Palavras-Chave: Amazônia, biogeografia histórica, genética de populações, hipóteses de diversificação, abordagem coalescente.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui 1832 espécies (CBRO, 2011) e a Amazônia, como um todo (incluindo a parte extra-brasileira do bioma), 1800 (Valle et al., 2008). O conhecimento da diversidade, das filogenias e distribuições dos organismos na Amazônia ainda é insuficiente, como revelado pelo grande número de espécies de aves descritas nas últimas décadas para esta região (Silveira et al., 2005; Whitney et al., 2004). Um grande número de estudos revelou que muitas espécies com ampla distribuição na bacia Amazônica são na verdade compostas por um complexo de espécies (Aleixo, 2002, 2004; Zimmer, 2002; Isler et al., 2007a, 2007b; Isler e Whitney, 2011). Desta maneira, novos estudos como o proposto aqui são necessários para uma estimativa mais acurada da real diversidade da avifauna Amazônica.

A delimitação de espécies é de fundamental importância, já que são usadas como unidades básicas em análises em várias disciplinas da biologia como biogeografia, ecologia e macroevolução (Sites e Marshall, 2004). Portanto, pesquisas sobre a história evolutiva de populações agrupadas dentro de uma mesma espécie biológica são essenciais para assegurar que os limites inter-específicos formalmente reconhecidos para a espécie sejam consistentes com os padrões fundamentais de evolução do grupo (Watson, 2005).

Apesar do progresso nos últimos anos, envolvendo as metodologias de reconstruções filogenéticas, muitos desafios criam incertezas com relação às verdadeiras associações históricas dos taxóons analisados (Rokas et al., 2003). Desta maneira, em decorrência de grandes equívocos possíveis inerentes às estimativas de parâmetros genéticos inferidos a partir de um único *locus* (Hudson, 1992; Kuhner et al., 1995), existem boas razões para se adotar a nova abordagem em filogeografia baseada em múltiplos marcadores (*multilocus*) e que, portanto, combinam tanto marcadores mitocondriais como *loci* nucleares nas inferências filogenéticas (Brumfield et al., 2007).

O gênero *Dendrocolaptes* (Aves: Dendrocolaptidae) contém cinco espécies: *D. certhia* (Boddaert, 1783), *D. hoffmannsi* Hellmayr, 1909, *D. picumnus* Lichtenstein, 1820, *D. platyrostris* Spix, 1824 e *D. sanctithomae* (Lafresnaye, 1852).

A espécie biológica politípica *Dendrocolaptes certhia* (Aves: Dendrocolaptidae), foco deste estudo, pode ser encontrada por toda Bacia Amazônica, com uma população isolada no centro de endemismo Pernambuco (estados de Pernambuco e Alagoas) no bioma da Mata Atlântica, e inclui seis subespécies segundo Marantz e colaboradores (2003): 1) *Dendrocolaptes certhia certhia* (Boddaert, 1783), ocorrendo no nordeste da Amazônia e escudo guianense, cuja distribuição coincide com a área de endemismo

Guiana (Silva et al., 2005); 2) *Dendrocolaptes certhia radiolatus* Sclater & Salvin, 1868 encontrada no noroeste da Amazônia brasileira, sudeste da Colômbia, leste do Equador e norte do Peru, referente às áreas de endemismo Imeri e Napo; 3) *Dendrocolaptes certhia juruanus* Ihering, 1905 do sudoeste da Amazônia entre o sopé dos Andes e a margem esquerda do rio Madeira no Brasil, e no norte da Bolívia na área de endemismo Inambari; 4) *Dendrocolaptes certhia concolor* Pelzen, 1868 encontrado no sul e centro da Amazônia brasileira, no interflúvio Madeira-Tapajós, na área de endemismo Rondônia; 5) *Dendrocolaptes certhia ridgwayi* Hellmayr, 1905 que ocorre no sudeste da Amazônia brasileira, ao sul do rio Amazonas e a leste do rio Tapajós nas áreas de endemismo Tapajós e Xingu; 6) *Dendrocolaptes certhia polyzonus* Todd, 1913 ocorrendo no sudoeste da Amazônia, centro da Bolívia, possivelmente se estendendo ao sudeste do Perú, compreendendo a região extra-brasileira deste Bioma; e 7) *Dendrocolaptes certhia medius* Todd, 1920, que ocorre na área de endemismo Belém e com uma população isolada na Mata Atlântica na área de endemismo Pernambuco (nos Estados de Alagoas e Pernambuco) (Peters, 1951; Marantz et al., 2003).

A sistemática da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* (Dendrocolaptidae) foi estudada até hoje apenas com base em caracteres morfológicos (Zimmer, 1934; Marantz et al., 2003; Marantz, 1997; Marantz e Patten, 2010), porém nenhum conseguiu delimitar as relações e propor diagnoses consistentes para todos os táxons / populações agrupados na espécie. Portanto, caracteres moleculares tem o potencial de fornecer um grau maior de resolução acerca da história evolutiva da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia*, o que permitirá esclarecer melhor o padrão de diversificação do grupo bem como o status taxonômico de suas diferentes populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguinaldo, A. M. A.; Turbeville, J.M.; Linford, L. S.; Rivera, M. C.; Garey, J. R.; Raff, R. A.; Lake, J. A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. 387, 489 – 493.

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.

Aleixo, A., 2002. Molecular systematics and the role of the “várzea”-“terra-firme” ecotone in the diversification of *Xiphorhynchus* woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Auk*. 119, 621 – 640.

Baldauf, S. L.; Roger, A. J.; Wenk-Siefert, I.; Doolittle, W. F., 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*. 290, 972 – 977.

Brumfield, R. T. e Edwards, S. V., 2007. Evolution into and out of the andes: a Bayesian analysis of historical diversification in *Thamnophilus* antshrikes. *Evolution*. 61, 346 – 367.

Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO). *Lista das Aves do Brasil*. Versão 25/01/2011. Disponível em: www.cbro.org.br. Acesso em: 23 dez., 2011.

Hudson, R. R., 1992. Gene trees, species trees, and the segregation of ancestral alleles. *Genetics*. 131, 509 – 512.

Isler, M. L.; Isler, P. R.; Whitney, B. M., 2007b. Species limits in antbirds (Thamnophilidae): the warbling antbird (*Hypocnemis cantator*) complex. *The Auk* 124(1), 11 – 28.

Isler, M. L.; Isler, P. R.; Whitney, B. M.; Zimmer, K. J., 2007a. Species limits in the “*Schistocichla*” complex of *Percnostola* antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae). *The Wilson Journal of Ornithology* 119(1), 53 – 70.

Isler, M. L. e Whitney, B. M., 2011. Species Limits in Antbirds (Thamnophilidae): The Scale-Backed Antbird (*Willisornis poecilinotus*) Complex. *The Wilson Journal of Ornithology*, 123(1), 1– 14.

Kuhner, M. K.; Yamato, J.; Felsenstein, J., 1995. Estimating Effective Population Size and Mutation Rate From Sequence Data Using Metropolis-Hastings Sampling. *Genetics*. 140, 1421–1490.

Marantz, C., 1997. Geographic variation of plumage patterns in the woodcreeper genus *Dendrocolaptes* (Dendrocolaptidae). *Ornithological Monographs*. 48, 399 – 429.

Marantz, C. A.; Aleixo, A.; Bevier, L. R.; Patten, M. A., 2003. Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). In: del Hoyo, J.; Elliott, A.; Christie, D.A. (ed.), *Handbook of birds of the world*, pp. 358 – 447. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

Marantz, C. e Patten, M. A., 2010. Quantifying subspecies analyzes: a case study of morphometric variation and subspecies in the woodcreeper genus *Dendrocolaptes*. *Ornithological Monographs*. 67, 123 – 140.

Petters, J. L., 1951. *Check-List of Birds of the World*. Massachusetts (U.S.A): Cambridge Museum of Comparative Zoology.

Rokas, A.; Williams, B. L.; King, N.; Carroll, S. B., 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*. 425.

Silva, J. M. C.; Rylands, A. B.; Da Fonseca, G. A. B., 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*. 19 (3), 689 – 694.

Silveira, L. F.; Lima, F.C.T.; Höfling, E., 2005. A new species of *Aratinga* Parakeet (Psittaciformes: Psittacidae) from Brazil, with taxonomic remarks on the *Aratinga solstitialis* complex. *The Auk*. 122, 292 – 305.

Sites, J. W. e Marshall, J. C., 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 35, 199 – 227.

Valle, M. M.; Cohn-Haft, M.; Bergen, S.; PIMM S. L., 2008. Effects of Future Infrastructure development on threat status and occurrence of amazonian birds. *Conservation Biology*. 22, 1006 – 1015.

Watson, D. M., 2005. Diagnosable versus Distinct: evaluating species limits in birds. *Forum: American Institute of Biology Science. BioScience*. 55 (1), 60 – 68.

Whitney, B.M.; Oren, D.C.; Brumfield, R.T., 2004. A new species of *Thamnophilus* antshrike (Aves: Thamnophilidae) from the serra do Divisor, Acre, Brazil. *The Auk*. 121, 1031– 1039.

Zimmer, J. T., 1934. Studies on Peruvian birds No. 14. Notes on the genera *Dendrocolaptes*, *Hylexetastes*, *Xiphocolaptes*, *Dendroplex*, and *Lepidocolaptes*. *American Museum Novitates* 753.

Zimmer, K. J., 2002. Species limits in olive-backed foliage-gleaners (*Automolus*; Furnariidae). *Wilson Bulletin*. 114, 20-37.

ARTIGO**FILOGEOGRAFIA E LIMITES INTER-ESPECÍFICOS EM *DENDROCOLAPTES*
CERTHIA (AVES: DENDROCOLAPTIDAE)**

ROMINA BATISTA¹, LORENA AZEVEDO², MARCELO VALLINOTO², IRACILDA
SAMPAIO², HORACIO SCHNEIDER², ALEXANDRE ALEIXO^{3,4}

¹ *Curso de Pós-Graduação de Zoologia, Universidade Federal do Pará / Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil.*

² *Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Campus Universitário de Bragança, Universidade Federal do Pará, Bragança-PA, 68600-000, Brazil.*

³ *Coordenação de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Caixa Postal 399, CEP 66040-170, Belém, Pará, Brasil.*

⁴ Corresponding author. E-mail: aleixo@museu-goeldi.br

1. Introdução

Estudos moleculares têm proporcionado novas discussões acerca da origem da biodiversidade na Amazônia (Aleixo, 2002, 2004; Ribas et al., 2012). Contudo, este conhecimento, bem como o das filogenias e distribuições dos organismos na Amazônia e região Neotropical como um todo ainda é insuficiente. Um grande número de estudos, levando em consideração caracteres moleculares e bioacústicos, revelou que muitas espécies com ampla distribuição na bacia Amazônica são na verdade compostas por um complexo de espécies (Bierregaard et al., 1997; Krabbe et al., 1999; Aleixo 2002, 2004; Zimmer, 2002; Isler et. al., 2007a; Isler et. al., 2007b; Brumfield et al., 2008; Isler e Whitney, 2011; Ribas et al., 2012), indicando que estudos focados em espécies politípicas são necessários para uma estimativa mais acurada da real diversidade da avifauna Amazônica.

Os modelos de diversificação biológica propostos para a Amazônia se tornam assim fundamentais para compreensão da história evolutiva de populações e de espécies da região. Dentre os modelos mais debatidos estão: a hipótese dos grandes Rios da Amazônia como barreiras biogeográficas (Gascon et al., 2000), e a hipótese dos refúgios proposta por Haffer (1969). Estas duas principais hipóteses de diversificação vêm sendo discutidas e tendo suas diferentes previsões contrastadas com dados filogeográficos (e.g., Aleixo, 2004; Ribas et al., 2012) na tentativa de compreender qual delas melhor explica as origens da biodiversidade Amazônica.

A Hipótese dos Rios explica a origem e distribuição de espécies na Amazônia levando em consideração os rios funcionando como barreiras para a dispersão de espécies (Haffer 1992, 2001). Segundo Gascon et al. (2000), após o desenvolvimento da drenagem atual, muitas populações, especialmente as habitantes do interior da floresta, separam-se, sofrendo especiação em margens opostas dos rios.

Haffer (1969) e Vanzolini e Williams (1970) propuseram a chamada Hipótese dos Refúgios do Pleistoceno. Esta hipótese originalmente postulou que oscilações entre climas secos e úmidos durante o Quaternário e o Terciário permitiram a formação de refúgios florestais isolados, desencadeando assim o surgimento de novas espécies devido à fragmentação de populações e a especiação alopátrica. Haffer (1969, 1974) ainda detectou unidades biogeográficas na região Neotropical baseando-se na distribuição dos diferentes táxons de aves, o que iniciou a delimitação das áreas de endemismo e a geração de hipóteses de especiação para a região.

A espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* (Aves: Dendrocolaptidae) constitui um excelente organismo para testar hipóteses de diversificação para a região Neotropical como um todo e a Amazônia em particular por dois motivos principais: 1) os seus táxons alo-parapátricos (considerados subespécies) têm padrões de plumagem bastante variáveis, indicando um grau considerável de diferenciação geográfica potencialmente informativa para reconstruções biogeográficas na região; 2) suas subespécies se distribuem por toda a bacia Amazônica e parte da Mata Atlântica, contemplando todas as Áreas de Endemismos reconhecidos para a Amazônia segundo Silva et al. (2005): Guiana, Imeri, Napo, Inambari, Rondônia, Tapajós, Xingu e Belém, tornando-o um modelo bastante representativo dos processos de diferenciação em linhagens associados com florestas úmidas de toda a região.

1.1. Breve revisão da taxonômica de *Dendrocolaptes certhia* (Aves: Dendrocolaptidae)

A espécie politípica *D. certhia* se distribui por toda bacia Amazônica, com uma população isolada na Mata Atlântica (Área de Endemismo Pernambuco nos estados de Alagoas, e Pernambuco), tendo seis subespécies reconhecidas (Marantz et al., 2003): *D. certhia certhia* (Boddaert, 1783), *D. certhia radiolatus* Sclater & Salvin, 1868, *D. certhia concolor* Pelzeln, 1868, *D. certhia juruanus* Ihering, 1905, *D. certhia polyzonus* Todd, 1913 e *D. certhia medius* Todd, 1920. Historicamente, mais um táxon foi tratado como subespécie de *D. certhia* até recentemente (Peters, 1951): *D. certhia ridgwayi* Hellmayr, 1905. Contudo, a diagnose deste táxon com relação à outros considerados subespécies de *D. certhia* mostrou-se problemática, resultando na sua sinonimização com um táxon com prioridade por Marantz e colaboradores (2003).

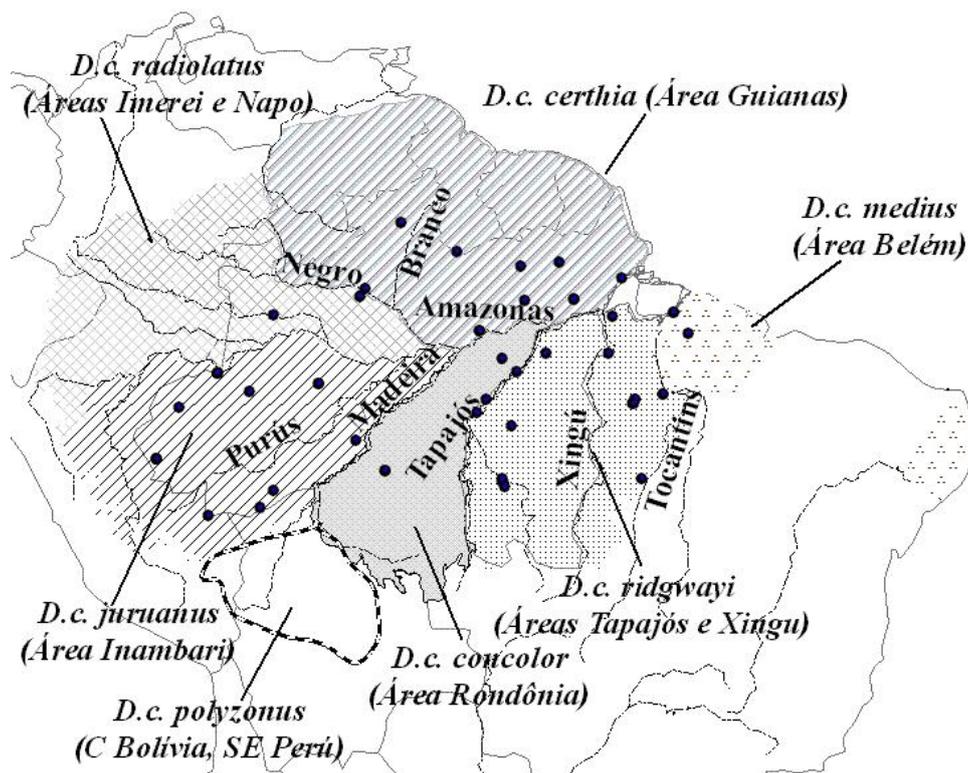


Figura 1. Mapa de distribuição dos táxons agrupados na espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* segundo Marantz e colaboradores (2003) e Peters (1951). O táxon *D. certhia ridgwayi*, reconhecido por Peters (1951) não é tratado por Marantz e colaboradores (2003) devido a problemas na sua diagnose. Em destaque as Áreas de Endemismo para a Amazônia (sensu Silva et al., 2005), principais tributários da drenagem deste bioma, e pontos de coleta referentes a amostragem utilizada.

A sistemática da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* (Dendrocolaptidae) foi estudada até hoje apenas com base em caracteres morfológicos (Zimmer, 1934; Marantz et al., 2003; Marantz, 1997; Marantz e Patten, 2010), porém nenhum conseguiu delimitar as relações e propor diagnoses consistentes para todos os táxons / populações agrupados na espécie. Portanto, caracteres moleculares tem o potencial de fornecer um grau maior de resolução acerca da história evolutiva da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia*, o que permitirá esclarecer melhor o padrão de diversificação do grupo bem como o status taxonômico de suas diferentes populações.

Neste estudo, foi utilizado um banco de dados *multilocus* composto de dois genes mitocondriais e três genes nucleares para reconstruir pela primeira vez a filogeografia dos táxons / populações da espécie politípica *D. certhia*. Essa filogeografia foi contrastada

com com o arranjo taxonômico proposto atualmente para o grupo. Além disso, foram também realizadas análises de genética de populações para verificar o grau de estruturação e variação genética dentro da espécie politípica *D. certhia*.

2. Material e Métodos

2.1 Amostras dos táxons e seleção do grupo externo

Este trabalho considerou os seguintes arranjos taxonômicos para seleção dos espécimes e táxons a serem sequenciados: Peters (1951), Marantz (1997), Marantz e colaboradores (2003), e Marantz e Patten (2010). Foram obtidos tecidos congelados ou fixados em álcool absoluto para extração de DNA das coleções ornitológicas do Museu Paraense Emílio Goeldi – MPEG – Belém (PA); Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP – São Paulo (SP); e *Field Museum of Natural History* – FMNH – Chicago (EUA). Ao todo, foram amostrados 57 indivíduos provenientes de 49 localidades, referentes a seis subespécies reconhecidas da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia*: *D. c. certhia*, *D. c. radiolatus*, *D. c. juruanus*, *D. c. concolor*, *D. c. ridgwayi*, e *D. c. medius* (Apêndice A). Amostras de tecidos (n=20) de representantes do táxon *D. c. polyzonus* foram solicitados com antecedência ao Museu de Ciências Naturais da *Louisiana State University* (LSUMNS). Contudo, apesar da solicitação ter sido atendida, o tempo de remessa do material não foi suficiente para incluir nas análises deste documento. Porém, amostras deste táxon certamente serão incluídas na elaboração do artigo. Como grupo externo, foram utilizadas seqüências de *D. sanctithomae*, considerada espécie irmã de *D. certhia*, segundo a filogenia proposta por Derryberry e colaboradores (2011).

2.2 Genes e Procedimentos Laboratoriais

As seqüências que compõe este banco de dados incluem dois genes mitocondriais (1016 pb de citocromo *b* [*citb*] e 1045 pb de NADH desidrogenase subunidade 2 [ND2]) e três genes nucleares (563 pb do intron 5 do -fibrinogênio [-f 5], 600 pb do intron 3 do Receptor muscular específico de tirosina-kinase [MUSK] e 438 pb do intron 11 do Gliceraldeído-3-fosfo-dehidrogenase [G3PDH], totalizando um conjunto de dados *multilocus* de 3662 pb.

O DNA total foi isolado usando procedimentos padrões com a técnica de fenol-clorofórmio e com o *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA). Os fragmentos dos genes mitocondriais e nucleares de cada amostra foram amplificados via PCR. Iniciadores para cada gene podem ser visualizados na tabela 1. Os produtos das ampliações foram purificados com PEG 8000 ou com o Promega *Gel Purification Kit*, neste último caso quando houve presença de bandas inespecíficas. Os produtos purificados foram sequenciados no sequenciador automático ABI 3130. As seqüências obtidas foram editadas e alinhadas manualmente utilizando o aplicativo BioEdit 7.0.0 (Hall, 1999). A saturação de bases dos bancos de dados de cada gene sequenciado foi avaliada com o auxílio do aplicativo DAMBE 5.2.57 (<http://dambe.bio.uottawa.ca>). Sítios heterozigotos foram confirmados pela presença de picos duplos em ambas as fitas complementares de DNA, e estes foram codificados segundo código específico da IUPAC; *gaps* foram codificados como (-), e *missing data* como (?). Todas as seqüências serão depositadas no *GenBank*.

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados e informações gerais sobre cada gene sequenciado.

Gene	Seqüência dos Primers (5' → 3')	Fonte	Fragmento (pb) ¹	Modelo de substituição ²
Cytb	H16064: CTT CGA TCT TTG GCT TAC AAG ACC	Sorenson et al., 1999	1016	HKY+I+G
	L14990: AAT ATT TCA GCC TGA TGG AA			
ND2	H6313: CCT TGA AGC ACT TCT GGG AAT CAG A	Hackett, 1996	1045	GTR+I+G
	L5215: TAT CGG GCC CAT ACC CCG AAA AT			
-f 5	S713: CGC CAT ACA GAG TAT ACT GTG ACA T	Marini, Hackett, 2002	563	GTR+I+G
	AS767: GCC ATC CTG GCG ATC TGA A			
G3PDH	13b: TCC ACC TTT GAT GCG GGT GCT GGC AT	Fjeldsa° et al., 2003	438	HKY+I+G
	14b: AAG TCC ACA ACA CGG TTG CTG TA			
MUSK	13F(F): CTT CCA TGC ACT ACA ATG GGA AA	Clark, Witt, 2006	600	GTR+I+G
	13R(R): CTC TGA ACA TTG TGA TCC TCA A			

¹Tamanho médio do fragmento; ²Modelo selecionado pelo MrModelTest 2.3.

2.3. Análises Filogenéticas

2.3.1. Faseamento alélico

Para realização da determinação da fase gamética, foi usada metodologia descrita em Stephens, Smith, Donnelly, 2001; e Stephens, Donnelly, 2003, onde foram inferidos os haplótipos com o programa PHASE (Stephens & Scheet, 2005).

2.3.2. Inferências Filogenéticas Bayesianas

As filogenias foram estimadas separadamente para cada *locus* e também com base em um banco de dados concatenado. Os modelos evolutivos foram obtidos através do software MrModelTest 2.3 (Nylander et al., 2004). Para a análise com base no banco de dados concatenado, foi verificado qual o melhor esquema de partição através de uma análise de *Bayes Factors* (Brandley et al., 2005; Marshal, 2010). As filogenias foram estimadas através de análises Bayesianas no software MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001, Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Esta análise foi feita para 5.000.000 de gerações, amostrando uma árvore a cada 1.000 gerações. O software TRACER 1.4 foi usado para determinar quando as análises alcançaram convergência nos parâmetros estimados, e verificar se os valores com Tamanho de Amostra Efetivo - *Effective Sample Size* (ESS) eram ou não maior que 200, como recomendado por Drummond et al. (2007). As árvores amostradas antes das cadeias de Markov convergirem e atingirem a estabilidade foram descartadas como *burn-in*.

2.3.3. Reconstrução da árvore de espécies

Foi construída uma árvore de espécies com o uso do aplicativo *BEAST (Heled e Drummond, 2010), que permite a inferência das relações entre espécies mesmo em casos onde exista discordância entre árvores de genes. Foi seguida a metodologia descrita em Liu e colaboradores (2008), onde foram realizadas buscas das árvores de genes. Foi usado um total de 10.000.000 de gerações para estimar as árvores de genes, descartando-se árvores obtidas antes da corrente de Markov atingir valores de verossimilhança estáveis e convergentes (aproximadamente 25% do total de árvores selecionadas), segundo Huelsenbeck e Ronquist (2001).

A estabilidade da distribuição posterior foi estimada por inspeção visual dos *scores* no software TRACER 1.4. Todas as árvores de genes foram primeiramente estimadas sem datação molecular. Em seguida, foi gerada a árvore de espécies, com datação calibrada segundo a taxa do gene *cyt b* (Weir e Schluter, 2008), usando a opção *Yule Process* como *prior*. Foram realizadas seis rodadas independentes de 50.000.000 de gerações, combinadas em seguida com o aplicativo *LogCombiner*.

2.3.4. Datação Molecular

Para estimativa do tempo de divergência entre as diferentes linhagens de *D. certhia* foram utilizadas sequências do gene mitocondrial *cyt b*, onde foi assumida uma calibração de 2.1% de divergência por cada milhão de ano (Weir e Schlutter, 2008). O programa BEAST v 1.6.1 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) foi utilizado para a inferência das divergências de tempo durante a análise Bayesiana (Drummond et al., 2007). Utilizou-se a opção *Relaxed clock: uncorrelated lognormal*, a qual assume taxas independentes de evolução molecular nos diferentes ramos de uma filogenia. Cada parâmetro teve seu tamanho amostral efetivo (*effective sample size* - ESS) calculado pelo aplicativo TRACER 1.4, sendo considerado significativo quando ≥ 200 .

2.4. Análises Populacionais

Realizaram-se análises para avaliar padrões de variação em nível intra-específico utilizando-se ferramentas de genética de populações na espécie politépica *Dendrocolaptes certhia*. Verificou-se a distância genética não corrigida (distância *p*) dentro e entre as populações reciprocamente monofiléticas de *Dendrocolaptes certhia*. Esses cálculos foram feitos com base no software MEGA 5.05 e utilizando-se apenas os dados mitocondriais em função do maior número de sítios informativos deste *locus* em comparação com os *loci* nucleares. Foi verificado o número de haplótipos, a diversidade haplotípica e a diversidade nucleotídica usando o programa DnaSP v. 5.10 (Librado e Rozas, 2009). Foi realizada ainda análise da Variância Molecular (AMOVA) implementados no programa ARLEQUIN v. 3.0 (Excoffier e Schneider, 2005) para verificar a subdivisão populacional. Essa análise permite o reconhecimento dos níveis de diferenciação genética dentro e entre populações a partir de uma hipótese já estabelecida

(Excoffier et al., 1992). A hipótese adotada segue os resultados obtidos nas análises filogenéticas.

Por fim, foram geradas também redes de haplótipos no aplicativo Haploview (Barrett et al., 2005) para as linhagens mitocondriais – banco concatenado (ND2 e Cytb) e para cada gene nuclear (Bf5, MUSK e G3PDH). Para estes últimos *loci* utilizou-se o conjunto composto por fases gaméticas separadas.

3. Resultados

3.1 Filogenia

As análises filogenéticas com o banco de dados *multilocus* com 3662pb, usando diferentes métodos de reconstrução, apresentaram topologias diferentes. A melhor partição escolhida pela análise de *Bayes Factors* foi aquela onde o banco de dados estava dividido em cinco partes (uma partição para cada gene), que foi utilizada na análise Bayesiana com o banco de dados concatenado. As topologias obtidas a partir da análise Bayesianas (Bay) com dados dos genes independentes de mtDNA e com banco concatenado de mtDNA e DNA nuclear não foram congruentes (Figura 2). As árvores de genes também recapturaram topologias diferentes para cada marcador (dados não apresentados), assim como a análise da árvore de espécie (ST) (Figura 3), a qual leva em consideração cada gene independentemente. Apesar desta variação, todas as topologias obtidas confirmaram com forte apoio estatístico a monofilia da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia*, bem como a existência de sete unidades evolutivas independentes associadas às seguintes áreas de endemismos reconhecidas para a Amazônia (Silva et al., 2005): *certhia* (Guiana), *radiolatus* (Negro, Imeri e Napo), *juruanus* (Inambari), *concolor* (Rondônia), *ridgwayi* – A (Tapajós), *ridgwayi* – B (Xingu) e *medius* (Belém) (Figuras 2 e 3).

A topologia das análises Bay, a partir de dados mitocondriais, recapturou sete unidades evolutivas independentes bem apoiadas em *D. certhia*, resolvendo as relações entre elas a partir de nós com altas probabilidades posteriores próximas ao limiar de serem altas, exceto no caso de *D. c. concolor* da área de endemismo Rondônia (Figura 2A). Na árvore mitocondrial concatenada, a população do centro de endemismo Guiana é a mais basal e irmã de um grupo maior composto de táxons / populações que se distribuem desde a margem oeste do Rio Negro, até o extremo leste da Amazônia, com o

seguinte arranjo (*certhia (radiolatus (jruanus (concolor (ridgwayi - A (ridgwayi - B, D. medius))))))*)).

Em contrapartida, a topologia obtida a partir de dados de mtDNA e DNA nuclear concatenados foi diferente (Figura 2B). Esta topologia apontou para dois grandes grupos: um formado pelos táxons distribuídos nas áreas Imeri/Napo e Rondônia (*radiolatus* e *jruanus*, respectivamente), e outro grande clado formado por táxons distribuídos nos Escudos Brasileiro (*concolor*, *ridgwayi* e *medius*); e das Guianas (*certhia*). Esta topologia teve baixo apoio estatístico para alguns clados e, principalmente, para a maior parte dos nós referentes às relações entre os clados (Figura 2B).

A topologia da ST também recapturou sete unidades evolutivas, contudo com arranjo diferente das duas topologias anteriores e alguns nós com baixas probabilidades posteriores: (*certhia (radiolatus (jruanus, concolor) (ridgwayi - A, ridgwayi - B) medius))*) (Figura 3). Esta topologia difere das Bay principalmente pelo arranjo dos táxons distribuídos na área Inambari e no escudo brasileiro.

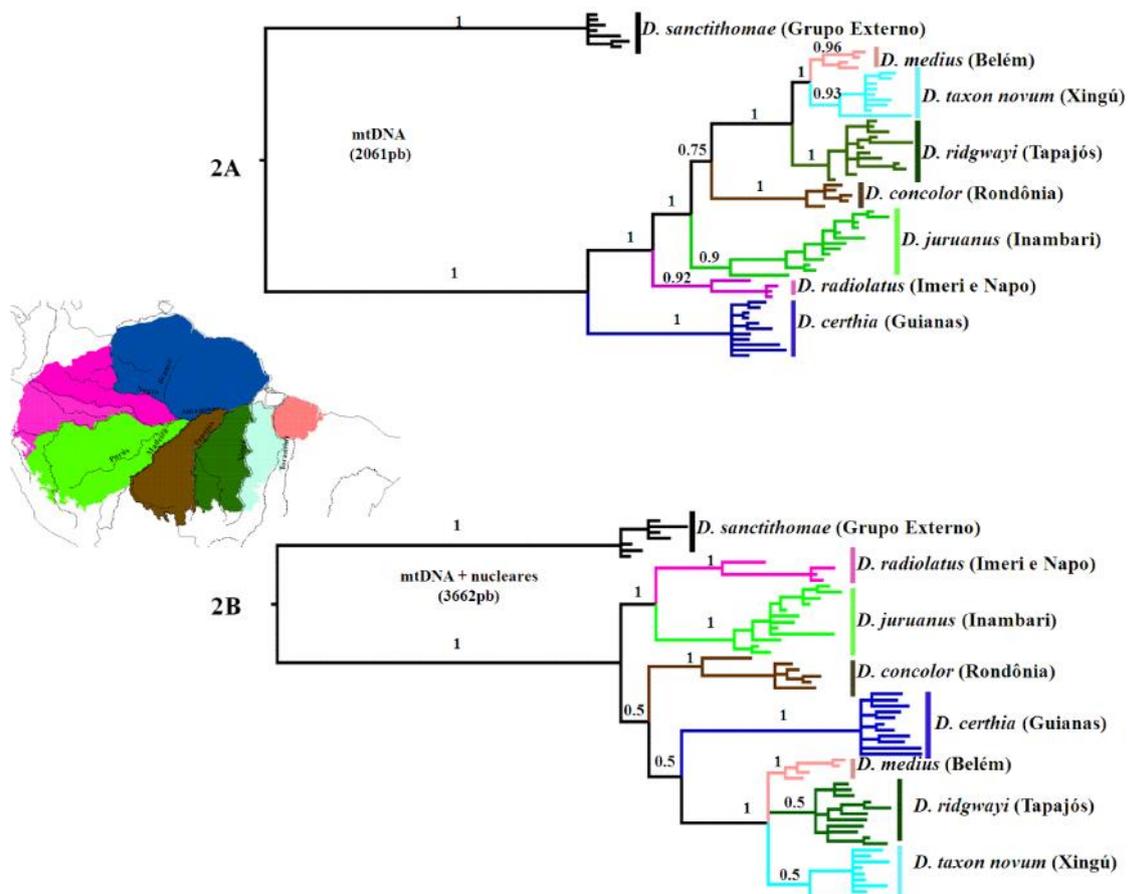


Figura 2. Filogenia inter-específica de *Dendrocolaptes certhia* obtidas por Inferência Bayesiana (Bay) a partir de (2A) 2061 pares de base dos genes mitocondriais ND2 e *cyt b* e (2B) 3662 pares de base dos genes mitocondriais e os loci nucleares BF 5, G3PDH e MUSK. Números acima dos nós indicam valores de probabilidade posterior.

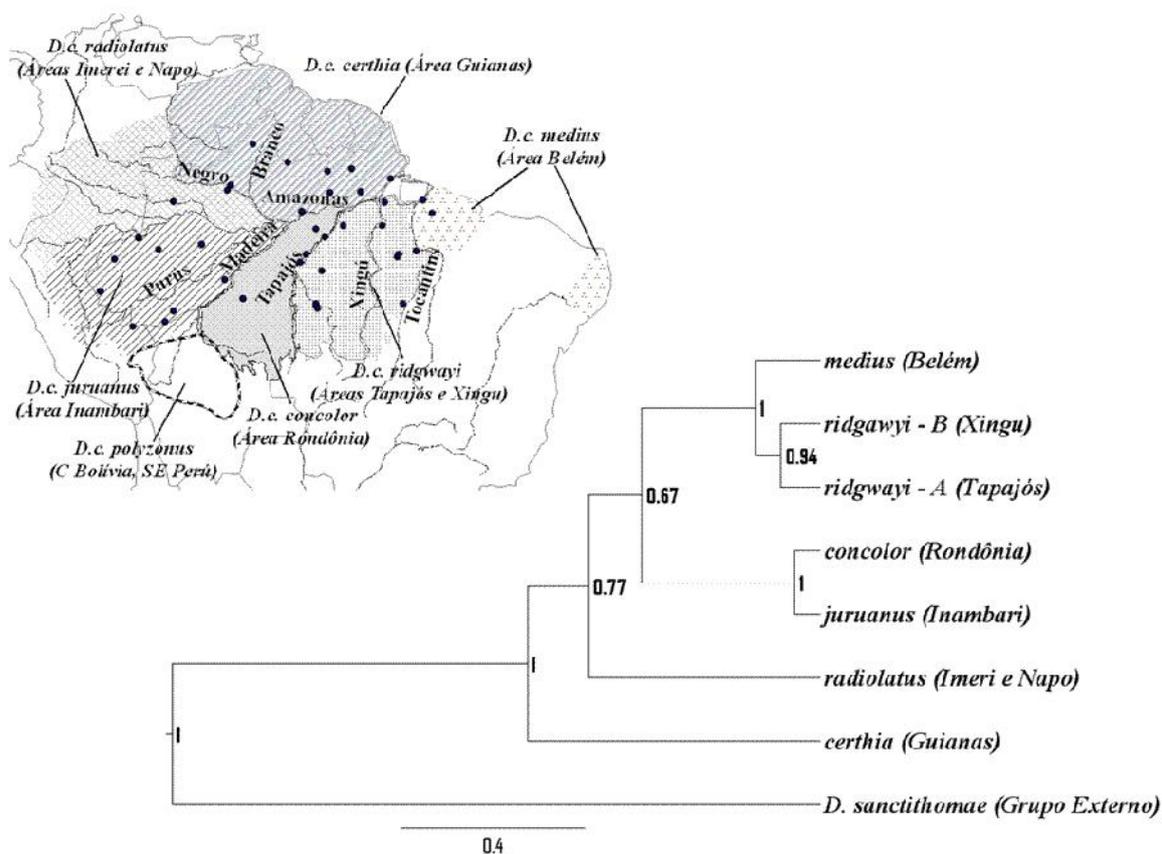


Figura 3. Árvore de espécies estimada para as linhagens da espécie politípica *Dendrocolaptes certhia* com o aplicativo *BEAST a partir de 3662 pares de base de genes mitocondriais (ND2 e *cyt b*) e três loci nucleares (-f 5, G3PDH e MUSK). Números associados aos nós indicam valores de probabilidade posterior obtidos na análise com 300 milhões de gerações. O mapa ilustra as distribuições das diferentes linhagens de *D. certhia* tratadas como espécies na análise.

3.2 Tempos de divergência

Foi possível calcular o tempo de divergência entre as diferentes linhagens de *D. certhia* através de datações moleculares com base na calibração para o gene *cyt b* de 2.1% para cada milhão de anos (Weir e Schluter, 2008). Os intervalos de confiança das estimativas são sobrepostos em grande parte, portanto, estas devem ser interpretadas com cautela.

De acordo com o cronograma obtido pela análise Bayesiana com base nos genes mitocondriais (onde obteve-se alto apoio estatístico na maioria dos clados; Figura 4A), o primeiro evento de diversificação ocorreu a cerca de 3.6 milhões de anos entre a espécie

politépica *D. certhia* e o seu grupo irmão trans-Andino (*D. sanctithomae*). Em seguida, entre cerca de 1.51 e 0.28 Ma, se observa o processo de diversificação dentro do complexo *certhia*, compreendendo o Quaternário.

O cenário de cladogênese (Figura 4A) obtido a partir da análise Bay indicou uma idade de 1.51 (1.82 – 6.17) Ma para o evento de diversificação entre *certhia* (população da área Guianas) e as demais populações da espécie politépica. Em seguida, obteve-se uma datação de 1.2 (0.82 – 3.14) Ma para o evento que separa a população *radiolatus* (áreas Imeri e Napo) das populações *juruanus*, *concolor*, *ridgwayi* – A, *ridgwayi* – B, e *medius*. O nó que indica o evento de cladogênese entre a população *juruanus* (área Inambari) e o escudo brasileiro é de 0.92 (0.48 – 1.61) Ma. Entre *concolor* e as populações distribuídas a Leste do Rio Tapajós, a datação foi estimada em 0.84 (0.44 – 1.44) Ma. O evento que separa a população *ridgwayi* – A do clado formado pelas populações *ridgwayi* – B e *medius*, foi estimado em 0.48 (0.17 – 0.8) Ma. Por fim, o nó indicativo do evento de cladogênese, mais recente obtido para esta análise, foi o que separa as populações *medius* de *ridgwayi* – B, sendo este de 0.28 (0.1 – 0.55) Ma.

Em contraste, o cronograma obtido a partir da análise de ST tem datações bem mais recentes para os mesmos eventos, ainda que com grandes intervalos de confiança (Figura 4B). Nesta análise o que podemos observar é que o primeiro evento, o mesmo reportado na análise Bay (Figura 4A), ou seja, a datação estimada para o evento de diversificação entre *D. certhia* e *D. sanctithomae* ocorreu por volta de 1.41 (0.62 – 2.36) Ma. e a diversificação da espécie politépica se deu entre 0.64 e 0.05 Ma. O primeiro evento de cladogênese que coincide com o obtido na Bay datou 0.64 (0.33 – 0.94) Ma. O segundo evento cladogenético também congruente com a Bay foi de 0.5 (0.29 – 0.74). Os próximos eventos de cladogênese tratam das populações distribuídas nas áreas Inambari, Rondônia, Tapajós, Xingu e Belém, que nesta análise (ST) foi possível observar relações diferentes entre as populações daquelas obtidas na Bay.

Assim, a data estimada para a diversificação entre um clado composto pelas populações *concolor* e *juruanus* e um outro clado formado pelas populações distribuídas a leste do Tapajós foi de 0.39 (0.23 – 0.57) Ma. Para o nó que indica a separação entre *medius*, e o clado formado pelas populações *ridgwayi* – A e *ridgwayi* – B obteve-se a data de 0.14 (0.07 – 0.21). Em seguida o clado formado pelas as populações *ridgwayi* – A e *ridgwayi* – B datou de 0.08 (0.04 – 0.13). Por fim o nó que separa as populações *concolor* e *juruanus* foi datado em 0.05 (0.02 – 0.09).

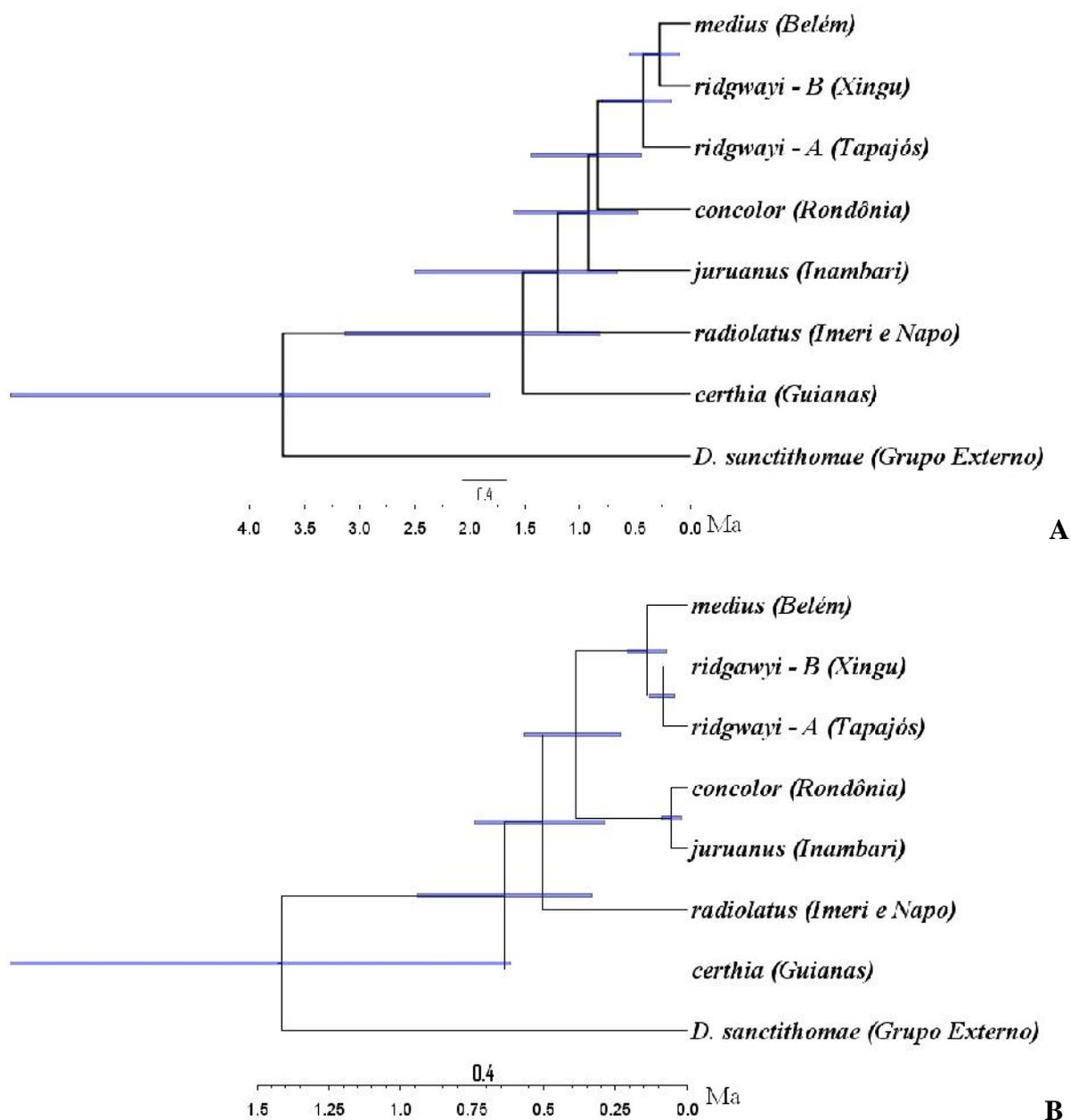


Figura 4. Cronogramas de diversificação das linhagens da espécie politípica *D. certhia* estimados pelo aplicativo BEAST com base em: (A) dados mitocondriais e critério inferência Bayesiana e (B) dados *multilocus* e abordagem coalescente (ST). Em ambas estimativas foi utilizada a taxa de calibração de 2.1% para cada milhão de anos para o gene *cyt b* (Weir e Schluter, 2008).

3.3 Variação e Estruturação Populacional

3.3.1 DNA mitocondrial (cyt *b* e ND2, 2061pb)

3.3.1.1 Divergência genética

Os níveis de divergências não corrigidos (distância-*p*) obtidos a partir do banco de dados com genes mitocondriais concatenados (2061pb), dentro e entre os táxons / populações de *D. certhia* foram realizados seguindo o agrupamento gerado pela hipótese filogenética obtida a partir de mtDNA (Figura 2A). Estes variaram entre 0.6 e 2.5% entre as populações e 0.03 e 0.4% dentro de cada população (Apêndice B), mostrando um padrão onde a divergência entre as populações é maior do que aquela dentro de cada população.

3.3.1.2 Diversidade haplotípica, nucleotídica e AMOVA - mtDNA

As 62 sequências com 2061 pb obtidas para *D. certhia*, representando os genes mitocondriais cyt *b* e ND2 concatenados apresentaram 37 haplótipos, com 147 sítios variáveis (107 informativos para parcimônia e 40 singletons).

Populações de *D. certhia* ocorrendo nas áreas de endemismo Inambari (*juruanus*), Guiana (*certhia*) e Rondônia (*concolor*) tiveram índices de diversidade nucleotídica maiores do que aquelas distribuídas no Escudo Brasileiro (*ridgwayi* – Tapajós e Xingú).

Tabela 2. Diversidades haplotípica e nucleotídica para populações monofiléticas de *D. certhia* a partir de 2061 pb de dois genes mitocondriais (cytb + nd2).

Área de endemismo (táxon)	N	Ha	Diversidade haplotípica	Diversidade Nucleotídica
Guianas (<i>certhia</i>)	9	8	0.97 ± 0.064	3.5 ± 0.66 X 10 ⁻³
Inambari (<i>juruanus</i>)	10	9	0.97 ± 0.054	4.2 ± 1.1 X 10 ⁻³
Rondônia (<i>concolor</i>)	6	5	0.93 ± 0.12	7.7 ± 3.95 X 10 ⁻³
Tapajós (<i>ridgwayi A</i>)	7	7	1.0 ± 0.076	2.7 ± 0.43 X 10 ⁻³
Xingú (<i>ridgwayi B</i>)	5	5	1.0 ± 0.12	1.4 ± 0.32 X 10 ⁻³
Belém (<i>medius</i>)	2	2	1.0 ± 0.50	3.4 ± 1.70 X 10 ⁻³

N: número de indivíduos; Ha: número de haplótipos

A AMOVA mostrou que a maior parte da variação genética entre as populações / táxons de *D. certhia* é estruturada em margens opostas de vários dos principais rios Amazônicos e não dentro dos interflúvios (Tabela 3). Contudo, esta análise só obteve valores significativos para populações separadas por dois tributários testados: Madeira e Xingu, os quais separam *juruanus* / *concolor* ($p = 0.00040$) e *ridgwayi* -A / *ridgwayi* -B ($p = 0.00089$), respectivamente, em suas margens opostas (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) entre populações reciprocamente monofiléticas de *D. certhia* separadas por alguns dos principais rios da Amazônia.

Grupo	N	Hipótese de Barreira (rio)	Entre populações de margens opostas do Rio (%)	Dentro das populações (%)
<i>certhia</i> / <i>radiolatus</i> (Guiana-Imeri/Napo)	9/3	Negro	87.4	12.5
<i>radiolatus</i> / <i>juruanus</i> (Imeri/Napo-Inambari)	3/10	Solimões	78.3	21.6
<i>juruanus</i> / <i>concolor</i> (Inambari-Rondônia)	10/5	Madeira	78.8*	21.1*
<i>concolor</i> / <i>ridgwayi</i> -A (Rondônia-Tapajós)	5/7	Tapajós	87.5	12.4
<i>ridgwayi</i> -A / <i>ridgwayi</i> -B (Tapajós/Xingu)	7/5	Xingu	76.6*	23.3*
<i>ridgwayi</i> -B / <i>medius</i> (Xingu/Belém)	5/2	Tocantins	67.3	32.7

* $p < 0.001$; N: número de indivíduos nas duas populações situadas em margens opostas

3.3.1.3 Rede de Haplótipos

A rede de haplótipos mitocondriais obtida para *D. certhia* pelo método *Median Joining* resultou em sete linhagens congruentes com as análises filogenéticas (Figura 5), confirmando assim a monofilia recíproca e divergência significativa entre as sete linhagens principais da espécie.

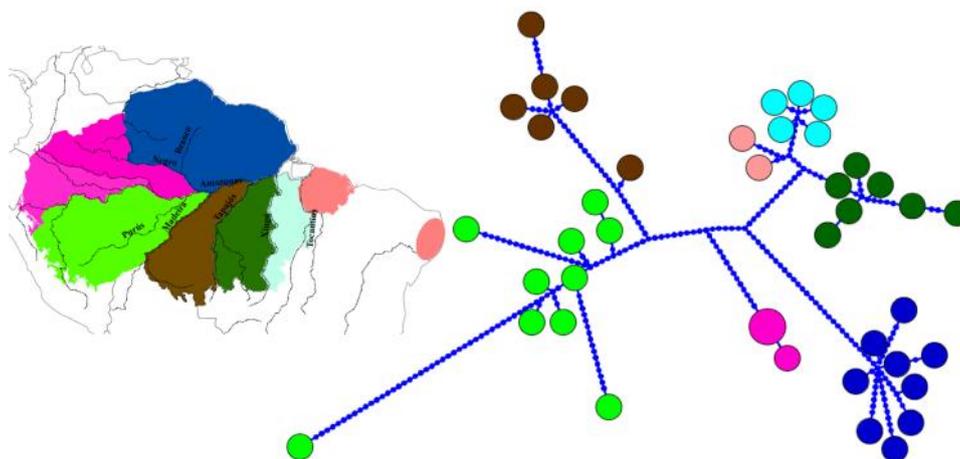


Figura 5. Rede e distribuição geográfica de haplótipos mitocondriais (2061) pb de *cyt b* e ND2 obtida para *D. certhia* pelo método *Median Joining* mostrando as relações e diferenciação entre as principais populações de *D. certhia*. Tamanhos dos círculos são proporcionais à frequência de ocorrência dos haplótipos. População da área de endemismo Inambari (*juruanus*) - Verde; Imeri (*radiolatus*) - Rosa Pink; Rondônia (*concolor*) - Marrom; Guiana (*certhia*) - Azul escuro; Tapajós (*ridgwayi* A) - Verde Musgo; Xingu (*ridgwayi* B) - Azul claro; Belém (*medius*) - Rosa.

3.3.2 Loci nucleares (bf5, G3PDH e MUSK, 1601pb)

3.3.2.1 Diversidades no banco de DNA nuclear

Em -f 5 foram observados 20 haplótipos com 20 sítios variáveis (16 informativos para parcimônia e 4 singletons). Em G3PDH foram observados 34 haplótipos com 24 sítios variáveis (8 informativos para parcimônia e 16 singletons). Por fim, foram observados 38 haplótipos em MUSK com 25 sítios variáveis (5 informativos para parcimônia e 20 singletons).

Populações de *D. certhia* ocorrendo nas áreas de endemismo Rondônia, Belém e Guianas tiveram índices de diversidade nucleotídica maiores, para pelo menos um dos marcadores nucleares, em comparação com as populações distribuídas nas áreas Imeri e Napo (*radiolatus*), Inambari (*juruanus*), Tapajós (*ridgwayi* – A) e Xingu (*ridgwayi* – B),

o mesmo acontecendo com estas duas últimas populações quando apenas os dados mitocondriais foram considerados.

Tabela 4. Diversidades haplotípica e nucleotídica para populações monofiléticas de *D. certhia* a partir de 1601 pb de três loci nucleares (Bf5, G3PDH, e MUSK).

Area de endemismo (táxon)/locus	N	Ha	Diversidade haplotípica	Diversidade Nucleotídica
Guianas (<i>certhia</i>)				
-f 5	17	5	0.64 ± 0.11	1.3 ± 0.33 X 10 ⁻³
G3PDH	21	14	0.93 ± 0.04	5.8 ± 0.87 X 10 ⁻³
MUSK	16	10	0.82 ± 0.09	2.23 ± 0.47 X 10 ⁻³
Imeri e Napo (<i>radiolatus</i>)				
-f 5	< 5	-	-	-
G3PDH	6	4	0.80 ± 0.17	3.0 ± 1.0 X 10 ⁻³
MUSK	6	5	0.93 ± 0.12	2.0 ± 0.4 X 10 ⁻³
Inambari(<i>jurua nus</i>)				
-f 5	15	6	0.57 ± 0.14	3.2 ± 0.92 X 10 ⁻³
G3PDH	18	9	0.83 ± 0.07	3.9 ± 0.76 X 10 ⁻³
MUSK	10	7	0.86 ± 0.10	3.1 ± 0.80 X 10 ⁻³
Rondônia(<i>concolor</i>)				
-f 5	11	6	0.83 ± 0.08	4.4 ± 0.55 X 10 ⁻³
G3PDH	18	9	0.83 ± 0.07	3.9 ± 0.76 X 10 ⁻³
MUSK	6	4	0.83 ± 0.17	2.1 ± 0.72 X 10 ⁻³
Tapajós (<i>ridgwayi A</i>)				
-f 5	18	6	0.68 ± 0.10	4.2 ± 1.80 X 10 ⁻³
G3PDH	21	10	0.82 ± 0.06	3.0 ± 0.40 X 10 ⁻³
MUSK	12	8	0.93 ± 0.04	3.8 ± 0.70 X 10 ⁻³
Xingú (<i>ridgwayi B</i>)				
-f 5	11	3	0.47 ± 0.16	0.9 ± 0.35 X 10 ⁻³
G3PDH	14	7	0.69 ± 0.13	3.3 ± 0.88 X 10 ⁻³
MUSK	9	8	0.97 ± 0.06	3.1 ± 0.46 X 10 ⁻³
Belém (<i>medius</i>)				
-f 5	6	4	0.86 ± 0.12	7.1 ± 2.62 X 10 ⁻³
G3PDH	7	3	0.60 ± 0.12	2.7 ± 0.59 X 10 ⁻³
MUSK	6	2	0.33 ± 0.21	0.5 ± 0.36 X 10 ⁻³

N: número de indivíduos; Ha: número de haplótipos *Valores significativos.

3.3.2.2 Rede de Haplótipos

As redes de haplótipos obtidas com os marcadores nucleares BF5, G3PDH e MUSK (Figura 6) diferiram bastante entre si e com relação àquela com base apenas no DNA mitocondrial (Figura 5). Essa incongruência entre dados mitocondriais e nucleares observada nas redes de haplótipos é confirmada por topologias discordantes obtidas separadamente pelo critério de inferência Bayesiana para os diferentes genes sequenciados (dados não apresentados). Por isso, diferentemente da rede de haplótipos obtida apenas com mtDNA, as redes dos marcadores nucleares não apresentaram estruturação populacional, possivelmente indicando um forte grau de polimorfismo ancestral atuando nesses marcadores.

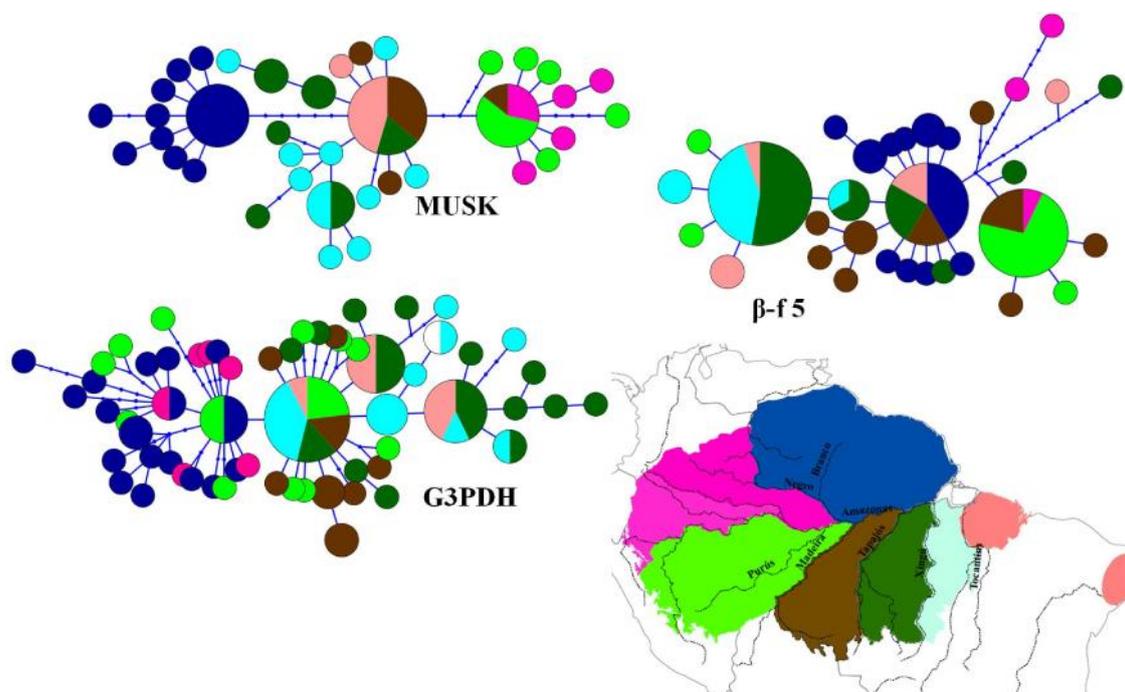


Figura 6. Rede e distribuição geográfica de haplótipos nucleares (β -f 5 – A, G3PDH – B, e MUSK – C) obtida para *D. certhia* pelo método *Median Joining* mostrando as relações e diferenciação entre as principais populações de *D. certhia*. Tamanhos dos círculos são proporcionais a frequência de ocorrência dos haplótipos. População da área de endemismo Inambari (*juruanus*) - Verde; Imeri (*radiolatus*) - Rosa Pink; Rondônia (*concolor*) - Marrom; Guiana (*certhia*) - Azul escuro; Tapajós (*ridgwayi* A) - Verde Musgo; Xingu (*ridgwayi* B) - Azul claro; Belém (*medius*) - Rosa.

4. Discussão

4.1 Implicações taxonômicas para a espécie politípica *D. certhia*

Segundo as últimas revisões feitas a partir da variação geográfica de padrões de plumagem no gênero *Dendrocolaptes*, seis subespécies são reconhecidas como válidas para *D. certhia*: *certhia*, *radiolatus*, *polyzonus*, *juruanus*, *concolor* e *medius*, sendo uma sétima subespécie (*ridgwayi*) considerada como uma linhagem híbrida entre as subespécies *concolor* e *medius* (Marantz, 1997; Marantz & Patten, 2010). Os dados moleculares apresentados aqui sugerem alterações na taxonomia de *Dendrocolaptes certhia* em relação aos arranjos propostos por Zimmer (1934), Marantz (1997) e Marantz & Patten (2010) e seguidos até hoje (Rensen et al., 2012).

Os dados filogenéticos e de genética populacional confirmam a existência de sete unidades evolutivas independentes em *D. certhia*, todas já tendo adquirido monofilia recíproca apoiadas por altas probabilidades posteriores com base nos dados mitocondriais e nucleares. Infelizmente, por falta de amostras, o grau de diferenciação genética de *polyzonus*, táxon do sudeste do Peru e norte da Bolívia tido como válido com base em caracteres de plumagem (Marantz & Patten, 2010), não pode ser averiguado. Uma análise quantitativa com base em caracteres de plumagem concluiu que este táxon (conhecido de apenas poucos espécimes), embora morfologicamente distinto, é mais parecido com *juruanus* (Inambari), o que faz sentido geográfico pelo fato de ambos terem distribuição contígua e possivelmente entrarem em contato direto e mesmo sofrerem intergradação no sudoeste da Amazônia (Marantz, 1997). De modo similar, a falta de tecidos impediu que verificássemos a hipótese, apoiada pelo tratamento taxonômico vigente, de que as populações de *D. certhia* da Mata Atlântica e aquelas Amazônicas da área de endemismo Belém, façam parte de um mesmo táxon (*medius*), implicando pouca ou nenhuma diferenciação genética entre elas (Marantz et al., 2003). Devido a estes fatos, acreditamos que a eventual inclusão de amostras de *polyzonus* e das populações de *medius* da Mata Atlântica, não implicaria em mudanças significativas nas filogenias e no padrão geral de estruturação genética documentados neste trabalho para as populações de *D. certhia*.

Por outro lado, os dados genéticos *multilocus* mostraram que o táxon *ridgwayi*, tido originalmente como a população habitante dos interflúvios Tapajós – Xingu e Xingu-Tocantins (Peters, 1951), não se trata de uma forma híbrida oriunda da intergradação entre *concolor* (Rondônia) e *medius* (Belém e nordeste Brasileiro), conforme postulado

por Marantz (1997), Marantz e colaboradores (2003), e Marantz e Patten (2010). Ao contrário, tanto *concolor* quanto *medius* constituem clados reciprocamente monofiléticos bem apoiados estatisticamente, o mesmo acontecendo com *ridgwayi*, que na verdade constitui um táxon parafilético de acordo com as estimativas filogenéticas Bayesianas (Figura 2). Nenhuma evidência de fluxo gênico foi encontrada entre os dois clados distintos agrupados sob o nome *ridgwayi* (ocorrendo, respectivamente, nas áreas de endemismo Tapajós e Xingu) de acordo com a taxonomia atual com base nos dados mitocondriais (Figuras 2A e 5). De modo similar, a probabilidade posterior apoiando a separação destes clados em linhagens reciprocamente monofiléticas com base na análise coalescente *multilocus* (ST) foi bem próxima do limiar para ser considerada estatisticamente significativa (0.9; Figura 3). Desse modo, o nome *ridgwayi* só pode ser aplicado a um destes clados, i.e., aquele referente às populações da área de endemismo Tapajós, onde se situa a sua localidade tipo (Santarém; Hellmayr, 1905), deixando o clado da área de endemismo Xingu sem nome. As diferenças bastante sutis e gradativas nos padrões de plumagem de *concolor*, *ridgwayi* e *medius* levaram os autores que trabalharam apenas com esse tipo de caráter a favorecer uma hipótese de variação clinal entre esses táxons ao invés daquela de populações / espécies crípticas isoladas geneticamente e distinguidas uma das outras apenas por um conjunto sutil e reduzido de caracteres (Willis, 1992; Marantz, 1997; Marantz et al., 2003; Marantz e Patten, 2010). Em uma publicação separada, com base em um grande número de espécimes, mostramos que *concolor*, *ridgwayi*, *medius* e o novo táxon da área de endemismo Xingu (que é descrito) são todos também consistentemente diagnosticados entre si por um pequeno conjunto de caracteres de plumagem (Batista e Aleixo, in prep.).

Outro táxon associado à espécie politípica *D. certhia* com um histórico de tratamentos taxonômicos conflitantes é *concolor*, que já foi inclusive tratado como espécie independente (Peters, 1951), sendo posteriormente reunido à espécie politípica *D. certhia* com base uma suposta intergradação com *ridgwayi* e *medius* (Marantz, 1997; Marantz et al., 2003; Marantz e Patten, 2010). Contudo, as análises filogenéticas e genético-populacionais aqui apresentadas mostraram que o taxon *concolor* de fato representa uma linhagem evolutivamente independente e que deve ser tratada como espécie distinta com base em sua monofilia recíproca, assim como outras seis destas linhagens em *D. certhia*, que possuem o mesmo grau de separação evolutiva e distinção genética (Figuras 2, 3 e 5).

Em conclusão, propomos com base nos resultados obtidos neste estudo um novo tratamento taxonômico, que reconhece sete espécies diagnosticáveis por dados moleculares e caracteres de plumagem ao invés de uma única espécie politípica reunindo todos os táxons de *D. certhia* (Marantz e Patten, 2010; Batista e Aleixo, in prep): *Dendrocolaptes certhia* (área de endemismo Guiana), *Dendrocolaptes radiolatus* (áreas de endemismo Imeri e Napo), *Dendrocolaptes juruanus* (área de endemismo Inambari, incluindo tentativamente o táxon *polyzonus*), *Dendrocolaptes concolor* (área de endemismo Rondônia), *Dendrocolaptes ridgwayi* (área de endemismo Tapajós), um táxon ainda sem nome (área de endemismo Xingu) e *Dendrocolaptes medius* (área de endemismo Belém e, tentativamente, Mata Atlântica). O fato dos dados moleculares terem atestado a monofilia recíproca entre estes táxons / clados com altos valores de probabilidade posterior, indica que eles podem ser considerados tanto espécies filogenéticas (Cracraft, 1983), quanto evolutivas (de Queiroz, 1998) ou mesmo biológicas (Mayr, 1982).

4.2 Diversificação de *D.certhia* na Amazônia

O tempo de divergência calculado entre as diferentes linhagens de *D. certhia* através da análise de relógio molecular, com a calibração para o gene *cyt b* de 2.1%, estima que a separação em relação ao seu grupo irmão (*D. sanctithomae*) ocorreu a aproximadamente 3.69 Ma, enquanto a estimativa baseada numa abordagem coalescente (ST) estimou para esse mesmo evento uma data mais recente (1.41 Ma). Quando comparadas com as datas estimadas por Derryberry et al. (2011) para esse mesmo evento de cladogênese com base numa análise Bayesiana de um conjunto de dados *multilocus*, observa-se uma congruência entre a datação estimada pela análise de relógio molecular realizada no presente trabalho com a estimativa feita por Derryberry et al. (2011) – ver Informação suplementar (Fig S1 – versão online doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01374.x).

Linhagens atualmente separadas pelos Andes podem ter históricos bastante diferentes, existindo dois extremos principais: aquelas que se dispersaram em tempos relativamente recentes (Pleistoceno tardio) entre essas áreas e aquelas que divergiram por vicariância desde o Plioceno durante os eventos de soerguimento dos Andes e formação do istmo do Panamá (entre 2 e 5 milhões de anos; Garzzone et al., 2008) e/ou máximas glaciais do Terciário tardio (ca. 2,6 milhões de anos; Haffer 1997), que podem ter isolado formações florestais nos dois lados dos Andes (Patané et al., 2009). O conjunto de datas

estimadas independentemente nesse estudo e naquele de Derryberry e colaboradores (2011) apóiam uma divergência Plio-Pleistocência entre as linhagens de *D. certhia* e *D. sanctithomae* num contexto de vicariância por eventos geotectônicos e/ou climáticos.

Posteriormente, num período centrado no Pleistoceno entre c.a 2.0 – 0.3 Ma (cronograma Bayesiano) ou 0.64 – 0.05 Ma (cronograma coalescente), se observa o processo de diversificação das linhagens de *D. certhia* na Amazônia. Uma vez que os limites de distribuição de todas as sete principais linhagens de *D. certhia* identificadas nesse estudo são totalmente coincidentes com o curso do rio Amazonas-Solimões e seus principais tributários, o tempo de separação entre as linhagens podem ser inferidos como o tempo onde esses rios se formaram ou, minimamente, passaram a atuar como barreiras vicariantes (ver Ribas et al., 2012).

A filogeografia da espécie polítípica *D. certhia* é o segundo estudo de caso conhecido que envolve linhagens distribuídas por todos os centros de endemismo da Amazônia, depois do estudo de Ribas e colaboradores (2012), com o qual é contrastado aqui. Em *D. certhia*, o primeiro evento de separação ocorreu entre linhagens hoje delimitadas pelo rio Negro (*certhia* a leste e todas as demais a oeste e sul do Solimões-Amazonas), tendo sido datado de 1.51 (0.82 – 3.14) Ma (cronograma Bayesiano) ou 0.64 (0.33 – 0.94) Ma (cronograma coalescente). O intervalo de confiança destas estimativas se sobrepõe com aquela estimada para o estabelecimento do rio Negro como barreira vicariante para populações do gênero Amazônico endêmico *Psophia* (0.7 – 1 Ma), também associado a florestas de terra-firme e com a distribuição de suas diferentes linhagens delimitadas pelos grandes rios da bacia (Ribas et al., 2012). O segundo evento de cladogênese em *D. certhia* foi aquele entre populações atualmente separadas pelo rio Solimões (*radiolatus* e todas as demais distribuídas ao sul do Solimões-Amazonas) e datado de 1.2 (0.67 – 2.5) Ma (cronograma Bayesiano) ou 0.5 (0.29 – 0.74) Ma (cronograma coalescente). Em *Psophia*, não há um evento espacialmente análogo cuja idade estimada possa ser contrastada, já que as populações nesse gênero separadas atualmente pelo rio Solimões não fazem parte do mesmo clado (Ribas et al., 2012), ao contrário do que ocorre com *D. certhia*. No entanto, o primeiro evento de separação das populações de *Psophia* distribuídas nos centros de endemismo Napo / Imeri (compartilhando a mesma distribuição de *radiolatus*) é estimado em 0.87 Ma (0.58 – 1.19 Ma; análise Bayesiana com calibração de 2% para cada milhão de anos; Ribas et al., 2012), também sobrepondo-se com os intervalos de confiança da data estimada do isolamento de *radiolatus*. O terceiro evento principal de cladogênese envolvendo

linhagens de *D. certhia* diferiu um pouco entre as estimativas Bayesiana e coalescente (Figura 4), já que o posicionamento filogenético de *juruanus* (área de endemismo Inambari) foi distinto em cada estimativa, refletindo uma baixa probabilidade posterior para os nós relacionando este táxon nas árvores Bayesiana mitocondrial e de espécies (Figuras 2A e 3). No entanto, a estimativa de separação Bayesiana (0.92 Ma; intervalo de confiança entre 0.48 e 1.61 Ma) de *juruanus*, se sobrepõe grandemente com aquela da separação da população de *Psophia* endêmica da área de endemismo Inambari (*leucoptera*; 1.62 Ma; intervalo de confiança entre 1.14 e 2.11 Ma; Ribas et al. 2012). O mesmo acontece (considerando-se a estimativa Bayesiana com calibração de 2% para cada milhão de anos; Ribas et al. 2012) com todos os demais eventos de cladogênese envolvendo, respectivamente, as linhagens de *D. certhia* e *Psophia* separadas pelos grandes tributários do escudo brasileiro: Tapajós (0.44 – 1.44 contra 0.58 – 1.24), Xingu (0.17 – 0.8 contra 0.16 – 0.58) e Tocantins (0.1 – 0.55 contra 0.25 – 0.80).

Não é possível, portanto, falsificar a hipótese de que os eventos vicariantes pela separação entre as linhagens de *D. certhia* e *Psophia* na Amazônia foram os mesmos, tanto espacialmente, quanto temporalmente. Embora não haja uma congruência total entre as filogeografias de *D. certhia* e *Psophia* no que tange às relações entre as populações das diferentes áreas de endemismo, a impossibilidade de falsificar a ocorrência de sete eventos de cladogênese simultâneos envolvendo estas duas linhagens filogeneticamente distantes e co-distribuídas é um forte indício de resposta a eventos vicariantes comuns. Uma explicação provável para essas incongruências topológicas envolvendo populações de diferentes áreas de endemismo em diferentes linhagens pode estar relacionada à estimativas inconsistentes de topologias de nós curtos, relacionados a eventos de cladogênese relativamente rápidos e sucessivos (McCormack et al., 2010), como parece ser o caso tanto de *D. certhia* quanto *Psophia*. Corroborando essa idéia, um mesmo conjunto de dados para uma única linhagem pode embasar árvores filogenéticas com topologias bem distintas, dependendo dos genes e métodos de inferência filogenéticos, como é o caso de *D. certhia* (Figuras 2, 3 e 4).

Um exemplo bem claro envolve as linhagens separadas pelo rio Xingu (*ridgwayi* – A e *ridgwayi* – B), que na filogeografia Bayesiana mitocondrial aparecem como parafiléticas com um alto apoio estatístico (Figura 2A), enquanto a filogeografia coalescente (ST) as coloca como linhagens irmãs e reciprocamente monofiléticas com uma alta probabilidade posterior muito próxima da significância (0.9). Em tese, árvores coalescentes levam em consideração a estocasticidade no processo de coalescência, neste

sentido um mesmo histórico populacional pode gerar diferentes padrões genealógicos em loci diferentes. Isto pôde ser constatado nas diferentes árvores de gene geradas (dados não apresentados) para a espécie politépica *D. certhia*. De forma alternativa, segundo Spellman e Klicka (2006) uma única árvore de gene pode ser consistente com muitos históricos populacionais. Entretanto, todas as árvores de gene compartilham alguma dependência através de uma árvore de espécie comum (Liu e Pearl 2007), tornando este tipo de árvore (árvores de espécies) mais confiável. Desta maneira cada vez mais tem se utilizado a abordagem coalescente para a compreensão de questões biogeográficas (Brumfield et al., 2008), e o aumento do uso de árvores de espécies pode elucidar este tipo de questões na Amazônia, resolvendo aparentes conflitos.

No que diz respeito à hipótese dos refúgios, esta assume que mudanças climáticas reduziram as florestas tropicais úmidas em “refúgios” isolados e que este isolamento promoveu a especiação. Muitos destes eventos são discutidos como ocorrendo nos ciclos climáticos do Pleistoceno. Contudo é indiscutível que o desenvolvimento e mudanças na drenagem dos rios na Amazônia influenciaram de maneira decisiva a diversificação da flora e fauna nesta região. E esta influência pode ser verificada com padrões de distribuição pertinentes nas áreas de endemismos para a Amazônia, como observado na espécie politépica *D. certhia*. Assim combinando esta hipótese com a resposta dos rios como barreira ao fluxo gênico se torna mais consistente do que aquelas que levam em consideração apenas os eventos de cladogênese que ocorreram no Pleistoceno, particularmente porque, ao contrário dos rios, a hipótese dos refúgios não vem com qualquer previsão de distribuição espacial a ser testada, contudo não devem deixar de ser levadas em consideração.

REFERÊNCIAS

Aleixo, A., 2002. Molecular systematics and the role of the “várzea”-“terra-firme” ecotone in the diversification of *Xiphorhynchus* woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Auk*.119, 621– 640.

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.

Barrett, J. C.; Fry, B.; Maller, J.; Daly, M. J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. [PubMed ID: 15297300].

Bates, J. M.; Haffer, J.; Grismer, E., 2004. Avian mitochondrial DNA sequence divergence across a headwater stream of the Rio Tapajós, a major Amazonian river. *Journal fuer Ornithologie*. 145, 199–205.

Bierregaard, JR. R. O.; Cohn-Haft, M.; Stotz, D. F., 1997. Cryptic biodiversity: an overlooked species and new subspecies of antbird (Formicariidae) with revision of *Cecomacra tyrannina* in northwestern South America. *Ornithological Monography*. 48, 111–128.

Brandley, M. C.; Schmitz, A.; Reeder, T. W., 2005. Partitioned Bayesian Analyses, Partition Choice, and the Phylogenetic Relationships of Scincid Lizards. *Systematic Biology*. 54(3), 373–390.

Brumfield, R. T.; Liu, L.; Lum, D. E.; Edwards, S. V., 2008. Comparison of Species Tree Methods for Reconstructing the Phylogeny of Bearded Manakins (Aves: Pipridae, Manacus) from Multilocus Sequence Data. *Systematics Biology*. 57(5),719–731.

Carling, M.D.; Brumfield, R.T., 2008. Integrating phylogenetic and population genetic analyses of multiple loci to test species divergence hypotheses in Passerina buntings. *Genetics*. 178, 363–377.

Clark, W.S.; Witt, C. C., 2006. First known specimen of a hybrid Buteo: Swainson's Hawk (*Buteo swainsoni*) Rough-legged Hawk (*B. Lagopus*) from Louisiana. *Wilson Journal Ornithology*. 118, 42–52.

Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*. 1, 159–187.

De Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In:

Derryberry, E. P.; Aleixo, A.; Claramunt, S.; Perez-Eman, J.; Derryberry, G.; Remsen, J. V. Jr.; Terry Chesser, R., Brumfield, R. T.; Cracraft, J., 2011. Lineage diversification and morphological evolution in a large-scale Continental Radiation: The Neotropical Ovenbirds and Woodcreepers (Aves: Furnariidae). *Evolution*. 65–10, 2973–2986.

Drummond, A. J.; Ho, S.Y.W.; Rawlence, N.; Rambaut, A., 2007. A Rough Guide to BEAST 1.4. University of Auckland, New Zealand.

Excoffier, L. G. Laval, Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:4750.

Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restrictions data. *Genetics*. 131, 479 – 491.

Fjeldsa°, J.; Zuccon, D.; Irestedt, M.; Johansson, U. S.; Ericson, P. G. P., 2003. *Sapayoa aenigma*: a New World representative of 'Old World suboscines'. *Proc. R. Soc. Lond. B. (Suppl.)* 270, 238 – 241.

Fuchs, J.; Bowiec, R. C. K.; Fjeldså, J.; Pasqueta, E., 2004. Phylogenetic relationships of the African bush-shrikes and helmet-shrikes (Passeriformes: Malaconotidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33, 428–439.

Garziona, C. N., Hoke, G. D.; Libarkin, J. C.; Withers, S.; MacFadden, B.; Eiler, J.; Ghosh, P.; Mulch, A., 2008. Rise of the Andes. *Science* 320,1304-1307.

Gascon, C., Malcolm, J. R., Patton, J. L., da Silva, M. N. F., Bogart, J.P., Loughreed, S.C., Peres, C., Neckel, S. & Boag, P., 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97, 13672 – 13677.

Hackett, S. J., 1996 Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5, 368–382.

Haffer, J., 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*. 165, 131–137.

Haffer, J., 1974. Avian speciation in tropical America. Cambridge, UK: Nuttall Ornithological Club.

Haffer, J., 1992. On the “River Effect” in Some Forest Birds of Southern Amazonia. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Série Zoológica* 8: 217–245.

Haffer, J., 1997. Alternative Models of Vertebrate Speciation in Amazonia: An Overview. *Biodiversity and Conservation*. 6, 451 – 477.

Haffer, J., 2001. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. In *Amazonian cultural and biological diversity*, (eds. I. Vieira, M.A. D'Incão, J.M.C. Silva, D. Oren) pp. 45 – 118. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95 – 98.

Heled, J.; Drummond, A. J., 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*. 27, 570 – 580.

Huelsenbeck, J.P., e Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*.17, 754 – 755.

Isler, M. L.; Isler, P. R.; Whitney, B. M.; Zimmer, K. J., 2007a. Species limits in the “*Schistocichla*” complex of *Percnostola* antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae). *The Wilson Journal of Ornithology* 119(1), 53 – 70.

Isler, M. L.; Isler, P. R.; Whitney, B. M., 2007b. Species limits in antbirds (Thamnophilidae): the warbling antbird (*Hypocnemis cantator*) complex. *The Auk* 124(1), 11 – 28.

Isler, M. L. e Whitney, B. M., 2011. Species Limits in Antbirds (Thamnophilidae): The Scale-Backed Antbird (*Willisornis poecilinotus*) Complex. *The Wilson Journal of Ornithology*, 123(1), 1– 14.

Krabbe, N. K., Isler, M. L., Isler, P. L., Whitney, B. M., Alvarez, J. A., Greenfield, P. J., 1999. A new species in the *Myrmotherula haematonota* superspecies (aves; Thamnophilidae) from the western Amazonian lowlands of Ecuador and Peru. *The Wilson Bulletin*, 111(2), 157-165.

Librado, P; Rozas, J., 2009 DNASP v.5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451 – 1452.

Liu, L.; Pearl, D., 2007. Species Tree from Gene Trees: Reconstructing Bayesian Posterior Distribution of Species Phylogeny Using Estimated Gene Tree Distributions. *Systematic Biology*. 56, 504–514.

Liu, L.; Pearl, D. K.; Brumfield, R. T.; Edwards, S. V., 2008. Estimating species trees using multiple-allele DNA sequence data. *Evolution*. 62, 2080 – 2091.

Marantz, C., 1997. Geographic variation of plumage patterns in the woodcreeper genus *Dendrocolaptes* (Dendrocolaptidae). *Ornithological Monographs*. 48, 399 – 429.

Marantz, C. A.; Aleixo, A.; Bevier, L. R.; Patten, M. A., 2003. Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). In: del Hoyo, J.; Elliott, A.; Christie, D.A. (ed.), *Handbook of birds of the world*, pp. 358-447. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

Marantz, C. e Patten, M. A., 2010. Quantifying subspecies analyzes: a case study of morphometric variation and subspecies in the woodcreeper genus *Dendrocolaptes*. *Ornithological Monographs*. 67, 123 – 140.

Marini, M. A., Hackett, S. J. 2002. A Multifaceted Approach to the characterization of an Intergeneric Hybrid Manakin (Pipridae) from Brazil. *The Auk*. 119(4), 1114-1120.

Marschal, D.C., 2010. Cryptic Failure of Partitioned Bayesian Phylogenetic Analyses: Lost in the Land of Long Trees. *Systematic Biology*. 59(1), 108 – 117.

Mayr, E., 1982. *The growth of biological thought: diversity, evolution, and inheritance*. Cambridge: Harvard University Press.

McCormack, J. E.; Heled, J.; Delaney, K. S.; Peterson, A. T.; Knowles, L., 2010. Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma* jays. *Evolution*. 65,184 – 202.

Nylander J.A.A., Ronquist F., Huelsenbeck J.P., Nieves-Aldrey J.L., 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*. 53, 47 – 67.

Patané, J. S. L.; Weckstein, J. D.; Aleixo, A.; Bates, J. M., 2009. Evolutionary history of *Ramphastos* toucans: Molecular phylogenetics, temporal diversification, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53, 923–934.

Peters, J. L., 1951. *Check-List of Birds of the World*. Massachusetts (U.S.A): Cambridge Museum of Comparative Zoology.

Remsen, J. V.; Cadena, Jr., C. D.; Jaramillo, A.; Nores, M.; Pacheco, J. F.; Pérez-Emán, J. ; Robbins, M. B.; Stiles, F. G.; Stotz, D. F.; Zimmer, K. J., 2012. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>

Ribas, C. C.; Aleixo, A.; Nogueira, A. C. R.; Miyaki, C. Y.; Cracraft, J., 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*. 279 (1729), 681–689.

Ronquist, F., E Huelsenbeck, J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference Under Mixed Models. *Bioinformatics*. 19, 1572 – 1574.

Silva, J. M. C., Rylands, A. B.; Da Fonseca, G. A. B., 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*. 19 (3), 689 – 694.

Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimchev, D. E., Yuri, T., Mindell, D. P., 1999. Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12, 105–114.

Spellman, G. M.; Klicka, J., 2006. Testing hypotheses of Pleistocene population history using coalescent simulations: phylogeography of the pygmy nuthatch (*Sitta pygmaea*). *Proceedings of the Royal Society Biology*. 273, 3057–3063.

Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. 2001. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *The American Journal of Human Genetics*. 68, 978–989.

Stephens, M., Donnelly, P. 2003. A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. *The American Journal of Human Genetics*. 73,1162–1169.

Stephens, M.; Scheet, P., 2005. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *The American Journal of Human Genetics*. 76, 449 – 462.

Vanzolini, P. E; Willians, E. E., 1970. *Zoologia sistemática, geografia e a origem das espécies*. São Paulo, Instituto Geográfico de São Paulo, 56p. (Série teses e monografias, 3).

Weir, J. T.; Schluter, D., 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*. 17, 2321 – 2328.

Whitney, B. M.; Oren, D. C.; Brumfield, R. T., 2004. A new species of *Thamnophilus antshrike* (Aves: Thamnophilidae) from the serra do Divisor, Acre, Brazil. *The Auk*. 121, 1031 – 1039.

Willis, E. O., 1992. Comportamento e ecologia do arapaçu-barrado *Dendrocolaptes certhia* (Aves: Dendrocolaptidae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*. Belém. 8 (1), 151– 216.

Zimmer, J. T., 1934. Studies on Peruvian birds No. 14. Notes on the genera *Dendrocolaptes*, *Hylexetastes*, *Xiphocolaptes*, *Dendroplex*, and *Lepidocolaptes*. *American Museum Novitates* 753.

Zimmer, K. J., 2002. Species limits in Olive-blacked foliage-gleaners (*Automolus*: Furnariidae). *Wilson Bulletin*. 114 (1), 20 – 37.

Apendice A – Lista de indivíduos utilizados e suas respectivas localidades de coleta

N	Subespécie/ Populações/ GE*	Origem ^a	Tombo no.	Localidade
1	<i>certhia</i>	MPEG	56524	Brasil, RR: Mun. Alto Alegre - Faz. Paraense (02°41'N; 61°16'W)
2	<i>certhia</i>	MPEG	66456	Brasil, PA: Almeirim, FLOTA do Paru (00°56'S; 53°14'W)
3	<i>certhia</i>	MPEG	66460	Brasil, PA: Almeirim, FLOTA do Paru (00°56'S; 53°14'W)
4	<i>certhia</i>	MPEG	66637	Brasil, PA: Óbidos, ESEC Grão-Pará (00°37'50''N; 55°43'4''W)
5	<i>certhia</i>	MPEG	65027	Brasil, PA: Óbidos, Flota do Trombetas (c.a. 00°57'S; 55°31'W)
6	<i>certhia</i>	MPEG	65836	Brasil, PA: Oriximiná, ESEC Grão Pará (01°17'N; 58°41'W)
7	<i>certhia</i>	MPEG	66216	Brasil, PA: Almeirim, REBIO Maicuru (00°49'N; 53°55'W)
8	<i>certhia</i>	MPEG	66899	Brasil, AM: Urucará, linhão Tucuruí-Manaus (02°23'41,8''S; 57°38'04,2''W)
9	<i>certhia</i>	MPEG	69820	Brasil, AM: Itacoatiara, Urucará, Lago Marajatuba (02°23'14,5''S; 57°38'26,7''W)
10	<i>certhia</i>	MZUSP	82412	Brasil, AP: Comunidade Vila Nova, Macapá (00°02'21''N; 51°03'58''W)
11	<i>concolor</i>	MPEG	61624	Brasil, PA: Juruti, ALCOA, Platô Capiroanga, trilha 196 (03°40'59''S; 56°34'0.12''W)
12	<i>concolor</i>	MPEG	71168	Brasil, RO: Machadinho D'Oeste, margem direita Rio Jiparaná (08°54'32,9''S; 62°00'0,03''W)
13	<i>concolor</i>	MPEG	71169	Brasil, RO: Machadinho D'Oeste, margem direita Rio Jiparaná (08°54'32,9''S; 62°00'0,03''W)
14	<i>concolor</i>	MZUSP	84685	Brasil, PA: 50 km Oeste de Jacareacanga (06°13'19''S; 57°45'10''W)
15	<i>concolor</i>	MZUSP	86795	Brasil, Rio Parauari, margem direita, 4km abaixo da cachoeira do Tambor
16	<i>juruanus</i>	MPEG	58869	Brasil, AC: ESEC Rio Acre, Acampamento 2 (11°00'53.4''S, 70°13'02.7''W)
17	<i>juruanus</i>	MPEG	71170	Brasil, AC: Humaitá, margem esquerda Rio Madeira, Ipixuna (07°29'48,38''S; 63°23'41,49''W)

N	Subespécie/ Populações/ GE*	Origem ^a	Tombo no.	Localidade
18	<i>juruanus</i>	MPEG	62043	Brasil, AC: Porto Walter, Igarapé Cruzeiro do Vale, Colônia Dois Portos (08°20'35,7''S; 72°36'19,7''W)
19	<i>juruanus</i>	MPEG	62042	Brasil, AC: Porto Walter, Igarapé Cruzeiro do Vale, Colônia Dois Portos (08°20'35,7''S; 72°36'19,7''W)
20	<i>juruanus</i>	MPEG	62044	Brasil, AC: Porto Walter, Igarapé Cruzeiro do Vale, Colônia Dois Portos (08°20'35,7''S; 72°36'19,7''W)
21	<i>juruanus</i>	MPEG	64373	Brasil, AC: Senador Guiomard, Br 364 km 80, Ramal Oco do Mundo km 16 (09°50'12,2''S; 67°10'18,5''W)
22	<i>juruanus</i>	MPEG	64501	Brasil, AC: Capixaba, Br 317 km 164, Ramal da Gameleira km 04 (10°38'12,6''S; 67°48'55,8''W)
23	<i>juruanus</i>	MPEG	60586	Brasil, AC: Tarauacá, Floresta Estadual do Mogno, Br 364 km 6 Rio Tauari (05°56'38,4''S, 71°32'07,9''W)
24	<i>juruanus</i>	MPEG	60150	Brasil, RO: RDS Cujubim, ca 390 km SW Jutai (05°13'11''S; 68°19'00''W)
25	<i>juruanus</i>	MPEG	57056	Brasil, AM: Tefé, Base Petrobras/Urucu, Igarapé Lontra (04°52'S; 65°07'W)
26	<i>juruanus</i>	MPEG	57057	Brasil, AM: Tefé, Base Petrobras/Urucu, Igarapé Onça (04°52'S; 65°18'W)
27	<i>juruanus</i>	MZUSP	86200	Brasil, AM: BR 319, 50 km ao Sul de Humaitá
28	<i>medius</i>	MPEG	70139	Brasil, PA: Tomé-Açu, margem direita Rio Tocantins (02°30'52,1''S; 47°59'22,4''W)
29	<i>medius</i>	MPEG	A07881	Brasil, PA: Município de Barcarena, Reserva do hotel Samaúma
30	<i>medius</i>	MPEG	A07882	Brasil, PA: Município de Barcarena, Reserva do hotel Samaúma
31	<i>radiolatus</i>	MPEG	59394	Brasil, AM: Rio Cuiuni, margem direita, Barcelos (00°47'43''S, 63°09'53''W)
32	<i>radiolatus</i>	MPEG	59393	Brasil, AM: Rio Aracá, Barcelos (00°25'12''S, 62°56'13''W)
33	<i>radiolatus</i>	MPEG	72661	Brasil, AM: Tabatinga, margem norte Rio Solimões, Teresina (04°21'39,8''S; 69°45'39,5''W)
34	<i>radiolatus</i>	MPEG	72662	Brasil, AM: Tabatinga, margem norte Rio Solimões, Teresina (04°21'39,8''S; 69°45'39,5''W)
35	<i>radiolatus</i>	MPEG	72695	Brasil, AM: Tabatinga, margem norte Rio Solimões, Teresina (04°21'39,8''S; 69°45'39,5''W)

N	Subespécie/ Populações/ GE*	Origem^a	Tombo no.	Localidade
36	<i>ridgwayi</i>	MPEG	65554	Brasil, PA: Trairão, APA Tapajós, Área Sul, Rio Novo, margem esquerda (área 3)(6o49'59,4"S;56o07'49,3"W)
37	<i>ridgwayi</i>	MPEG	65288	Brasil, PA: Rio Xingu, margem direita, Localidade do Caracol
38	<i>ridgwayi</i>	MPEG	65968	Brasil, PA: Carajás, FLONA Tapirapé-Aquiri
39	<i>ridgwayi</i>	MPEG	70097	Brasil, PA: Marabá, Flona Tapirapé-Aquiri
40	<i>ridgwayi</i>	MPEG	69964	Brasil, PA: Marabá
41	<i>ridgwayi</i>	MPEG	69963	Brasil, PA: Marabá
42	<i>ridgwayi</i>	MPEG	70868	Brasil, PA: Itaituba, Miritituba (04°17'S; 55°55'W)
43	<i>ridgwayi</i>	MPEG	71346	Brasil, PA: Melgaço, FLONA Caxiuanã (01°44'S; 51°27'W)
44	<i>ridgwayi</i>	MPEG	67664	Brasil, PA: Placas, Assentamento Comunidade Fortaleza (03°28'33''S; 54°33'55''W)
45	<i>ridgwayi</i>	MPEG	68979	Brasil, PA: Jacareacanga, Transamazônica km 276, Rabelo (05°34'16''S; 57°18'23,1''W)
46	<i>ridgwayi</i>	MPEG	69029	Brasil, PA: Altamira, RESEX Riosinho do Anfrísio
47	<i>ridgwayi</i>	MPEG	70633	Brasil, PA: Serra dos Carajás, Área de Controle (05°46'12,5''S; 50°29'54,9''W)
48	<i>ridgwayi</i>	MPEG	70641	Brasil, PA: Serra dos Carajás, Barragem Rejeitos (05°46'12,5''S; 50°29'54,9''W)
49	<i>ridgwayi</i>	MPEG	67348	Brasil, PA: Paranaíta, Rio Teles Pires (09°25'310''S;56°33'753''W)
50	<i>ridgwayi</i>	MPEG	69381	Brasil, PA: Paranaíta, Rio Teles Pires, margem esquerda (09°24'51,4''S; 56°33'39,7''W)
51	<i>ridgwayi</i>	MPEG	69380	Brasil, PA: Paranaíta, margem direita Rio Paranaíta, Fazenda Paranaíta*
52	<i>ridgwayi</i>	MPEG	67347	Brasil, PA: Paranaíta, margem direita Rio Teles Pires, Sete Quedas (09°18'15,5''S; 56°35'31,7''W)
53	<i>ridgwayi</i>	MZUSP	82177	Brasil, PA: Fazenda Fartura, Santana do Araguaia
54	<i>ridgwayi</i>	MZUSP	87650	Brasil, PA: Linha J, margem direita do Rio Teles Pires, Jacareacanga

N	Subespécie/ Populações/ GE*	Origem	Tombo no.	Localidade
55	<i>ridgwayi</i>	MZUSP	88755	Brasil, PA: Terra Preta, Porto de Moz
56	<i>ridgwayi</i>	MZUSP	88858	Brasil, PA: Pontes e Lacerda
57	<i>Dendrocolaptes sanctithomae</i> *	FIELD	393867	México, Sierra de Santa Martha- Vera Cruz

^aAbreviações dos Museus: MPEG – Museu Paraense Emílio Goeldi; MZUSP – Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; FIELD - *Field Museum of Natural History*; *Grupo Externo.

Apêndice B – Divergência genética (distância-*p*) entre e dentro das populações que compõe a espécie politípica *D. certhia* a partir de 2061 pb de dois genes mitocondriais (*cytb* + *nd2*).

	<i>certhia</i>	<i>medius</i>	<i>radiolatus</i>	<i>juruanus</i>	<i>concolor</i>	<i>ridgwayi</i> A	<i>ridgwayi</i> B	DP*
<i>certhia</i> (Guianas)								0.3%
<i>medius</i> (Belém)	2.5%							0.3%
<i>radiolatus</i> (Imeri e Napo)	2.3%	1.9%						0.03%
<i>juruanus</i> (Inambari)	2.5%	1.6%	1.6%					0.4%
<i>concolor</i> (Rondônia)	2.7%	1.7%	1.9%	1.7%				0.1%
<i>ridgwayi</i> - A (Tapajós)	2.3%	0.7%	1.9%	1.7%	1.8%			0.2%
<i>ridgwayi</i> - B (Xingu)	2.5%	0.6%	2.1%	1.7%	1.7%	0.9%		0.1%
**GE (<i>D. sanctithomae</i>)	5.5%	5.9%	5.5%	5.4%	5.8%	5.8%	5.9%	

*DP: Distância-*p* dentro de cada população. **GE: Grupo Externo