



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

**Sistemática Molecular e Filogeografia do gênero *Phoenicircus* Swainson,
1832 (Aves: Cotingidae)**

DENISE MENDES MARTINS

BELÉM - PARÁ
2012

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

**Sistemática Molecular e Filogeografia do gênero *Phoenicircus* Swainson,
1832 (Aves: Cotingidae)**

DENISE MENDES MARTINS

**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: Alexandre Aleixo

DENISE MENDES MARTINS

**Sistemática Molecular e Filogeografia do gênero *Phoenicircus* Swainson, 1832 (Aves:
Cotingidae)**

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

Prof. Dr. Marcelo Vallinoto (UFPA – Campus Bragança)

Profa. Dra. Camila Ribas (INPA)

Prof. Dr. Fábio Raposo do Amaral (USP)

Prof. Dr. Sandro Bonatto (PUC-RS)

Prof. Dr. Luís Fábio Silveira (MZUSP)

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.

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 Dorotéa 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, Romina Batista, Shirliane Araujo, Luciano dos Anjos, Sidnei Dantas, Maya Faccio, Elinete Rodriguez, Mateus Ferreira, Bruno Almeida, Rodrigo Pena, Pablo Cerqueira e Gabriela Gonçalves.

Aos meus grandes companheiros de todos os dias, e que me ajudaram bastante nesta etapa final do manuscrito, Alex Lees, Nárgila Moura e Antonita Santana. Em especial a Carlos Eduardo Portes, por toda a atenção e incentivo.

A minha mãe, Maria de Jesus Candeira Mendes, por toda a ajuda, amor incondicional, ensinamentos e incentivo. E às minhas irmãs Tarcila Mendes e Taísa Mendes, pela amizade, confiança e companheirismo.

SUMÁRIO

Sumário	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
Abstract	iv
Resumo	v
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
ARTIGO	9
1. Introdução	10
2. Material e Métodos	12
2.1. Amostragem	12
2.2 Extração, Amplificação e Sequenciamento.....	12
2.3 Análises Filogenéticas	14
2.4 Estimativa Bayesiana da “Species tree”	14
2.5 Datação Molecular	15
2.6 Divergência e estrutura populacionais	15
3. Resultados	15
3.1 Filogenia e Biogeografia	15
3.2 Reconstrução da árvore das espécies.....	17
3.3 Padrão temporal de diversificação em <i>Phoenicircus</i>	18
3.4 Genética populacional	19
4. Discussão	22
4.1 Relações filogenéticas em <i>Phoenicircus</i>	22
4.2 Teste de hipóteses de diversificação	24
5. Conclusão	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
Apêndice A – Lista de indivíduos utilizados e suas respectivas localidades de coleta	36

Lista de Figuras

Figura 1. (a) Filogenia reconstruída para o gênero *Phoenicircus* com base em Inferência Bayesiana a partir de 3320 bp de sequências dos genes de cyt b, ND2, β f7 e G3PDH-11. Um asterisco (*) abaixo dos nós indica um apoio estatístico máximo (i.e. probabilidade posterior = 1) para os mesmos. (b) Mapa mostrando a distribuição atual de *Phoenicircus* e as localidades das amostras utilizadas nas análises moleculares. Círculos denotam localidades de amostras de *P. carnifex*, enquanto estrelas correspondem à amostras de *P. nigricollis*. A área hachurada corresponde à área de simpatria entre *P. carnifex* e *P. nigricollis* 17

Figura 2. Árvore das espécies de *Phoenicircus* obtida a partir do aplicativo *Beast e com base em 3320 bp dos loci mtDNA (genes *cytb* e ND2) e introns β f7 e G3PDH-11, enraizada a partir de sequências de *Rupicola rupicola*. As idades médias de coalescência encontradas foram 1.68 (intervalo de confiança 2.47 – 1.04), 0.96 (1.36 - 0.58) e 0.15 (0.27 – 0.05) em milhões de anos para o primeiro, segundo e terceiro nós da filogenia, respectivamente. Um asterisco (*) abaixo dos nós indica um apoio estatístico máximo (i.e. probabilidade posterior = 1) para os mesmos, enquanto os números constituem probabilidades posteriores inferiores ao valor máximo 18

Figura 3. Cronograma de diversificação do gênero *Phoenicircus* obtido por Inferência Bayesiana a partir de sequências do gene mitocondrial *cytb* e uma taxa de calibração 2.1% de substituições nucleotídicas para cada milhão de anos. As idades médias de divergências estimadas foram 2.6 (intervalo de confiança 4.0 – 1.4), 1.3 (2.0-0.7) e 0.3 (0.54 – 0.07) em milhões de anos para o primeiro, segundo e terceiro nós da filogenia, respectivamente 19

Figura 4. Redes de haplótipos obtidas a partir do programa Haploviewer, mostrando as relações entre os haplótipos encontrados para as sequências dos introns nucleares β fib7 (A) e G3PDH-11 (B). A dimensão dos círculos é proporcional ao número de indivíduos (detalhado dentro de cada círculo) que compartilham cada haplótipo. Haplótipos conectados apenas por um traço são separados por apenas uma mutação, enquanto aqueles conectados por um traço e ponto diferem por duas mutações. Legenda: *P. nigricollis* (w): azul; *P. nigricollis* (e): amarelo; *P. carnifex* (n): rosa; *P. carnifex* (s): musgo 22

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela 1. Lista de primers utilizados e tamanho (número de pares de bases) do fragmento de cada gene sequenciado	13
Tabela 2. Distância genética não corrigida (distância-P) calculadas para os genes do mtDNA sequenciados (cytb e ND2) dentro e entre os clados reciprocamente monofiléticos revelados por análises filogenéticas do gênero <i>Phoenicircus</i> . Ver a Figura 1 para o significado das diferentes letras listadas após os nomes científicos	20
Tabela 3. Diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), testes de neutralidade Tajima's D, Fu's Fs e Ramos Onsins e Rozas R2, obtidos a partir do banco de dados de mtDNA para os clados reciprocamente monofiléticos revelados por análises filogenéticas do gênero <i>Phoenicircus</i>	21
Tabela 4. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as populações reciprocamente monofiléticas de <i>Phoenicircus nigricollis</i> e <i>P. carnifex</i>	21

Abstract

Many hypotheses have been erected to attempt to explain the origin and maintenance of the Amazon's high biodiversity, although few can be tested under a phylogeographic approach. We evaluated patterns of temporal and spatial genetic diversity of two endemic bird species in the Brazilian Amazon, which have allopatric populations restricted to different areas of endemism and limited by the main rivers of the Amazon basin. Sequences of two mitochondrial genes (ND2 and cytb) and two nuclear (β f7 and G3PDH intron 11) were obtained from 30 individuals, throughout the range of the genus *Phoenicircus* comprising the two currently-recognised species *P. carnifex* and *P. nigricollis*. The use of phylogeographic tools, in combination with population genetics and molecular dating allowed us to reconstruct the spatial and temporal context of the diversification of this genus in the Amazon region, as well as make predictions about its evolutionary history and geographical environment. Our data revealed the existence of four genetically distinct groups, demonstrating the paraphyletic status of *P. carnifex* and reciprocal monophyly between the two allopatric populations of *P. nigricollis*. These discoveries necessitate a revision of the current two-species arrangement of the genus *Phoenicircus*. The group's evolutionary history is defined by two types of vicariant events, initially by the formation of the main rivers of the Amazon during the Plio-Pleistocene, and more recently as a result of neotectonics activity in the central Amazon, highlighting the importance of historical processes when modeling the present Amazonian biota.

Keywords: Amazonia, diversification hypotheses, phylogeography, biogeography, *multiloci* data, speciation

Resumo

Muitas hipóteses já foram propostas na tentativa de explicar a origem e manutenção da grande biodiversidade encontrada na Amazônia, entretanto poucas são passíveis de serem testadas sob um ponto de vista filogeográfico. Nós avaliamos padrões de diversificação temporal e espacial de duas espécies de aves endêmicas da região amazônica, as quais apresentam populações alopátricas restritas a diferentes áreas de endemismo e limitadas pelos principais rios da bacia Amazônica. Sequências de dois genes mitocondriais (ND2 e Cytb) e dois nucleares (β f7 e G3PDH intron 11) foram obtidas a partir de 30 indivíduos, abrangendo a área de distribuição total do gênero *Phoenicircus* e incluindo as duas espécies atualmente válidas *P. carnifex* e *P. nigricollis*. A utilização de ferramentas da filogeografia, aliadas a métodos de genética populacional e de datação molecular, nos permitiu reconstruir os contextos espacial e temporal do processo de diversificação destes táxons na região Amazônica, bem como fazer previsões sobre sua história geográfica e ambiental. Nossos dados revelaram a existência de quatro grupos geneticamente distintos, evidenciando o status parafilético de *P. carnifex* e a monofilia recíproca entre as duas populações alopátricas de *P. nigricollis*, e sugeriram, portanto, alterações na taxonomia atualmente aplicada ao gênero *Phoenicircus*. A história de evolução de *Phoenicircus* parece ter sido delineada por dois tipos de eventos vicariantes, inicialmente pela formação dos principais rios da Amazônia, durante os períodos Plio-Pleistoceno, e mais recentemente por eventos de captura de drenagem resultantes da atividade de placas neotectônicas localizadas na região central amazônica, destacando a importância de processos históricos como estes na modelagem da biota Amazônica atual.

Palavras-Chave: Amazônia, hipóteses de diversificação, filogeografia, biogeografia, dados multilocus, especiação

INTRODUÇÃO GERAL

A Filogeografia é uma disciplina concentrada nos princípios e processos que regem as distribuições geográficas de linhagens genéticas, especialmente dentro e entre táxons intimamente relacionados (Avice, 2000). O termo foi cunhado por Avice *et al.* (1987), incorporando uma perspectiva filogenética e de genética populacional na biogeografia (Avice, 1998, 2009; Bermingham & Moritz, 1998).

A maioria dos estudos filogeográficos em animais têm se focado no mtDNA (Moore, 1995; Zink & Barrowclough, 2008), entretanto inferências baseadas apenas em árvores deste locus podem gerar conclusões erradas quanto a história evolutiva de táxons, principalmente devido a dificuldade em distinguir divergência populacional recente, que causa “incomplete lineage sorting”, de introgressão histórica, na qual o material genético de uma espécie pode entrar no pool gênico de outra através da hibridização (Milá *et al.*, 2011). Diante disso, alguns autores têm combinado marcadores mitocondriais e nucleares em seus estudos para que indícios mais robustos que corroborem (ou refutem) uma hipótese filogeográfica sejam fornecidos (Peters *et al.*, 2007; Brumfield *et al.*, 2008; Cabanne *et al.*, 2008; Sternkopf *et al.*, 2010; Flórez-Rodríguez *et al.*, 2011).

Alguns padrões filogeográficos podem ser categorizados a partir das árvores de genes de mtDNA ou de outros *loci* (Avice, 2000). Assim, são reconhecidos quatro tipos de estruturas filogeográficas: I – árvores de haplótipos profundas, geograficamente estruturadas; II - árvores profundas que não são estruturadas; III - árvores de haplótipos não profundas, mostrando estrutura geográfica; e IV - árvores não profundas e não estruturadas (Avice *et al.*, 1987). Os grupos de haplótipos geograficamente estruturados (tipos I e III) são típicos resultados de isolamento por barreiras ambientais ou ecológicas, enquanto que as demais categorias, II e IV, são caracterizadas por expansão populacional recente com ausência de barreiras ao isolamento, podendo, portanto, resultar em árvores de haplótipos sem uma boa estruturação; contudo, existindo variação suficiente que diagnostique os grupos de haplótipos, tais árvores não estruturadas fornecem um grande indício de história populacional recente (Zink, 2002).

Em outras palavras, as genealogias de haplótipos podem apresentar-se reciprocamente monofiléticas ou não (Zink, 2002). Grupos que exibem um padrão geográfico de monofilia recíproca não compartilham mais nenhum dos haplótipos ancestrais, comportando-se como linhagens evolutivas distintas (Avice *et al.*, 1987). Contudo, mesmo para as populações não estruturadas geograficamente, inferências sobre história populacional recente também podem

ser realizadas a partir de análises filogenéticas de haplótipos e de coalescência (Crandall & Templeton, 1996; Posada & Crandall, 2001).

Os primeiros trabalhos envolvendo uma abordagem filogeográfica para a biogeografia amazônica foram realizados por Patton *et al.* (1994) com o objetivo de testar as previsões impostas pela hipótese de diversificação dos rios como barreiras a partir de árvores de genes de algumas espécies de mamíferos (Patton & Silva, 1998; Patton *et al.*, 1994, 1996, 2000; Silva & Patton, 1998). Contudo, muitas destas pesquisas foram restritas a uma pequena porção da Amazônia ocidental brasileira e, apenas recentemente, estudos filogeográficos englobando maiores extensões geográficas da Amazônia têm sido realizados (Hall & Harvey, 2002; Marks *et al.*, 2002; Symula *et al.*, 2003; Ribas & Miyaki, 2004; Ribas *et al.*, 2005, 2006; Armenta *et al.*, 2005; Cheviron *et al.*, 2005; Ribas *et al.*, 2012).

Dentre os grupos biológicos, as aves vêm se apresentando como um ótimo objeto de estudo na compreensão da história evolutiva da Amazônia e de sua complexa biogeografia (Bates, 2001). Devido a sua localização neotropical, vasta extensão territorial e uma fisiografia bastante heterogênea, a bacia amazônica, além de abrigar a avifauna mais diversificada do mundo (~1.300 espécies), também é caracterizada por apresentar comunidades de aves com histórias evolutivas completamente distintas (Mittermeier *et al.*, 2003).

Silva *et al.* (2005) reconhecem oito grandes áreas de endemismo para a Amazônia (Belém, Tapajós, Xingu, Rondônia, Inambari, Napo, Imeri, Guiana), onde grupos únicos de espécies e subespécies de animais e plantas são encontrados. Mais recentemente, Borges e Silva (2012) propuseram a existência de uma nova área denominada Rio Negro devido à presença de uma distinta avifauna no interflúvio Negro/Solimões, totalizando então nove áreas de endemismo para a Amazônia. Apesar de diferentes táxons muitas vezes apresentarem similaridades quanto as suas distribuições e padrões de ocupação de áreas de endemismos, estudos filogenéticos/filogeográficos com espécies endêmicas de uma mesma área vêm demonstrando que tais semelhanças compartilhadas nem sempre resultam dos mesmos processos históricos de diversificação e que, em alguns casos, a história evolutiva se mostra bem mais complexa do que imaginada a princípio (Cracraft & Prum, 1988; Cracraft, 1988; Aleixo, 2002, 2006; Marks *et al.*, 2002; Cortés-Ortiz *et al.*, 2003).

O gênero *Phoenicircus* (Aves: Cotingidae) constitui um bom modelo para estudos filogeográficos de organismos amazônicos, pois seus táxons apresentam populações alopátricas limitadas pelos principais afluentes da bacia amazônica e restritas a diferentes áreas de endemismos da região (Snow, 1973; Snow, 2004; Infonatura, 2007). Swainson

(1832) designou o gênero a partir de *Lanius carnifex* Linnaeus, 1758, por sua vez baseado numa prancha de Edwards (1743) intitulada “The Red Bird from Surinam”. Na mesma publicação, Swainson (1832) descreveu *Phoenicircus nigricollis* com base numa outra prancha constante em Spix (1825), que retrata uma ave então referida como *Ampelion carnifex* de Barcelos, próximo ao rio Negro, por entender tratar-se de um táxon distinto de *Ampelion carnifex* de Linnaeus (1758).

Levando em consideração as informações abordadas acima, este trabalho teve como objetivo principal reconstruir os contextos espacial e temporal do processo de diversificação do gênero *Phoenicircus* na Amazônia, utilizando-se para tanto caracteres moleculares de dados multilocus.

Os resultados deste estudo serão apresentados na forma de artigo científico que será submetido à revista “Molecular Phylogenetics and Evolution”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Aleixo, A. 2006. Historical diversification of floodplain forest specialist species in the Amazon: a case study with two species of the avian genus *Xiphorhynchus* (Aves: Dendrocolaptidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 89, 383–395.

Armenta, J.K., Weckstein, J.D. & Lane, D.F., 2005. Geographic variation in mitochondrial DNA sequences of an Amazonian nonpasserine: the Black-spotted Barbet complex. *The Condor* 107 (3), 527–536.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.

Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7, 371–379.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of specie*. Cambridge, Massachussts, Harvard University Press.

Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3–15.

Bates, J.M. 2001. Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic pattern of diversification. In: Vieira I, D'Incão M.A, Silva J.M.C, Oren, D. (eds) *Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia*. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 119-138.

Bermingham, E. & Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7, 367–369.

Borges, S.H. & Silva, J.M.C., 2012. A new area of endemism for amazonian birds in the rio Negro basin. *The Wilson Journal of Ornithology* 124(1), 15–23.

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. *Systematic Biology*, 57, 719-731.

Cabanne, G.S., Horta, F.M., Sari, E.H.R., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 760–773.

Cheviron, Z.A., Hackett, S.J. & Capparella, A.P. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Iepidocercus coronata*) and its implication for history hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, 338-357.

Cortéz-Ortiz, L., Bermingran, E., Rico, C., Rodriguez-luna, E., Sampaio, I. & Ruiz-Garcia, M. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26, 64–81.

Cracraft, J. & Prum, R.O. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution* 42, 603–620.

Cracraft, J. 1988. Deep-history biogeography: Retrieving the historical pattern of evolving continental biotas. *Systematic Biology*, 37, 221–236.

Crandall, K.A. & Templeton, A.R. 1996. Applications of intraspecific phylogenetics. In: Harvey, P.H., Brown, A.J.L., Smith, J.M. Nee, S. (Eds) *New use for new phylogenies*. Oxford: Oxford University Press, 81-99.

Florez-Rodriguez, A., Carling, M.D. & Cadena, C.D. 2011. Reconstructing the phylogeny of “Buarremon” brush-finches and near relatives (Aves, Emberizidae) from individual gene trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58, 297–303.

Hall, J.P. & Harvey, D.J. 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from Riodinid butterflies. *Evolution* 56, 1489-1497.

INFONATURA: Birds, mammals and amphibians of Latin America [web application]. 2007. Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Disponible online no sitio: <<http://www.natureserve.org/infonatura>>.

Marks, B.D., Hackett, S.J. & Capparella, A.P. 2002. Historical relationship 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.

Milá, B., Toews, D.P.L., Smith, T.B. & Wayne, R.K. 2011. A cryptic contact zone between divergent mitochondrial DNA lineages in southwestern North America supports past introgressive hybridization in the yellow-rumped warbler complex (Aves: *Dendroica coronata*). *Biol. J. Linn. Soc.* 103, 696-706.

Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Brooks, T.M., Pilgrim, J.D., Konstant, W.R., Fonseca, G.A.B. & Kormos, C. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. *Proc. Nat. Acad. of Sci.* 100: 10309-10313.

Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. *Evolution* 49, 718–726.

Patton, J.L., Da Silva, M.N.F. & Malcolm, J.R. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon Basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution* 48, 1314-1223.

Patton, J.L., Dos Reis, S.F. & Silva, M.N.F. 1996. Relationship among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Mammalian Evolution*, 3, 3–39.

Patton, J.L., Silva, M.N.F. & Malcolm, J.R. 2000. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Buletim of the. American Mueum of. Natural History*, 244, 1–306.

Patton, J.L. & Silva, M.N.F. 1998. Rivers, refuges, and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. In: Howard, D.J.E. e Berlocher, S.H. *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, Oxford, UK, 202–213.

Peters, J.L., Zhuravlev, Y., Fefelov, I., Logie, A. & Omland, K.E. 2007. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas ssp*). *Evolution* 61 (8), 1992-2006.

Posada, D. & Crandall, K.A. 2001. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution*, 18, 897–906.

Ribas, C.C., Miyaki, C.Y. & Gaban-Lima, R. 2005. Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus “*Pionopsitta*” (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography*, 32, 1409-1427.

Ribas, C.C., Joseph, L. & Miyaki, C.Y. 2006. Molecular systematics pattern of diversification of the *Pyrrhura* parakeets (Aves: Psittacidae) with special reference to the *P. picta*/*P. leucotis* complex. *The Auk* 123, 660-680.

Ribas, C.C. & Miyaki, C.Y. 2004. Molecular systematics in *Aratinga* parakeets: Species limits and historical biogeography in the ‘solstitialis’ group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 663–675.

Ribas, C.C., Aleixo, A. Nogueira, A.C.R., Miyaki, C.Y. & Cracraft, J. 2012. A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of The Royal Society B*, 279, 681–689.

Silva, J.M.C., Rylands, A.B. & Fonseca, G.A.B. 2005. The Fate of the Amazonian Areas of Endemism. *Conservation Biology*, 19 (3), 689–694.

Snow, D.W. 1973. The classification of the Cotingidae (Aves). *Breviora*, 409, 1–27.

Snow, D.W. 2004. Family Cotingidae (Cotingas). In: del Hoyo, J., Elliott, A. and Christie, D.A. (ed.). *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 9. Mousebirds to Hornbills. Barcelona, Lynx Edicions.

Sternkopf, V., Liebers-Helbig, D., Ritz, M.S., Zhang, J., Helbig, A.J. & De Knijff, P. 2010. Introgressive hybridization and the evolutionary history of the Herring Gull complex revealed by mitochondrial and nuclear DNA. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 348.

Symula, R., Schulte, R., & Summers, K. 2003. Molecular systematics and phylogeography of Amazonian poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26 (3), 452–475.

Zink, R.M. & Barrowclough, G.F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17, 2107–2121.

Zink, R.M. 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 953–959.

SISTEMÁTICA MOLECULAR E FILOGEOGRAFIA DO GÊNERO
***Phoenicircus* (AVES: COTINGIDAE)**

Denise Mendes Martins¹; Alexandre Aleixo^{2,3}

¹ Curso de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará / Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA, Brasil.

² Coordenação de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA, Brasil.

³ Autor correspondente: aleixo@museu-goeldi.br

1. INTRODUÇÃO

A floresta tropical tem sido a vegetação marcante na região da bacia Amazônica desde antes do processo de soerguimento dos Andes (início do Mioceno), contendo uma grande diversidade de fauna e flora como resultado de uma série complexa de processos, interações e inovações evolutivas (Van der Hammen & Hooghiemstra, 2000; Jaramillo *et al.*, 2006; Irion & Kalliola, 2010). Forças ambientais de grande impacto têm continuamente modificado ecossistemas em uma vasta área da Amazônia, sendo estes distúrbios consequência dos diversos processos fisiográficos existentes na região, que, por sua vez, têm forçado a biota a lidar com mudanças recorrentes e diferentes populações e espécies a se adaptarem, migrarem ou se diferenciarem (Wesselingh & Salo, 2006).

Muitas hipóteses já foram propostas na tentativa de explicar a origem e manutenção de tamanha biodiversidade (ver revisão em Haffer, 1997), entretanto poucas generalizações têm sido empiricamente suportadas (Aleixo & Rossetti, 2007; Ribas *et al.*, 2012). Embora a especiação alopátrica seja considerada como o mecanismo primário responsável pela origem da riqueza de espécies e endemismos por grande parte destas hipóteses, poucas podem ser testadas sob uma perspectiva filogeográfica. Isto se deve, em parte, ao potencial limitado destas hipóteses quanto ao esclarecimento de padrões de diferenciação biótica na região amazônica, já que são historicamente baseadas em dados de distribuição de táxons morfológicamente distintos (Zink, 2004), tornando-se, portanto, problemáticas por não englobarem os componentes filogenéticos dos mesmos, os quais são importantes em estudos evolutivos (Moritz *et al.*, 2000). Além disso, estudos genéticos recentes têm mostrado que táxons morfológicamente definidos podem subestimar padrões reais de diversidade em aves Neotropicais (Marks *et al.*, 2002; Irestedt *et al.*, 2004a, 2004b).

Dentre estas hipóteses suscetíveis a falseação por métodos filogenéticos e de genética populacional, duas podem ser destacadas por suas generalidades ao tratar da diversificação de vertebrados amazônicos: a hipótese dos rios como barreiras e a dos refúgios do pleistoceno (Fig. 1; Capparella, 1991; Moritz *et al.*, 2000; Bates, 2001). A primeira atribui aos principais rios da bacia amazônica a redução ou inibição do fluxo gênico entre as populações de táxons irmãos que habitam margens opostas de um mesmo rio levando, conseqüentemente, à diferenciação e especiação das mesmas (Wallace, 1852). Já a hipótese dos refúgios propõe que oscilações climáticas e consequentes contrações e expansões cíclicas ao longo dos períodos glaciais e interglaciais, respectivamente, foram os grandes responsáveis por

processos alopátricos de especiação em refúgios formados a partir da fragmentação florestal (Haffer, 1969).

Estas predições precisam ser avaliadas em conjunto com a história ambiental e paleogeográfica da região Amazônica para que padrões de diversificação da biota sejam esclarecidos com precisão, embora ainda existam muita discussão e incerteza quanto aos cenários que marcaram os períodos do Mioceno até o presente (Hoorn *et al.*, 1995; Latrubesse *et al.*, 2010).

Dois modelos paleogeográficos têm sido propostos para a formação da moderna hidrografia Amazônica, cada um com grandes consequências para os padrões de diversificação da sua biota (Ribas *et al.*, 2012). Um deles implica em uma origem mais antiga da floresta de terra firme no oeste Amazônico, bem como de seu sistema hidrográfico atual, ao final do Mioceno (11.0 – 9.0 Ma; Hoorn *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2009; Wesselingh *et al.*, 2002), enquanto o outro propõe uma idade mais recente para o estabelecimento da estrutura dos rios e fitofisionomia atuais da região, durante o Plio-Pleistoceno (Rossetti *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2006; Latrubesse *et al.*, 2010).

O gênero *Phoenicircus* é composto por dois táxons, *P. nigricollis* e *P. carnifex*, os quais apresentam populações alopátricas limitadas pelos principais afluentes da bacia amazônica e restritas a diferentes áreas de endemismos da região (Fig. 1b; Snow, 1973; Snow, 2004; Infonatura, 2007). Morfologicamente estas espécies são bastante similares, principalmente as fêmeas, mas diagnosticáveis quanto à plumagem dos machos e com base em caracteres vocais (Peters, 1979; Snow, 2004; Trail & Donahue, 1991). Outra evidência para tal distinção estaria em uma área de simpatria ao longo do sul do rio Amazonas, nas porções baixas dos interflúvios Madeira-Tapajós e Tapajós-Xingu, onde ambos os táxons aparentemente mantêm suas diagnoses fenotípicas e vocais (Snow, 2004; Kirwan & Green 2012; Aleixo, *com. pess.*), mas nenhuma informação existe quanto a existência ou magnitude de fluxo gênico entre as duas espécies.

Ocorrendo hibridização, o material genético de uma das espécies pode ser introduzido no pool gênico da outra, processo este conhecido como introgressão genética (Anderson, 1949). Recentemente, este mecanismo tem sido considerado importante para o entendimento dos processos de origem e de manutenção da diversidade genética (Rheindt & Edwards, 2011). Além disso, também pode evidenciar o impacto ocasionado por mudanças climáticas, as quais podem alterar os limites de vegetação e gerar novas zonas de contato entre espécies antes disjuntas, com consequências ainda desconhecidas para a integridade genética das espécies (Mank *et al.*, 2004; Brumfield, 2010).

Do ponto de vista filogenético, apenas a posição do gênero dentro da família Cotingidae já foi estabelecida, mas com base em material de apenas uma das espécies (*P. nigricollis*; Prum *et al.*, 2000; Ohlson *et al.*, 2007).

Neste trabalho, usamos ferramentas da filogeografia para reconstruir os contextos espacial e temporal do processo de diversificação do gênero *Phoenicircus*, o que permitiu fazer predições sobre sua história evolutiva. Além disso, nossos dados são também utilizados para avaliar hipóteses alternativas de especiação alopátrica, incluindo alteração de paisagens por atividades tectônicas e variações climáticas periódicas, bem como evidenciar a importância de processos históricos como estes na constituição da biota Amazônica atual.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

Um total de 30 espécimes do gênero *Phoenicircus* distribuídos por toda a área de distribuição destas espécies foi seqüenciado (*P. carnifex* N=19, *P. nigricollis* N=11) a partir de amostras de tecido preservadas em álcool absoluto provenientes da coleção ornitológica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Pará, Brasil (Apêndice A). Todas as amostras de tecido utilizadas possuem espécimes testemunho depositados na referida coleção. De acordo com a filogenia estimada para a família Cotingidae, as espécies do gênero *Rupicola* estão mais proximamente relacionadas com *Phoenicircus* (Ohlson *et al.*, 2007); assim, foram utilizadas como grupo externo seqüências de *R. rupicola* disponíveis no GenBank com os seguintes números de acesso: AY370609.1, DQ470513.1, DQ470537.1 (ND2, *cytb* e G3PDH-11, respectivamente) correspondentes ao espécime LSUB7575 e AY489433.1 (β fib7) referente a AMNHPEP1962.

2.2. Extração, Amplificação e Sequenciamento

O DNA total foi extraído para todas as amostras utilizando-se procedimentos padrões com a técnica de fenolclorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Subsequentemente, nós amplificamos dois genes mitocondriais (*cytb* e ND2) e dois introns nucleares autossomais (β fib7 e G3PDH-11) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Iniciadores utilizados para a amplificação de cada gene estão listados na Tabela 1. As concentrações e condições usadas para a PCR foram padronizadas a partir dos métodos empregados em

Ohlson *et al.* (2007) que já trabalharam com o gênero *Phoenicircus*. Uma pequena quantidade de cada amplificação foi checada em gel de agarose a 1% através da eleforese, com o objetivo de verificar se o tamanho do fragmento de DNA amplificado correspondia à região alvo e se apenas um único produto de amplificação foi obtido. Os produtos das amplificações foram primeiramente purificados utilizando PEG 8000 para então serem seqüenciados. A reação de seqüenciamento foi obtida através do ABI BigDye Terminator Kit de acordo com as especificações do fabricante e, finalmente, as seqüências de ambas as fitas do DNA (“heavy” e “light”) foram obtidas a partir do seqüenciador automático ABI 3130.

Tabela 1. Lista de primers utilizados e tamanho (número de pares de bases) do fragmento de cada gene seqüenciado.

Locus	Primers	Fragmento (pb)	Referências
G3PDH intron 11	G3P-13b	329	Fjeldså <i>et al.</i> (2003)
	G3P-14b		Fjeldså <i>et al.</i> (2003)
β fibrinogênio 7 (βFib7)	17L	866	Prichitko & Moore (1997)
	17U		Prichitko & Moore (1997)
Cytochrome b (cytb)	L14841	1078	Kocher <i>et al.</i> (1989)
	H16064		Edwards & Wilson (1990)
NADH Deidrogenase 2 (ND2)	L5215	1047	Hackett (1996)
	H6313		Sorenson <i>et al.</i> (1999)

Todas as seqüências foram editadas e alinhadas com o auxílio do software BioEdit 7.0.5 (Hall, 1999). No caso dos genes mitocondriais, foram tomadas algumas medidas para confirmar a origem mitocondrial dos fragmentos amplificados: (1) foram amplificados fragmentos grandes (cerca de 1000 pb); (2) ambas as fitas foram amplificadas; (3) as seqüências foram alinhadas com a seqüência completa do DNA mitocondrial da galinha, e verificadas quanto a presença de inserções, deleções e codons de parada, que resultariam em uma proteína não-funcional (Bates *et al.*, 1999). No caso dos marcadores nucleares, sítios heterozigotos foram identificados visualmente durante a edição e alinhamento das seqüências pela presença de picos duplos de mesmo tamanho no cromatograma (Brumfield *et al.*, 2008). Os haplótipos foram faseados com o auxílio do programa PHASE (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly, 2003), seguindo a metodologia descrita em Carling & Brumfield (2008), onde somente aqueles alelos com uma probabilidade posterior de no mínimo 0.95

foram incluídos nas análises filogenéticas e populacionais. Gaps foram considerados como um quinto estado de caráter (Carling & Brumfield, 2008). A saturação de bases de cada banco de dados foi avaliada plotando as taxas de transição e transversão contra a distância genética com o auxílio do aplicativo DAMBE (Xia & Xie, 2001).

2.3. Análises Filogenéticas

As genealogias foram reconstruídas através de inferência Bayesiana individualmente para cada locus a partir de métodos coalescentes, bem como para uma matriz concatenada que incluiu sequências de todos os quatro genes. “Bayes factors” foram utilizados para determinar o número ótimo de partições a ser aplicado nas análises bayesianas concatenadas (Brandley *et al.*, 2005). Assim, os caracteres foram particionados por gene (ND2, *cytb*, β fib7 e G3PDH-11) e por posição de códon no caso dos mitocondriais, ou seja, em oito partições, seguindo os resultados obtidos a partir desta metodologia. Os modelos para substituições de nucleotídeos foram selecionados para cada gene e partição individualmente, usando o Akaike Information Criterion (AIC) através do software MrModelTest 2.2 (Nylander, 2004). As análises Bayesianas foram realizadas no MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e consistiram de duas corridas de quatro cadeias MCMC para 20,000,000 de gerações amostradas a cada 20,000 gerações. O programa TRACER v 1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2007) foi usado para avaliar a convergência de todos os parâmetros amostrados pelas análises; os primeiros 25% das árvores amostradas foram descartados como burn-in.

2.4. Estimativa Bayesiana da “Species tree”

As distribuições posteriores das árvores de genes e da árvore das espécies foram estimadas a partir da opção *BEAST no programa BEAST 1.6.2 (Heled & Drummond, 2010). Quatro corridas independentes de duas cadeias MCMC foram realizadas para 100 milhões de gerações com uma frequência de amostragem dos parâmetros a cada 10.000 gerações; um total de 10% das árvores foi descartado como burn-in. Todos os parâmetros amostrados nas análises foram avaliados com Tracer v.1.4.1 para certificar-se de que atingiram valores satisfatórios quanto aos ESSs (tamanho efetivo da amostragem). Um ESS de 200 ou mais é recomendado para a reconstrução de genealogias (Kuhner, 2009). As estimativas de tempo geradas para a árvore das espécies foram obtidas utilizando uma taxa de mutação de 2,1%

para o gene *cytb* (Weir & Schluter, 2008), e estimando, a partir desta calibração, as taxas dos demais *loci* utilizados na análise.

2.5. Datação molecular

Para datar a história de diversificação de *Phoenicircus*, uma taxa de substituição nucleotídica de 2,1% para o *cytb* (0,0105 substituições por sítio e por linhagem por milhões de anos) foi utilizada juntamente com a opção “relaxed-clock” no BEAST 1.6.2 (Weir & Schluter, 2008; Drummond & Rambaut, 2007). Para as análises, foram incluídos quatro espécimes de *Phoenicircus*, representativos de cada população, bem como um indivíduo referente ao grupo externo *R. rupicola*. As datas de divergência e os intervalos de confiança foram obtidos a partir de três análises de 50 milhões de gerações cada, as quais foram combinadas e visualizadas quanto à convergência dos parâmetros através do programa Tracer, como mencionado para as análises bayesianas.

2.6. Divergência e estrutura populacionais

A partir dos dados de mtDNA, foram realizadas as seguintes análises populacionais: (1) cálculos de distância genética não corrigida (distância-p) dentro e entre os clados recuperados pela hipótese filogenética (Fig. 1), utilizando MEGA v 5.10; (2) estimativas de diversidade nucleotídica e haplotípica, bem como testes estatísticos para detectar evidências de crescimento populacional no passado, através do DNASP v. 4.10.2 (Rozas, *et al.*, 2003); (3) Análise Molecular de Variância (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) utilizando Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) para calcular a diferença entre as populações de *Phoenicircus* através do valor de F_{st} .

Redes de haplótipos foram geradas para os *loci* nucleares utilizando o software HaploViewer (Salzburger *et al.*, 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Filogenia e Biogeografia

As análises filogenéticas bayesianas foram estimadas com base num total de 3320 bp (2125pb mtDNA, 866pb β Fib7 e 329pb G3PDH) e reconstruíram uma mesma topologia bem

apoiada estatisticamente (Fig. 1a). A filogenia obtida a partir do programa MrBayes mostrou suportes máximos de probabilidade posterior de ocorrência e apoiou a monofilia do complexo *P. carnifex/nigricollis* com a existência de quatro clados correspondentes às quatro populações do gênero. A espécie *P. carnifex* se mostrou parafilética, onde *P. carnifex* (s – distribuído ao sul do rio Amazonas) é o táxon mais basal na filogenia, enquanto *P. carnifex* (n – distribuído ao norte do rio Amazonas) é grupo irmão do clado formado por *P. nigricollis* (w – distribuído a oeste do rio Negro na Amazônia ocidental) e *P. nigricollis* (e – distribuído a leste do rio Madeira) que, por sua vez, são reciprocamente monofiléticos. O espécime (JRT2001 – MPEG 70892) indiscutivelmente atribuído a *P. carnifex* (s) com base em caracteres vocais e fenotípicos (identificação obtida em campo por Alexandre Aleixo) se agupou no clado de *P. nigricollis* (e). Este resultado é indício de que hibridização esteja ocorrendo entre estas linhagens (Fig. 1a). O indivíduo híbrido foi coletado na localidade de Juruti, que está dentro da região de simpatria existente entre estas espécies na porção norte do interflúvio Madeira-Tapajós (Fig. 1b).

No caso das genealogias reconstruídas a partir dos genes nucleares β fib7 e G3PDH-11 (não mostradas), a monofilia do gênero também foi evidenciada, entretanto, com pouca resolução interna e apoios baixos dos nós, provavelmente devido ao processo de “incomplete lineage sorting” para estes *loci*.

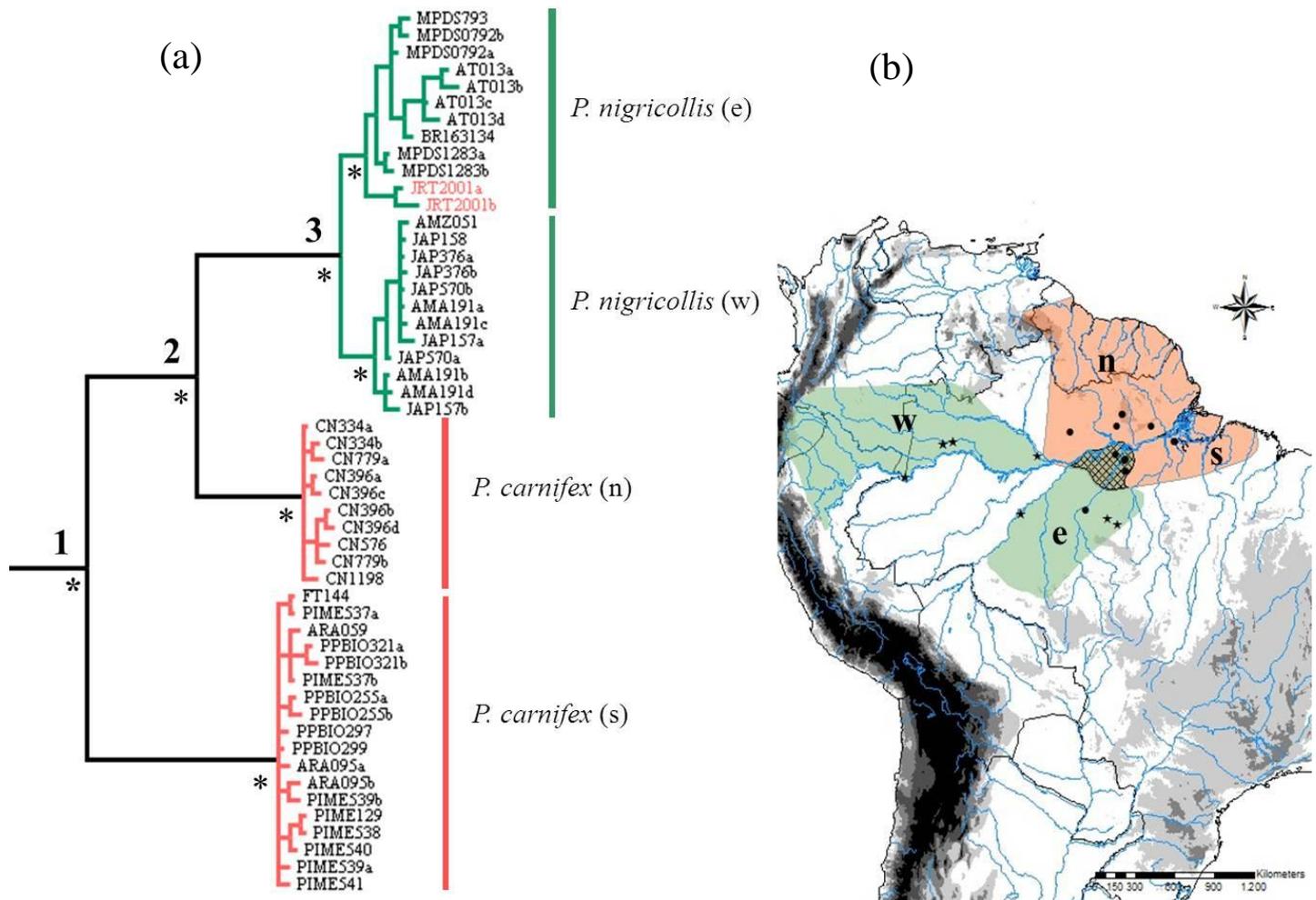


Figura 1. (a) Filogenia reconstruída para o gênero *Phoenicircus* com base em Inferência Bayesiana a partir de 3320 bp de sequências dos genes de *cytb*, *ND2*, β 7 e *G3PDH-11*. O asterisco (*) abaixo dos nós indica um apoio estatístico máximo (i.e. probabilidade posterior = 1) para os mesmos. (b) Mapa mostrando a distribuição atual de *Phoenicircus* e as localidades das amostras utilizadas nas análises moleculares. Círculos denotam localidades de amostras de *P. carnifex*, enquanto estrelas correspondem à amostras de *P. nigricollis*. A área hachurada corresponde à área de simpatria entre *P. carnifex* e *P. nigricollis* (Infonatura, 2007; Ridgely e Tudor, 1994, 2009).

3.2. Reconstrução da árvore das espécies

A árvore de espécies de *Phoenicircus* (Fig. 2), reconstruída no *BEAST, mostrou-se congruente com a genealogia obtida da análise filogenética bayesiana concatenada (Fig. 1a). A reconstrução da árvore de espécies foi realizada com base no mesmo banco de dados

utilizado na análise gerada pelo MrBayes, exceto pelo indivíduo coletado em Juruti (JRT2001) que foi retirado por ter sido diagnosticado como híbrido. Esta estratégia foi tomada para evitar enviesamentos e não infringir as premissas da análise promovida pelo *BEAST. A monofilia do gênero também foi evidenciada e todos os agrupamentos atingiram valores de probabilidade posterior superiores a 0.95 (Fig. 2).

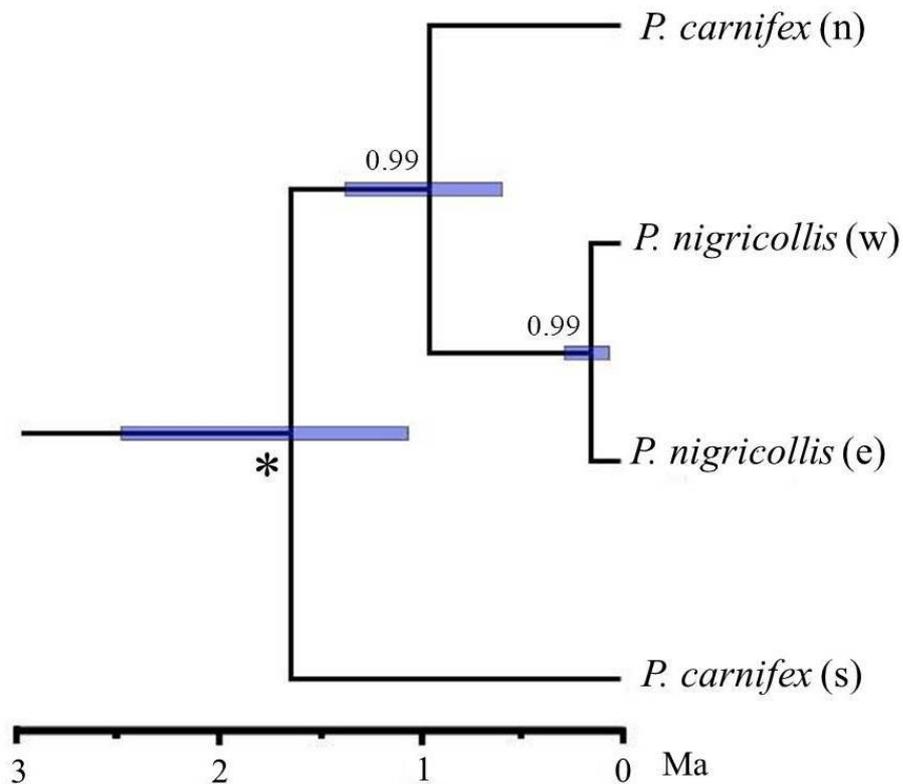


Figura 2. Árvore das espécies de *Phoenicircus* obtida a partir do aplicativo *Beast e com base em 3320 bp dos loci mtDNA (genes *cytb* e ND2) e introns β f7 e G3PDH-11, enraizada a partir de sequências de *Rupicola rupicola*. As idades médias de coalescência encontradas foram 1.68 (intervalo de confiança 2.47 – 1.04), 0.96 (1.36 - 0.58) e 0.15 (0.27 – 0.05) em milhões de anos para o primeiro, segundo e terceiro nós da filogenia, respectivamente. Um asterisco (*) abaixo dos nós indica um apoio estatístico máximo (i.e. probabilidade posterior = 1) para os mesmos, enquanto os números constituem probabilidades posteriores inferiores ao valor máximo.

3.3. Padrão temporal de diversificação em *Phoenicircus*

Estimativas de tempos de diversificação distintas foram obtidas a partir do banco de dados baseado exclusivamente no gene *cytb* e da reconstrução da “Species Tree” (Fig. 2 e 3). De acordo com a datação gerada a partir somente das sequências de *cytb*, a divergência entre

o grupo basal *P. carnifex* (s) e os demais clados foi estimada para o final do Plioceno, entre 4.0 e 1.4 Ma (Fig. 3, nó n^o 1). O segundo evento de diversificação ocorreu entre *P. carnifex* (n) e *P. nigricollis* aproximadamente a 2.0 – 0.7 Ma, no final do Plioceno – médio Pleistoceno (Fig. 3, nó n^o2). Por fim, a separação de *P. nigricollis* em duas populações disjuntas teve início no médio Pleistoceno (Fig. 3, nó n^o3). Como esperado, as datações geradas pela abordagem coalescente se mostraram um pouco mais recentes (Fig. 2), provavelmente devido ao fato de o banco de dados utilizado para esta análise incluir *loci* nucleares, que em geral, evoluem mais lentamente quando comparados aos genes mitocondriais.

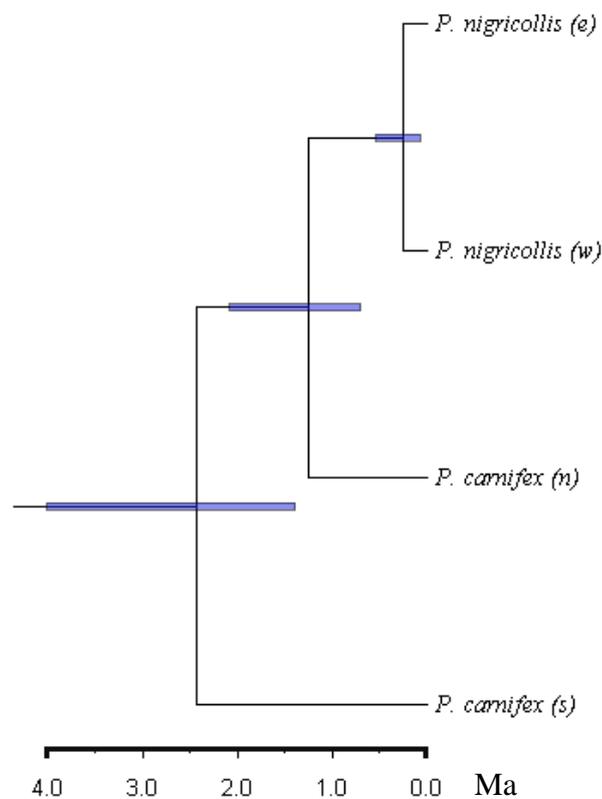


Figura 3. Cronograma de diversificação do gênero *Phoenicircus* obtido por Inferência Bayesiana a partir de sequências do gene mitocondrial *cyt b* e uma taxa de calibração 2.1% de substituições nucleotídicas para cada milhão de anos. As idades médias de divergências estimadas foram 2.6 (intervalo de confiança 4.0 – 1.4), 1.3 (2.0-0.7) e 0.3 (0.54 – 0.07) em milhões de anos para o primeiro, segundo e terceiro nós da filogenia, respectivamente.

3.4. Genética populacional

As distâncias genéticas não corrigidas (distância-p) foram calculadas dentro e entre os quatro clados distintos recuperados pelas hipóteses filogenéticas geradas a partir das análises Bayesianas concatenadas e de árvore de espécies (Figs. 1 e 2). Os níveis de divergência variaram de 1.0 a 5.0% entre as populações e de 0 a 0.4% dentro de cada população (Tabela 2).

Tabela 2 - Distância genética não corrigida (distância-P) calculadas para os genes do mtDNA sequenciados (*cytb* e *ND2*) dentro e entre os clados reciprocamente monofiléticos revelados por análises filogenéticas do gênero *Phoenicircus*. Ver a Figura 1 para o significado das diferentes letras listadas após os nomes científicos.

	<i>P. carnifex</i> (s)	<i>P. carnifex</i> (n)	<i>P. nigricollis</i> (e)	<i>P. nigricollis</i> (w)
<i>P. carnifex</i> (s)	0,4%*			
<i>P. carnifex</i> (n)	4,1%	0,2%*		
<i>P. nigricollis</i> (e)	5%	3%	0,2%*	
<i>P. nigricollis</i> (w)	4,7%	3%	1%	0*
<i>R. rupicola</i> **	16%	14%	14,6%	15%

*Distância-p dentro de cada população; **Grupo Externo

Índices de diversidade haplotípica (h) foram altos para todos os clados de *Phoenicircus*, com exceção de *P. nigricollis* (w; Tabela 3). Em todas as populações foram observados índices baixos de diversidade nucleotídica (π), com valores abaixo de 0,5%. Altos valores de h e baixos de π são indicativos de um acúmulo de mutações após um evento de gargalo de garrafa seguido por um rápido crescimento populacional. Os testes de neutralidade de F_s de F_u e R_2 foram significativamente diferentes de zero para os clados *P. carnifex* (s), *P. carnifex* (n) e *P. nigricollis* (e), rejeitando a hipótese nula de estabilidade demográfica nestes casos. Os valores negativos de F_s de F_u apresentados por estas populações indicam expansão populacional no passado, sendo, portanto, concordantes com os resultados demonstrados por h e π , que sugerem cenários de expansão demográfica ou “bottleneck” populacional (Rand, 1996). No caso de *P. nigricollis* (w) a hipótese nula de neutralidade e estabilidade demográfica não pode ser rejeitada. Em se tratando de análises populacionais, o tamanho

amostral utilizado para a obtenção de tais resultados é considerado baixo ou até mesmo insuficiente e, portanto, as inferências realizadas a partir dos índices de diversidade e testes de neutralidade nestes casos devem ser tratadas e consideradas com bastante cautela.

Tabela 3. Diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), testes de neutralidade Tajima's D, Fu's Fs e Ramos Onsins e Rozas R2, obtidos a partir do banco de dados de mtDNA para os clados reciprocamente monofiléticos revelados por análises filogenéticas do gênero *Phoenicircus*.

	N	Há	H	π (%)	Tajima's D		Fu's Fs		R2	
					obs.	P	obs.	P	obs.	P
mtDNA (cytb + ND2)										
<i>P. carnifex</i> (n)	5	5	1.000±0.016	0.140±0.022	-1.16	0.06	-2.37	0.0245*	0.07	0.0006*
<i>P. carnifex</i> (s)	14	9	0.950±0.002	0.194±0.026	-0.97	0.18	-4.318	0.0055*	0.093	0.005*
<i>P. nigricollis</i> (w)	6	2	0.400±0.056	0.020±0.012	-0.816	0.27	0.09	0.2	0.4	0.73
<i>P. nigricollis</i> (e)	5	6	1.000±0.096	0.180±0.031	-0.516	0.355	-2.85	0.018*	0.11	0.007*

N: Número de indivíduos, Ha: Número de haplótipos, * valores significativos

Uma análise de variância molecular (AMOVA), realizada a partir dos dados de mtDNA, mostrou que a maioria da variância genética de ambos os táxons de *Phoenicircus* foi particionada geograficamente entre suas populações alopátricas, apresentando valores de *Fst* significativos (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as populações reciprocamente monofiléticas de *Phoenicircus nigricollis* e *P. carnifex*.

Taxon	No. Indivíduos (populações)	Centros de endemismo	Among populations within species (%)	Within populations (%)
<i>P. nigricollis</i>	14 (w - e)	Napo/Rondônia+ Tapajós	84.95*	15.05
<i>P. carnifex</i>	17 (n - s)	Rondônia+ Tapajós+Xingu+ Belém (porção norte)/Guianas	95.16**	4.84

* $P < 0.01$; ** $P < 0.001$

As redes de haplótipos construídas para os introns nucleares β fib7 e G3PDH-11 mostraram que alguns haplótipos destes genes são compartilhados entre as duas espécies reconhecidas de *Phoenicircus* (Fig. 4), sendo, portanto, concordantes com as árvores

bayesianas obtidas para estes *loci* que, por sua vez, não mostraram muita resolução interna (não mostradas). Para o β fib7 pode-se observar certa estruturação a nível interespecífico (Fig. 4A), existindo haplótipos compartilhados apenas entre as populações dentro de cada espécie reconhecida. No caso de G3PDH-11, três das quatro populações de *Phoenicircus* compartilham um haplótipo central, caracterizado por ampla distribuição geográfica e alta frequência de ocorrência, do qual partem vários outros conectados a ele por um ou mais eventos de mutação (Fig. 4B).

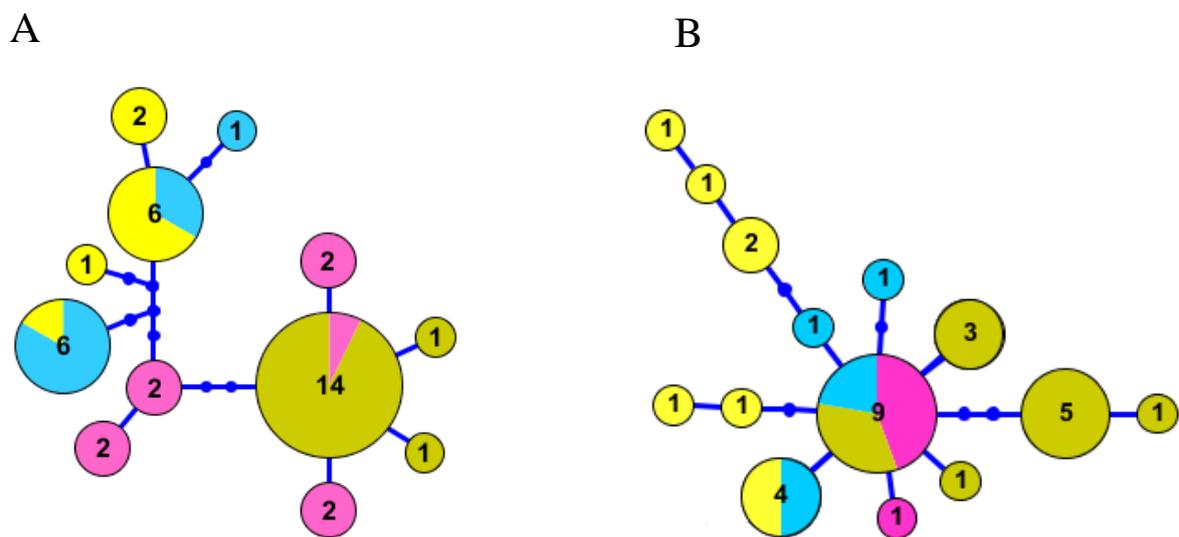


Figura 4. Redes de haplótipos obtidas a partir do programa Haploviewer, mostrando as relações entre os haplótipos encontrados para as sequências dos introns nucleares β fib7 (A) e G3PDH-11 (B). A dimensão dos círculos é proporcional ao número de indivíduos (detalhado dentro de cada círculo) que compartilham cada haplótipo. Haplótipos conectados apenas por um traço são separados por apenas um mutação, enquanto aqueles conectados por um traço e ponto diferem por duas mutações. Legenda: *P. nigricollis* (w): azul; *P. nigricollis* (e): amarelo; *P. carnifex* (n): rosa; *P. carnifex* (s): musgo.

4. DISCUSSÃO

4.1. Relações filogenéticas em *Phoenicircus*

As inferências filogenéticas Bayesianas concatenada e coalescente para *Phoenicircus* foram estatisticamente bem apoiadas, evidenciando consistentemente o status parafilético de

P. carnifex (Figs. 1 e 2); *P. nigricollis* aponta monofilia da espécie, com populações a oeste e leste já tendo adquirido monofilia recíproca (Figs. 1 e 2). As relações filogenéticas dentro do gênero foram consistentes com os valores de distância genética observados entre os clados, onde a população de *P. carnifex* (n) apresentou-se geneticamente mais distante de *P. carnifex* (s) do que de *P. nigricollis* (4.1% contra 3%; Tabela 2). Estes resultados atestam a discrepância entre os caracteres fenotípicos e genotípicos no gênero, já que morfologicamente não existe diagnosabilidade entre as duas populações de *P. carnifex*, separadas pelo Rio Amazonas (Snow, 2004). Entretanto, dados vocais mostram uma diferenciação bem clara entre as populações norte e sul deste táxon (Martins *et al.*, *in prep.*).

Em conjunto, as análises filogenéticas e populacionais multi-locus apontam para a existência de quatro linhagens reciprocamente monofiléticas no gênero *Phoenicircus*, endêmicas de diferentes setores da Amazônia, preenchendo pré-requisitos para serem consideradas espécies independentes tanto com base no conceito filogenético quanto no conceito biológico de espécie. Altos apoios para a monofilia recíproca entre estas quatro linhagens na árvore coalescente mostra que a independência evolutiva entre elas é estatisticamente significativa mesmo quando os três *loci* independentes sequenciados são considerados, revelando um processo de coalescência significativo para todos eles, apesar da introgressão verificada envolvendo duas destas populações que provavelmente não são irmãs e reforçando seus status como espécies biológicas (Brumfield *et al.*, 2008).

A existência de introgressão entre *P. carnifex* (s) e *P. nigricollis* (e) foi evidenciada *a priori* a partir do posicionamento do espécime JRT2001 de *P. carnifex* na filogenia gerada a partir do Mr. Bayes (Fig. 1a). Com base na árvore coalescente e no conjunto de dados multi-locus, pode-se inferir que, apesar de presente, a introgressão verificada entre *P. carnifex* (s) e *P. nigricollis* (e) não foi de uma tal magnitude a ponto de reverter a monofilia recíproca existente entre estas duas linhagens ou mesmo para todas as quatro principais linhagens de *Phoenicircus*, mostrando que isolamento reprodutivo e monofilia recíproca não estão necessariamente correlacionados e que a capacidade de hibridização é provavelmente um caráter ancestral retido por linhagens filogeneticamente aparentadas por muito tempo após a sua separação evolutiva significativa (Aleixo, 2007). Com base na monofilia recíproca entre todas as quatro linhagens e no tempo de coalescência bem mais recente estimado para *P. nigricollis* (Fig. 2), é possível inferir que a introgressão entre *P. carnifex* (s) e *P. nigricollis* (e) é relativamente recente e que a mesma evoluiu a partir do contato secundário destas linhagens ao sul do Rio Amazonas entre os baixos rio Madeira e Tapajós (Fig. 1), possivelmente a partir de um processo de dispersão envolvendo pelo menos uma delas.

4.2. Teste de Hipóteses de diversificação

As diferentes estimativas filogenéticas e de datação molecular (Figs. 1a, 2 e 3) fornecem suporte para a diversificação de *Phoenicircus* ocorrendo, em média, há 2.6 ou 1.68 Ma, dependendo do método de datação considerado. Apesar de os tempos de divergência entre as linhagens terem se mostrado mais recentes de acordo com a árvore coalescente do que no cronograma estimado apenas com base no gene *cytb*, os intervalos de confiança se sobrepõem em grande parte para cada nó, indicando que as datações de ambas as estimativas são consistentes com um mesmo cenário temporal de evolução (Figs. 2 e 3). De todo modo, as quatro principais linhagens evolutivas de *Phoenicircus* reveladas neste estudo são delimitadas por dois grandes rios Amazônicos: Amazonas e Negro (Fig. 1). A congruência existente entre as topologias das árvores Bayesiana e coalescente nos permite inferir que esses rios constituíram barreiras primárias responsáveis pela diferenciação das linhagens de *Phoenicircus*, sugerindo um importante papel como barreira vicariante. No entanto, o mesmo não pode ser dito com relação ao Rio Tapajós, que, mesmo na sua porção mais baixa, não constitui uma barreira para a distribuição de populações de duas linhagens de *Phoenicircus*, que se hibridizam justamente nessa região: (*P. carnifex* [s] e *P. nigricollis* [e]; Fig. 1b), colocando em dúvida a relevância da hipótese dos rios como barreira nesse contexto em particular.

Alternativamente, estes padrões de diversificação poderiam ser consistentes com a hipótese dos refúgios com base em duas evidências: 1) duas das datas de divergência entre as diferentes linhagens de *Phoenicircus* estão situadas no Pleistoceno tardio, um período afetado por grandes oscilações climáticas (Fig. 2 e 3); e 2) os testes populacionais de neutralidade apoiam a existência de efeitos gargalo em três das quatro linhagens de *Phoenicircus* (Tabela 3). Entretanto, é importante notar que os cronogramas obtidos por inferência Bayesiana tanto com base exclusivamente no gene *cytb* como na abordagem coalescente multi-locus estimaram os eventos de divergência relacionados às linhagens de *Phoenicircus* como ocorrendo ao longo do Plio-pleistoceno, justamente o período de consolidação do sistema hidrográfico amazônico atual (Rossetti *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2006). Não menos importante, o fato de uma das linhagens de *Phoenicircus* não ter exibido sinais de gargalo populacional recente é também inconsistente com um papel amplo para os refúgios Pleistocênicos como formadores de linhagens de aves na região Amazônica, conforme verificado para outras linhagens de aves associadas a florestas de terra-firme

(Aleixo 2004; Ribas *et al.* 2012; Fernandes *et al.* No prelo). Além disso, como já havia sido esclarecido anteriormente, o baixo número amostral utilizado nas análises populacionais deve ser levado em consideração, não permitindo, portanto, conclusões precipitadas quanto à inferência de cenários de diversificação para *Phoenicircus*. Com base nisso, interpretamos o padrão espaço-temporal de diversificação do grupo como resultante do estabelecimento da bacia Amazônica como uma drenagem transcontinental durante este período (Rossetti *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2006; Latrubesse *et al.*, 2010), conforme também inferido para o gênero co-distribuído *Psophia* (Ribas *et al.*, 2012).

Assim como verificado para *Psophia*, o primeiro evento de diversificação em *Phoenicircus* ocorreu aproximadamente a 2,6 Ma (de acordo com o relógio molecular gerado apenas com base no gene *cytb*; Fig. 3), separando o gênero em duas linhagens ao norte e ao sul do atual curso do Rio Amazonas (Escudo das Guianas e porção noroeste do escudo Brasileiro, respectivamente; Fig. 3, nó 1). Analisando dados genéticos (Fig. 4A) em conjunto com evidências paleogeográficas, podemos inferir que a distribuição ancestral de *Phoenicircus* foi possivelmente semelhante a observada para *Psophia*, sendo restrita inicialmente a porção leste da Amazônia, com uma subsequente expansão em direção a oeste (Ribas *et al.*, 2012). Estes cenários corroboram recentes descobertas geológicas que relacionam o surgimento do rio Amazonas ao final do Plioceno / começo do Pleistoceno (Latrubesse *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2006). De modo similar, a região do baixo Rio Negro tem sofrido constantes alterações de paisagem como resultado de atividades neotectônicas (Almeida-Filho & Miranda, 2007), servindo como barreira para as linhagens *P.carnifex* (n) e *P. nigracollis* há aproximadamente 1.0 Ma (Figs. 2 e 3). Este padrão é também consistente com o período de formação do baixo Rio Negro por volta de 1.0 – 0.7 Ma estimado a partir dos dados filogeográficos do gênero *Psophia* (Ribas *et al.*, 2012).

A alopatria observada em *P. nigracollis* também pode ter sido gerada como consequência das características geomorfológicas da região do baixo Rio Negro, que podem ter conectado em momentos distintos afluentes correspondentes às atuais bacias do Negro e Solimões através de paleo-deltas (Wilkinson *et al.*, 2010), permitindo a colonização e posterior diferenciação de *P. nigracollis* (e) ao sul do Amazonas – Solimões, um processo que se completou bem mais recentemente (i.e., ca. de 0.3 Ma; Fig. 3), sendo tentativamente correlacionado com eventos neotectônicos na região central da Amazônia iniciados a 0.4 Ma (Soares *et al.*, 2010). A ausência de qualquer linhagem de *Phoenicircus* diretamente ao sul do rio Solimões e a oeste do rio Madeira na região conhecida como área de endemismo Inambari é surpreendente e de difícil explicação, sendo talvez, a mais simples, um evento de extinção

das populações locais. O mesmo padrão de distribuição com uma lacuna de ocorrência na mesma área de endemismo foi detectado para pelo menos uma segunda outra linhagem de ave associada a florestas de terra-firme na Amazônia: o gênero *Hylopezus* (Grallariidae; Carneiro *et al.*, 2012). Em razão dos hábitos sedentários e não migratórios de *Phoenicircus*, que estabelecem arenas de exibição fixas ao longo de vários anos num mesmo local (Snow, 2004), é possível minimizar bastante a possibilidade de eventos de dispersão de longa distância ou do tipo “island hopping” através dos rios pré-existentis para explicar a alopatría atual das duas populações reciprocamente monofiléticas de *P. nigricollis*.

Com base nesse cenário geral, a hipótese mais bem apoiada pelos dados do presente estudo é que *P. carnifex* (s) e *P. nigricollis* (e) entraram em contato bem recentemente e, provavelmente, em função da penetração também recente da linhagem ancestral de *P. nigricollis* ao sul do rio Amazonas – Solimões, que teria entrado em contato com populações de *P. carnifex* (s) estabelecidas na região dos baixos rios Tapajós e Madeira (Fig. 1). Conforme destacado anteriormente, o nível de introgressão entre estas populações parece não ter comprometido a integridade de suas trajetórias evolutivas diferenciadas, conforme mostrado pelos padrões de diferenciação genética e de plumagem, que claramente as diagnosticam plenamente como dois grupos, mesmo na área de introgressão (Figs. 1 e 2). Os espécimes de *P. carnifex* (s) ARA095 – MPEG72382 e ARA059 – MPEG72383 (coletados numa mesma localidade; ver Apêndice A), também vieram da mesma zona que o indivíduo híbrido (foram coletados no mesmo interflúvio, a menos de 50 km de distância), agrupando-se geneticamente com os demais indivíduos do *P. carnifex* (s), conforme esperado (Fig. 1). É difícil postular como estas duas linhagens teriam entrado em contato, ainda mais se considerando seus hábitos sedentários associados ao interior da floresta de terra-firme, mas uma “quebra” de barreiras ripárias pode ser uma possibilidade. É possível que um mesmo tipo de evento de captura de drenagem, como o documentado para o rio Negro (Almeida-Filho & Miranda, 2007), tenha acontecido também na baixa porção do rio Tapajós, levando ao contato entre populações de *P. carnifex* (s) e *P. nigricollis* (e). Embora aparentemente não existam dados geológicos apoiando diretamente esta hipótese, um padrão muito similar foi observado para o passeriforme *Glyphorynchus spirurus* (Dendrocolaptidae), onde as populações de ambas as margens do baixo rio Tapajós são irmãs, com a exclusão daquelas das porções mais altas da margem oeste do rio, correspondentes ao centro de endemismo Rondônia (mesma região habitada também por *P. nigricollis* [e] (Fernandes *et al.*, 2012). Conforme discutido por Fernandes *et al.* (2012), eventos de captura de drenagem podem obscurecer padrões de diferenciação correlacionados com rios Amazônicos, mas de modo algum invalidam a

aplicabilidade da hipótese dos rios como barreira para explicá-los, uma vez que é justamente a mudança da barreira que ocasiona a cessação do seu efeito vicariante, possibilitando o contato entre as linhagens diferenciadas que podem se hibridizar ou não, conforme demonstrado pelo gênero *Phoenicircus*.

5. CONCLUSÃO

A história de evolução de *Phoenicircus* parece ter sido delineada por dois tipos de eventos vicariantes, inicialmente pela formação dos principais rios da Amazônia e mais recentemente por eventos de captura de drenagem resultantes da atividade de placas neotectônicas localizadas na região central amazônica. Nosso trabalho corrobora em grande parte um modelo paleobiogeográfico proposto recentemente para Amazônia (Ribas *et al.*, 2012), onde os principais rios da região são tidos como agentes de diversificação primários entre diferentes linhagens proximamente relacionadas.

Nossos resultados são contrastantes com a taxonomia atual do gênero *Phoenicircus*, baseada apenas na morfologia externa (plumagem), e sugerem que as populações de *P. carnifex* separadas ao norte e ao sul do rio Amazonas se tratam de espécies distintas. No caso de *P. nigricollis*, apesar da divergência recente entre suas populações alopátricas, estas já se apresentam reciprocamente monofiléticas, evidenciando que um tratamento taxonômico diferencial também deve ser considerado neste caso.

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.

Aleixo, A. 2007. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 15, 229–242.

Aleixo, A. & Rossetti, D.F. 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithology*, 148, 443–453.

Almeida-Filho, R. & Miranda, F.P. 2007. Mega capture of the Rio Negro formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: Evidences in SRTM digital elevation model. *Remote Sensing Environment*, 110, 387–393.

Anderson, E. 1949. *Introgressive Hybridization*. Wiley, New York.

Bates, J.M. 2001. Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic pattern of diversification. In: Vieira I, D'Incão M.A, Silva J.M.C, Oren, D. (eds) *Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia*. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 119–138.

Bates, J.M., Hackett, S.J. & Goerck, J.M. 1999. High levels of mitochondrial DNA differentiation in two lineages of antbirds (*Drymophila* and *Hypocnemis*). *The Auk*, 116, 1093–1106.

Brandley, M. C., Schmitz, A. & Reeder, T. W. 2005. Partitioned Bayesian analyses, partition choice, and the phylogenetic relationships of scincid lizards. *Systematic Biology*, 54, 373–390.

- Brumfield, R.T. 2010. Speciation genetics of biological invasions with hybridization. *Molecular Ecology*, 19, 5079–5083.
- 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. *Systematic Biology*, 57, 719–731.
- Campbell Jr, K.E., Frailey, C.D. & Romero-Pittman, L. 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, lateNeogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 239, 166–219.
- Capparella, A.P. 1991. Neotropical avian diversity and riverine barriers. *Proceedings of the International Ornithological Congress*, 20, 307–316.
- Carling, M. D. & Brumfield, R.T. 2008. Haldane's Rule in an avian system: using cline theory and divergence population genetics to test for differential introgression of mitochondrial, autosomal, and sex-linked loci across the *Passerina* bunting hybrid zone. *Evolution*, 62, 2600–2615.
- Carneiro, L., Gonzaga, L.A.P., Rego, P.S., Sampaio, I., Schneider, H. & Aleixo, A. 2012. Systematic revision of the Spotted Antpitta *Hylopezus macularius* (Grallariidae), with description of a cryptic new species from Brazilian Amazonia. *The Auk* 129 (2): 338–351.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7, 214.
- Excoffier, L., Smouse, P. & Quaitro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.

Fernandes, A.M., Wink, M. & Aleixo, A. 2012. Molecular phylogeography of Chestnut-tailed Antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. *Journal of Biogeography*: doi:10.1111/j.1365-2699.2012.02712.x, 1–12.

Figueiredo, J., Hoorn, C., van der Ven, P. & Soares, E. 2009. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology*, 37, 619–622.

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

Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation*, 6, 451–477.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–96.

Heled, J. & Drummond, A. J. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 570–580.

Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A., & Lorente, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, 23, 237–240.

Hoorn, C., Wesselingh, F.P., ter Steege, H., Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C.L., Figueiredo, J.P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F.R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T. & Antonelli, A. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330, 927–931.

INFONATURA: Birds, mammals, and amphibians of Latin America [web application]. 2007. Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Disponível online no sitio: <<http://www.natureserve.org/infonatura>>.

Irestedt, M., Fjeldså, J., Nylander, J.A.A. & Ericson, P.G.P. 2004a. Phylogenetic relationships of typical antbirds (Thamnophilidae) and test of incongruence based on Bayes factors. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 1–23.

Irestedt, M., Fjeldså, J. & Ericson, P.G.P. 2004b. Phylogenetic relationships of woodcreepers (Aves: *Dendrocolaptinae*) – incongruence between molecular and morphological data. *Journal of Avian Biology*, 35, 280–288.

Irion, G. & kalliola, R. 2010. Long-term landscape development processes in Amazonia. *Amazonia: landscape and species evolution a look into the past* (ed. by C. Hoorn and F.P. Wesselingh), pp. 203–215. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

Jaramillo, C., Rueda, M.J. & Mora, G. 2006. Cenozoic Plant Diversity in the Neotropics. *Science*, 311, 1893–1896.

Kirwan, G.M. & Green, G. 2012. *Cotingas and Manakins*. Princeton University Press, Princeton.

Kuhner, M.K. 2008. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution*, 24 (2), 86–93.

Latrubesse, E.M., Cozzuol, M., Silva-Caminha, S.A.F., Rigsby, C.A., Absy, M.A. & Jaramillo, C. 2010. The late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth-Science Reviews*, 99, 99–124.

Mank, J.E., Carlson, J.E. & Brittingham, M.C. 2004. A century of hybridization: Decreasing genetic distance between American Black Ducks and Mallards. *Conservation Genetics*, 5, 395–403.

Marks, B.D., Hackett, S.J. & Capparella, A.P. 2002. Historical relationship 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.

Moritz, C., Patton, J.L., Schneider, C.J. & Smith, T.B. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 31, 533–563.

Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Ohlson J.I., Prum, R.O. & Ericson, G.P. 2007. A molecular phylogeny of cotingas (Aves: Cotingidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(1), 25-37.

Peters, J.L. 1979. In: Checklist of birds of the world. Vol. 8. Museum of comparative zoology, Cambridge, MA.

Prum, R.O., Rice, N.H., Mobley, J.A. & Dimmick, W.W. 2000. A preliminary phylogenetic hypothesis for the Cotingas (Cotingidae) based on mitochondrial DNA. *The Auk* 117, 236-241.

Rambaut A. & Drummond, A. 2007. TRACER, Version 1.4. Disponível online no sitio: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>

Rand D.M. 1996. Neutrality tests of molecular markers and the connection between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. *Conservation Biology*, 10, 665-671.

Rheindt, F.E. & Edwards, S.V. 2011. Genetic introgression: an integral but neglected component of speciation in birds. *The Auk*, 128(4), 620–632.

Ribas, C.C., Aleixo, A. Nogueira, A.C.R., Miyaki, C.Y. & Cracraft, J. 2012. A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of The Royal Society B*, 279, 681–689.

- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. 2003. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Rossetti, D.F, Toledo, P.M., & Goés, A.M. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research*, 63,78–89.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496–2497.
- Salzburger, W., Ewing, G.B. & Von Haeseler, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20(9), 1952–63.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, F. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Snow, D.W. 1973. The classification of the Cotingidae (Aves). *Breviora*, 409, 1–27.
- Snow, D.W. 2004. Family Cotingidae (Cotingas). In: del Hoyo, J., Elliott, A. and Christie, D.A. (ed.). *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 9. Mousebirds to Hornbills. Barcelona, Lynx Edicions.
- Soares, E. A., Tatumi, S. H. & Riccomini, C. 2010. OSL age determinations of Pleistocene fluvial deposits in Central Amazonia. *Anais Acad. Bras. Ciências* 82, 1–9.
- Stephens, M., Smith, N. & Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Amer. J. Hum. Gen.* 68, 978–989.
- Stephens, M. & Donnelly, P. 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Amer. J. Hum. Gen.*, 73, 1162–1169.

- Trail, P. W. & Donahue, P. 1991. Notes on the behavior and ecology of the red-cotingas (Cotingidae: *Phoenicircus*). *The Wilson Bulletin*, 103, 539–551.
- Van der Hammen, T. & Hooghiemstra, H. 2000. Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. *Quaternary Science Reviews*, 19, 725 – 42.
- Xia, X., & Xie, Z. 2001. DAMBE: Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *J. Hered.* 92, 371–373.
- Wallace, A. R. 1852. On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 20, 107–110.
- Weir, J.T. & Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*, 17(10), 2321–2328.
- Wesselingh, F.P., Räsänen, M.E., Irion, G., Vonhof, H.B., Kaandorp, R., Renema, W., Romero Pittman L. & Gingras, M. 2002. Lake Pebas: a palaeoecological reconstruction of a Miocene, long-lived lake complex in western Amazonia, *Cainozoic Research*, 1, 35–81.
- Wesselingh, F.P. & Salo, J.A. 2006. A Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica*, 133, 439–458.
- Wilkinson, M.J., Marshall, L.G., Lundberg, J.G. & Kreslavsky, M.H. 2010. Megafan environments in northern South America and their impact on Amazon Neogene aquatic ecosystems. *Amazonia: landscape and species evolution a look into the past* (ed. by C. Hoorn and F.P. Wesselingh), pp. 162–184. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Zink, R.M. 2004. The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of The Royal Society B*, 271, 561–564.

APÊNDICE A- Sumário dos espécimes de *Phoenicircus* utilizados no presente estudo e suas respectivas localidades de coleta

MPEG	Código	Táxon (população)	Localidade
65079	CN 334	<i>P. carnifex</i> (n)	Brasil, Pará, Município de Óbidos, Flota do Trombetas (00°57'S; 55°31'W)
65518	CN 576	<i>P. carnifex</i> (n)	Brasil, Pará, Município de Alenquer, ESEC Grão-Pará (00°09'S; 55°11'W)
65519	CN 396	<i>P. carnifex</i> (n)	Brasil, Pará, Município de Alenquer, ESEC Grão-Pará (00°09'S; 55°11'W)
65920	CN 779	<i>P. carnifex</i> (n)	Brasil, Pará, Município de Oriximiná, ESEC Grão Pará (01°17'S; 58°41'W)
66553	CN 1198	<i>P. carnifex</i> (n)	Brasil, Pará, Município de Almeirim, FLOTA Paru (00°56'S; 53°14'W)
53937	FT 144	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Belterra, FLONA do Tapajós, Rodovia Santarém-Cuiabá km 83 (03°06'S; 55°00'W)
61928	PPBIO 255	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Portel, FLONA de Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
61929	PPBIO 297	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Portel, FLONA de Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
61931	PPBIO 299	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Portel, FLONA de Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
61932	PPBIO 321	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Portel, FLONA de Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
67674	PIME 129	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Placas, Assentamento Comunidade Fortaleza (03°29'S; 54°33'W)

70892	JRT2001	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Juruti, margem esquerda Tapajós (02°25'S; 55°58'W)
72383	ARA 059	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Santarém, Resex Tapajós, Arapiuns (02°47'S; 55° 36'W)
72382	ARA 095	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Santarém, Resex Tapajós, Arapiuns (02°47'S; 55° 36'W)
73214	PIME 537	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Belterra, FLONA do Tapajós, Rodovia Santarém-Cuiabá km 83 (03°06'S; 55°00'W)
73215	PIME 538	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Belterra, FLONA do Tapajós, Rodovia Santarém-Cuiabá km 83 (03°06'S; 55°00'W)
73216	PIME 539	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Belterra, FLONA do Tapajós, Rodovia Santarém-Cuiabá km 83 (03°06'S; 55°00'W)
73217	PIME 540	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Belterra, FLONA do Tapajós, Rodovia Santarém-Cuiabá km 83 (03°06'S; 55°00'W)
73218	PIME 541	<i>P. carnifex</i> (s)	Brasil, Pará, Município de Belterra, FLONA do Tapajós, Rodovia Santarém-Cuiabá km 83 (03°06'S; 55°00'W)
59037	MPDS 792	<i>P. nigricollis</i> (e)	Brasil, Amazonas, Município de Humaitá, Território Indígena Ipixuna, Aldeia Canavial, Miriti (06°33'S; 62°03'W)
59038	MPDS 793	<i>P. nigricollis</i> (e)	Brasil, Amazonas, Município de Humaitá, Território Indígena Ipixuna, Aldeia Canavial, Miriti (06°33'S; 62°03'W)
59260	BR 163-134	<i>P. nigricollis</i> (e)	Brasil, Pará, 20 km SW de Novo Progresso (07°11'S; 55°29'W)
65563	AT 013	<i>P. nigricollis</i> (e)	Brasil, Pará, Município de Trairão, APA Tapajós, margem esquerda Rio Novo (06°49'S; 56°07'W)
65711	MPDS 1283	<i>P. nigricollis</i> (e)	Brasil, Pará, Município de Jacareacanga, FLONA Rio Pacu, Igarapé Preto (06°16'S; 57°39'W)

59709	AMZ 051	<i>P. nigricollis</i> (w)	Brasil, Amazonas, Municipio de Novo Airão, Igarapé-Açu, Estrada Manacapuru-Novos Airão km 75 (02°51'S; 60°52'W)
63157	JAP 570	<i>P. nigricollis</i> (w)	Brasil, Amazonas, Municipio de Japurá, Rio Acanauí (01°56'S; 66°36'W)
63158	JAP 376	<i>P. nigricollis</i> (w)	Brasil, Amazonas, Municipio de Japurá, Rio Acanauí (01°56'S; 66°36'W)
63160	JAP 158	<i>P. nigricollis</i> (w)	Brasil, Amazonas, Municipio de Japurá, Rio Mapari (02°02'S; 67°17'W)
63161	JAP 157	<i>P. nigricollis</i> (w)	Brasil, Amazonas, Municipio de Japurá, Rio Mapari (02°02'S; 67°17'W)
72611	AMA 191	<i>P. nigricollis</i> (w)	Brasil, Amazonas, Município de Tabatinga, Assentamento do INCRA (04°11'14''S; 69°53'23,4''W)
