



Filogenia molecular do gênero *Nystalus* (Bucconidae, Aves): enfoque na estruturação populacional em *N. maculatus* e *N. chacuru*

Samira Rezende Duarte

Orientador: Dr. Renato Caparroz

Brasília- DF
Fevereiro de 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Filogenia molecular do gênero *Nystalus* (Bucconidae, Aves): enfoque na estruturação populacional em *N. maculatus* e *N. chacuru*

Samira Rezende Duarte

Orientador: Dr. Renato Caparroz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal como parte dos requisitos básicos para obtenção do título de Mestra em Biologia Animal.

Brasília- DF
Fevereiro de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Samira Rezende

**Filogenia molecular do gênero *Nystalus* (Bucconidae, Aves):
ênfoque na estruturação populacional em *N. maculatus* e *N.
chacuru***

76 páginas

**Dissertação Mestrado – Instituto de Biologia da Universidade
de Brasília - Departamento de Genética e Morfologia**

1- *Nystalus*, 2- Neotrópico, 3- Divergência, 4- Filogeografia.

Dissertação de Mestrado

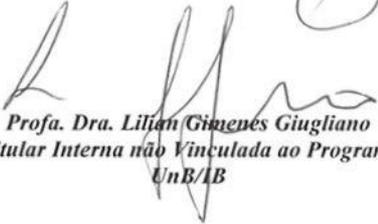
SAMIRA REZENDE DUARTE

Título:

“Filogenia molecular do gênero *Nystalus* (Bucconidae, Aves): enfoque na estruturação populacional em *N. maculatus* e *N. chacuru*”

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Renato Caparroz
Presidente / Orientador
UnB


Profa. Dra. Lilian Gimenes Giugliano
Titular Interna não Vinculada ao Programa
UnB/IB


Prof. Dr. Luis Fábio Silveira
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
USP

Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB/IB

Brasília, 26 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Renato Caparroz pela oportunidade, toda liberdade e confiança depositada em mim para realização deste presente trabalho, além de sua indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis.

Aos curadores dos museus nacionais que concederam amostras de tecido, Alexandre Aleixo (GOELDI), Marcos André Raposo (MNRJ) e de forma especial ao Luis Fábio (MZUSP) que também viabilizou a importação das amostras provenientes dos museus internacionais. Também quero agradecer ao professor responsável pela COMB, Miguel Marini e sua aluna de pós-graduação Gabriela pela coleta e concessão de algumas amostras.

Aos curadores dos museus internacionais Hein Van Grouw (AMNH), Frederick H. Sheldon (LSUZ), Jon Fjeldsa (ZMUC) e Mark B. Robbins (UK) e Christopher Witt (UNM) pela confiança depositada.

Aos professores Lilian Gimenes Giugliano, Luis Fábio Silveira, Silviene Fabiana de Oliveira, por terem aceitado participar da banca avaliadora.

A todos do LabGenBio, companheiros de alegrias e aflições e de forma especial a turma do Pequi: Diogo, Gislaine, Rosana e Vivian pela amizade e apoio esses anos.

Aos amigos de Brasília Dário, Wallace e Vanusa pela hospedagem, além de amizade e carinho, me abrigando nos primeiros meses de candanga.

Os meus pais João e Valdenice que sempre me apoiaram em minhas escolhas, me incentivando e aconselhando.

Ao meu marido Diego Pablo pela paciência, amor, amizade e companheirismo demonstrado.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal (BioAni) e a Capes pelo auxílio financeiro.

A todos os funcionários do Instituto de Biologia que me auxiliaram todos esses anos, vocês simplesmente foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos do apoio moral de cada dia.

Todos aqueles que colaboraram de forma direta e indireta, o meu **MUITO OBRIGADO!!!**

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
REFERÊNCIAS	8
CAPITULO 1	10
RESUMO	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	14
Amostragem	14
Extração de DNA	15
Marcadores moleculares	15
Análises genéticas	16
Relógio Molecular	17
RESULTADOS	18
Diversidade molecular	18
Análises filogenéticas	20
Relógio molecular e tempo de divergência	26
DISCUSSÃO	28
Hipóteses biogeográficas relacionado com os processos de divergência das espécies do gênero <i>Nystalus</i>	30
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
CAPITULO 2	37

RESUMO	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIA E MÉTODOS	40
Amostragem	40
Extração de DNA	40
Marcadores moleculares	41
Análises populacionais	42
Distância genética	42
Influência da diversidade genética e cálculo AMOVA	42
Construção de rede de haplótipos	42
RESULTADOS	43
Divergência genética	43
Índices de diversidade nucleotídica e haplotípica	43
Rede de haplótipos	43
Análise da variância molecular (AMOVA)	47
<i>N. chacuru</i>	47
<i>N. maculatus</i>	47
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
CONCLUSÃO GERAL	52
ANEXOS	54

RESUMO GERAL

A família Bucconidae (Aves: Galbuliformes) é exclusiva da região Neotropical, abriga 12 gêneros e 38 espécies, e ainda, 77 subespécies, sendo que três espécies encontram-se ameaçadas de extinção. Nesta família, se destaca o gênero *Nystalus*, com sete espécies: *N. chacuru* (Vieillot, 1816), *N. maculatus* (Gmelin, 1788), *N. striolatus* (Pelzeln, 1856), *N. striatipectus* (Silva, 2001), *N. radiatus* (Sclater, 1854), *Nystalus obamai* (Whitney *et al.*, 2013) e *N. torridus* (Bond & Meyer de Schauensee, 1940). Apresentam uma ampla distribuição na América do Sul, com representantes nos principais biomas, como também na região andina. Portanto, os objetivos deste trabalho foram: validar a taxonomia atual das espécies do gênero *Nystalus* com base em sequências de DNA, assumindo o conceito filogenético de espécies; identificar o processo temporal de diversificação das espécies deste gênero, e elucidar os padrões filogeográficos de *N. chacuru* e *N. maculatus*, com intuito de entender como os eventos históricos podem ter contribuído para moldar a distribuição atual da variabilidade genética nestas duas espécies. Para isso, foi utilizado um fragmento de DNA mitocondrial do gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) e um segmento de DNA nuclear da região do íntron 5 do β -fibrinogênio (FIB5). As análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (IB). As análises populacionais para *N. chacuru* e *N. maculatus* foram realizadas por meio da construção de rede de haplótipos e análise de variância molecular (AMOVA). Os resultados obtidos evidenciaram incongruências entre os segmentos de DNA utilizados, além de incongruência entre o gene mitocondrial para os diferentes métodos filogenéticos empregados. No entanto, foi possível inferir que as espécies do gênero *Nystalus* apresentam duas linhagens principais: uma de ocorrência em áreas florestais e outra de ocorrência em áreas de vegetação aberta. Com exceção de *N. obamai* e *N. striolatus*, as demais espécies do gênero formaram linhagens monofiléticas para o gene ND2, porém estas linhagens não foram claramente identificadas com base no segmento nuclear. De acordo com a hipótese do relógio molecular, as espécies do gênero *Nystalus* se separaram dos outros gêneros da família Bucconidae provavelmente no Mioceno. *N. striatipectus* e *N. maculatus* se instalaram nas regiões do centro oeste do Brasil, e posteriormente foram sobrepostas com *N. chacuru*. Já *N. torridus* dispersou para o extremo leste do Brasil, enquanto *N. striolatus*/*N. obamai* permaneceram próximos ao rio Madeira no Amazonas e *N. radiatus* se dispersou para o extremo oeste da América do Sul. Os resultados para análises populacionais das espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus* indicam estruturação das populações, já que os valores de ϕ ST foram altos, também apresentaram uma diversidade haplotípica alta, como também uma alta variação. A rede de haplótipos não apresentou nenhum compartilhamento de haplótipos, corroborando com a taxonomia atual, visto que ocorre uma alta diferenciação genética.

Palavras-chave: conservação, DNA mitocondrial, FIB 5, estrutura genética, sistemática.

ABSTRACT

The Bucconidae family (Aves: Galbuliformes) is exclusive to the Neotropics and has 12 genera and 38 species, and yet, 77 subspecies, with three species are endangered. In this family, we highlight the genus *Nystalus*, with seven species: *N. chacuru* (Vieillot, 1816), *N. maculatus* (Gmelin, 1788), *N. striolatus* (Pelzeln, 1856), *N. striatipectus* (Silva, 2001), *N. radiatus* (Sclater, 1854), *Nystalus obamai* (Whitney *et al.*, 2013) e *N. torridus* (Bond & Meyer de Schauensee, 1940). They Show a wide distribution in South America, with representatives in major biomes, as well as in the Andean region. Therefore, the objectives of this study were to validate the current taxonomy of species of the genus *Nystalus* based on DNA sequences, assuming the phylogenetic species concept; identify the temporal process of diversification of species of this genus, and elucidate the phylogeographic patterns of *N. chacuru* and *N. maculatus*, aiming to understand how historical events may have contributed to shaping the present distribution of genetic variability in these two species. For this, was used a mitochondrial DNA fragment of NADH dehydrogenase subunit 2 gene (ND2) and nuclear DNA segment of intron region 5 of β -fibrinogen (FIB5). The phylogenetic analyzes were performed by methods of maximum likelihood (ML) and bayesian inference (IB). The time of divergence of the species was estimated from the molecular clock hypothesis and population analyzes were performed through the construction of haplotype network and analysis of molecular variance (AMOVA). The results showed inconsistencies between the DNA segments used in addition to the inconsistency between the mitochondrial genes for different phylogenetic methods. However, it was possible to infer that the species of the genus *Nystalus* have two main lines: one to occur in forests and other vegetation to occur in open areas. Except for *N. obamai* and *N. striolatus*, the other species of the genus formed monophyletic lineages for the ND2 gene, but these clades have not been clearly identified based on nuclear segment. According to the hypothesis of the molecular clock, the species of the genus *Nystalus* separated from other genus Bucconidae family probably in the Miocene. *N. striatipectus* and *N. maculatus* settled in the regions of west central Brazil, and were later superimposed with *N. chacuru*. *N. torridus* already scattered to the far east of Brazil, while *N. striolatus* / *N. obamai* little remained near the Madeira River in the Amazon and *N. radiatus* dispersed to the west tip of South America. The results population analysis *N. chacuru* and *N. maculatus* populations indicate structuring, since high ϕ_{ST} values were also showed high haplotype diversity, as well as a high variance. The haplotype network did not show any haplotype sharing, supporting the current taxonomy, since a high genetic differentiation occurs.

Keywords: conservation, mitochondrial DNA, FIB 5, genetic structure, systematic.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Bucconidae é uma das linhagens de aves com distribuição exclusivamente neotropical. Pertence atualmente a ordem Galbuliformes, juntamente com a família Galbulidae (del Hoyo *et al.*, 2013). Entretanto, estas famílias já foram anteriormente agrupadas na ordem Piciformes (Beddard, 1989). Estudos com dados morfológicos descreveram que o músculo longo com três extremidades teria dado origem ao dedo zigodactilo, e uma longa cabeça desenvolvida no seu interior teria dado origem a IV troclea tarso-metatarso. O que sugeriu outrora um compartilhamento de ancestralidade com a ordem Piciformes, levando a união dos Galbuliformes como uma subordem dentro de Piciformes, denominada Galbulae (Figura 1) (Simpson & Cracraft, 1981; Swierczewski & Raikow, 1981).

Entretanto, outro trabalho foi realizado com base em caracteres morfológicos, partindo de estudos da variação muscular do membro posterior, levando os autores a concluir que as subordens Galbulae e Pici eram, na verdade, bastante diversificadas, sugerindo a presença de caracteres derivados (sinapomórficos) (Raikow & Cracraft, 1983).

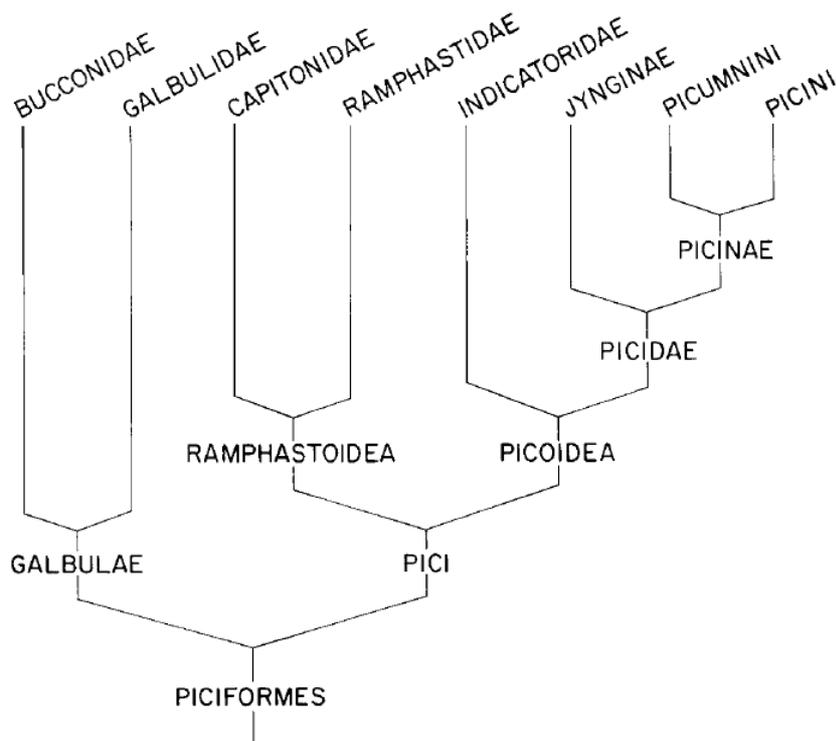


Figura 1. Cladograma dos Piciformes, suas subordens e a relação evolutiva entre as famílias baseado no trabalho de Swierczewski & Raikow (1981).

Concomitantemente, Olson (1983) na tentativa de se obter evidências para a origem polifilética para o grupo, tomando como foco principal os pés zigodactilos, que até então sustentava Galbuliformes dentro de Piciformes e também era uma característica compartilhada por Psittaciformes e Cruciformes, chegando a conclusão de que, na verdade, a origem para esses grupos eram distintas, sugerindo evolução convergente. Portanto, Galbulae seria um grupo distinto de Piciformes.

Sick (1997) agrupa os Bucconidae e Galbulidae dentro da ordem Piciformes, mas destaca certas semelhanças com os Alcedinidae da ordem Coraciformes. O autor destaca ainda que estas semelhanças indicam proximidade filogenética entre estes grupos. O que foi comprovado por estudos moleculares a partir de sequências de DNA nuclear (Johansson & Ericson, 2003). Estudos de hibridização de DNA colocaram a família Bucconidae juntamente com os galbulideos como famílias distintas de Pici, reunindo-as na ordem Galbuliformes (Sibley & Ahlquist, 1990). O termo Galbuliformes foi descrito inicialmente por Fürbringer (1888) e adotada no *Handbook of the birds of the World* (del Hoyo *et al.*, 2013) e pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2014), sendo esta ordem composta pelas famílias Bucconidae e Galbulidae. Portanto, está foi a nomenclatura adotada neste trabalho.

A família Bucconidae é formada por 12 gêneros e 38 espécies e 77 subespécies, com três espécies ameaçadas de extinção (del Hoyo *et al.*, 2013). Destacam-se as espécies do gênero *Nystalus* por apresentarem um padrão morfológico bem peculiar com a cabeça grande e larga, pescoço curto e plumagem eriçada com cerdas proeminentes, aparentando ter um corpo maior e mais pesados do que realmente possuem. Possuem também pés zigodáctilos, alimentam de insetos e pequenos vertebrados e nidificam em tocas no solo que são escavados pelo macho e pela fêmea (Ladeira & Höfling, 2007). Os ninhos são construídos em galerias escavadas no solo acidentado ou em barrancos, e às vezes em terrenos planos ou em cupinzeiros arborícolas, a incubação é feita pelo casal pelo período de 15 dias (Sick, 1997).

O gênero *Nystalus* é composto por sete espécies, seis são encontradas no Brasil (CRBO, 2014) e uma encontrada na região andina e também na América Central (del Hoyo *et al.*, 2013) (Figura 2). A maioria delas apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontradas em diferentes biomas brasileiros, conforme descrito a seguir:

- *N. chacuru* (Vieillot, 1816) - Aproximadamente 20-22 cm de comprimento, sua plumagem é bem caracterizada por apresentar a região peitoral branca, região da

garganta preta e dorso barrado. Caracterizado por apresentar distribuição pela Mata Atlântica, Cerrado e Chaco; são encontrados em regiões abertas com vegetação dispersa, borda de floresta tropical, mata de galeria e floresta aberta, apresenta duas subespécies descritas: *N. c. uncirostris* (Stolzmann, 1926) com distribuição pelo leste do Peru, nordeste da Bolívia e adjacente ao Brasil; e *N. c. chacuru* (Vieillot, 1816), com distribuição pelo nordeste, leste e sul do Brasil, leste do Paraguai e nordeste da Argentina (del Hoyo, 2013);

- *N. maculatus* (Gmelin, 1788) - medindo aproximadamente 18 a 19 cm de comprimento é reconhecido por possuir peito e lados do corpo com contrastantes manchas codiformes negras (Silva, 1991). Com distribuição pela Caatinga, Cerrado brasileiro e Paraguai; encontrado em regiões de savana, caatinga e palmeiras, ocupando várzea e floresta semi-decídua, borda de floresta, arbustos, pastagens e cultivo (del Hoyo *et al.*, 2013).
- *N. obamai* (Whitney *et al.*, 2013) –comprimento corporal é de aproximadamente 20-21 cm, possui distribuição pelo oeste da Amazônia, leste do Equador, leste do Peru, Norte e Centro da Bolívia e oeste do Brasil e habita regiões florestais (del Hoyo *et al.*, 2013);
- *N. radiatus* (Sclater, 1854) - com aproximadamente 22 cm de comprimento e distribuição pelo Panamá, Colômbia e Equador, habita regiões de floresta úmida, bordas de mata e regiões de clareira. Ocorrem regularmente regiões de até 900m, e localmente até pelo menos 1675m de altitude (Mindó, Equador) (del Hoyo *et al.*, 2013);
- *N. striolatus* (Pelzeln, 1856) - tamanho aproximado de 20-21 cm de comprimento e com distribuição pelo centro do Brasil e extremo nordeste da Bolívia, com habitat em borda de floresta úmida tropical de várzea, terra firme e de baixa altitude (del Hoyo *et al.*, 2013);
- *N. striatipectus* (Silva, 1991) - Morfologicamente difere de *N. maculatus* por possuir peito e lados do corpo com finas estrias longitudinais negras (Silva, 1991). Apresenta tamanho corporal de aproximadamente 18-19 cm, é encontrado no Chaco, floresta subtropical seca, floresta de transição, manchas isoladas e em regiões montanhosas (del Hoyo *et al.*, 2013);
- *Nystalus torridus* (Bond & Meyer de Schauensee, 1940) - tamanho aproximado de 20-21 cm de comprimento, distribui-se pelo leste do Pará e Tocantins, e sul do

Amazonas, diferindo do *N. striolatus* por apresentarem coloração mais maçante com estrias baixas mais amplas (del Hoyo *et al.*, 2013).

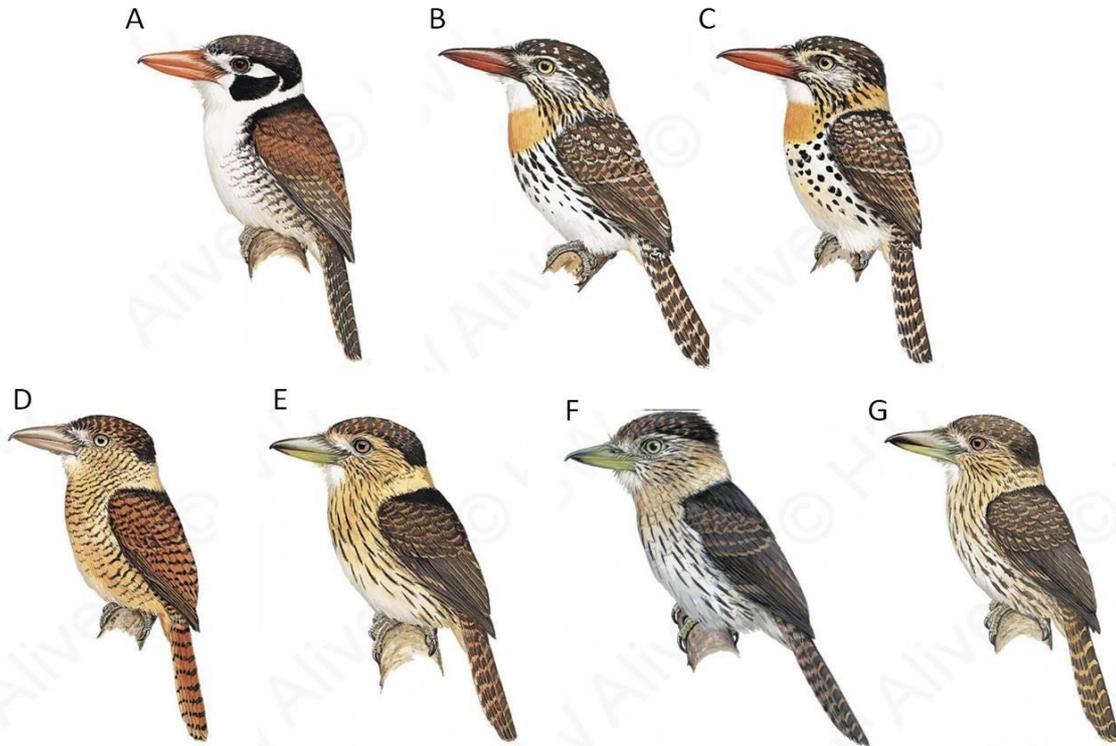


Figura 2. Espécies do gênero *Nystalus*: A) *Nystalus chacuru*, B) *Nystalus striatipectus*, C) *Nystalus maculatus*, D) *Nystalus radiatus*, E) *Nystalus striolatus*, F) *Nystalus obamai* e G) *Nystalus torridus*. Imagens extraídas do Handbook of the Birds of the World (del Hoyo *et al.*, 2013).

Apesar da ampla distribuição, poucos trabalhos foram realizados buscando compreender as relações evolutivas entre as espécies deste gênero. Silva (1991), analisando características biométricas e padrões de coloração da plumagem, sugere o *status* de espécie para duas subespécies de *N. maculatus*: *N. m. striatipectus* e *N. m. maculatus*, e sinonimiza outras duas deste complexo (*N. m. parvirostris* e *N. m. pallidigula*). Segundo o autor, estas duas subespécies são morfologicamente bastante similares, diferenciando apenas no padrão de coloração da região peitoral, o que foi indício para separação em unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Contudo, este arranjo não é amplamente aceito, sendo que em publicações de referência como o *Handbook of the Birds of the World* (del Hoyo *et al.*, 2013), estes *taxa* ainda são considerados como subespécies de *N. maculatus*. Um segundo trabalho filogenético foi realizado por Witt (2004) para 35 espécies da família Bucconidae, 18 espécies da família Galbulidae e 10 espécies da família Momotidae, utilizando três genes mitocondriais (*cit b*, ND2, ND3) e

dois fragmentos nucleares (AK1 e FIB7). Neste trabalho, foram utilizadas amostras de cinco espécies do gênero *Nystalus*, excluindo *N. obamai* e *N. torridus*. O autor conclui que as espécies de *Nystalus* estudadas, formam um clado monofilético estando mais proximamente relacionada com as espécies do gênero *Bucco*.

Elucidar os padrões que contribuíram para a diversificação da biodiversidade ao longo do tempo geológico fornece a janela para a história da especiação, extinção, dispersão e o que levou ao padrão atual de distribuição espacial das espécies. Os dados filogenéticos moleculares fornecem avanços na construção de árvores e estimativas de tempo de divergência e tem possibilitado nossa interpretação dos padrões e a capacidade de estimar o tempo absoluto de eventos de especiação (Witt, 2004).

Estudos de espécies e populações que associam segmentos de DNA mitocondrial e nuclear vem crescendo consideravelmente para resolver incertezas filogenéticas (Pereira *et al.*, 2002; Pretti, 2007; Presti, 2010; Malvarer, 2011; Batista, 2012), como também para estudo de estrutura populacional e fluxo gênico em aves (Lopes, 2006; Ribeiro, 2013). O DNA mitocondrial constitui-se em um genoma pequeno (aproximadamente 16Kb nos animais), circular, apresenta herança materna e ausência de recombinação. É considerado um genoma compacto, pois raramente possui sequências espaçadoras, repetitivas, pseudogenes e íntrons (Arias *et al.*, 2003). Exibe uma alta taxa de substituição de nucleotídeos, chegando a ser da ordem de 5 a 10 vezes maior que aquela verificada para o DNA nuclear (Harrison, 1989). Estudos demonstraram ainda que essa taxa de substituição nucleotídica pode variar ao longo da molécula de DNA mitocondrial, entre os taxóons e ao longo do tempo evolutivo em uma mesma linhagem (Avisé, 1991; Strauss, 1999).

De forma similar, os segmentos nucleares estão se tornando uma importante ferramenta para a realização de reconstruções filogenéticas em aves. Estes também vem se mostrando muito informativos por possuírem menor grau homoplasia, viés de substituição e taxa de heterogeneidade entre sítios quando comparados com o DNA mitocondrial (Burlamarqui *et al.*, 2004). Trabalhar com sequências nucleares vem se mostrando cada vez mais vantajoso, pelo fato de aumentarem o número de lócus analisados de forma independente. Por outro lado, os segmentos do DNA mitocondrial são considerados como um único loco (Pretti, 2007). A crescente utilização de fragmentos nucleares de regiões de *íntrons* torna-se vantajoso também por apresentar regiões flanqueadas por exóons conservados, facilitando amplificação dessas regiões via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Além de possuírem um sinal filogenético também adequado para a resolução de

filogenias de aves com divergência recente (Burlamarqui *et al.*, 2004). Assim, a congruência entre as topologias obtidas com base em conjuntos de dados independentes (DNA mitocondrial e nuclear), possibilita que a árvore dos fragmentos reflita a árvore de espécies, e viabilize assim estimativas das relações filogenéticas com maior confiança (Doyle, 1992).

Os estudos filogeográficos apresentam como objetivo a investigação de princípios e os processos envolvidos na distribuição de linhagens genealógicas (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1994). A utilização da abordagem filogeográfica foi estabelecida por Avise (2000), possibilitando a interpretação de padrões de fluxo gênico, hibridação, fragmentação histórica da distribuição, expansão e especiação. Assim, comparar esses padrões dentro de um contexto inter e intraespecíficos de espécies co-distribuídas, permite avaliar como essas espécies independentes responderam aos mesmos processos históricos dentro da sua zona de distribuição geográfica (Avise *et al.*, 1987; Moritz & Faith, 1998).

Portanto, este trabalho se divide em dois capítulos. O primeiro, intitulado “Reconstruções filogenéticas para o gênero *Nystalus* (Aves: Bucconidae): levantamento de hipóteses biogeográficas”, basicamente aborda as relações filogenéticas e o processo de diversificação das sete espécies que compõe o gênero com base na análise de um fragmento do DNA mitocondrial e um do genoma nuclear. O segundo capítulo, intitulado “Distribuição espacial da variabilidade genética das espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus*”, busca por meio de uma abordagem filogeográfica compreender como os eventos históricos ao longo do tempo e espaço contribuíram para moldar a diversidade genética nestas duas espécies.

REFERÊNCIAS

- Arias, M.C.; Francisco, F.O.; Silvestre, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. UNESC. Criciúma. 2003.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E.; Reeb, C. A.; Saunders, N. C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 18. 489–522. 1987.
- Avise, J. C. Tem unorthox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Genet.* 25. 45-69. 1991.
- Avise, J. C. *Molecular Markers. Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. New York. 1994.
- Avise, J. C. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press. 2000.
- Batista, R. S. S. Filogeografia e limites inter-específicos em *Dendrocolaptes certhia* (Aves: Dendrocolaptidae). Programa de pós-graduação em zoologia. Universidade Federal do Pará. Museu Paraense Emílio Goeldi. 2012.
- Beddard, F. E. *The structure and classification of birds*. London: Longmans. p. 548. 1989.

- Burlamarqui, T. C. T.; Silva, A.; Scheneider, M. P. C.; Gonçalves, E. C. Íntrons de genes nucleares: marcadores eficientes para análise filogenética em aves com evolução recente. Resumos do 50º Congresso Brasileiro de Genética. 2004.
- CBRO. Comissão Brasileira de Registros Ornitológicos. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/>. Acessado dia 23 de novembro de 2014.
- del Hoyo, J.; Andrew, E.; Sargatal, J.; Christie, D.A. Handbook of the Birds of the World. Disponível em : <http://www.hbw.com/plates/start>. Acessado dia 26 de novembro de 2013. 2013.
- Doyle, J. J. Gene trees and species trees: Molecular systematics as one- character taxonomic. Syst. Bot. 17. 144-163. 1992.
- Fürbringer, M. Morphologie Und Systematik. Amsterdam Verlag Von Tj. Van Holkema. 1888.
- Harrison, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. Trends Ecol. Evol. v. 4. p. 6-11. 1989.
- Johansson, S.; Ericson, G. P. Molecular support for a sister group relationship between Piciformes and Galbulidae (Piciformes *sensu* Wetmore 1960). Journal of Avian Biology. 34. 185-197. 2003.
- Ladeira, L.M.C.E.B; Höfling, E. Osteologia craniana de Bucconidae. Ciências Naturais. 2. p. 117-153. 2007.
- Lopes, I. F. Variabilidade genética em populações de *Jabiru mycteria* (Lichtensein, 1818) e *Mycteria americana* (Linnaeus, 1758) (Aves, Ciconiidae): fluxo gênico e filogeografia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-graduação em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos. 2006.
- Malaver, J. L. Problemas taxonômicos da família Threskiornithidae: Filogenia molecular e o caso de *Eudocimus*. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-graduação em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos. 2011.
- Moritz, C.; Faith, P. D. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. Molecular Ecology. 7. 419-429. 1998.
- Olson, S. L. Evidence for a Polyphyletic origin of the Piciformes. National Museum of Natural History. Smithsonian Institution. Washington. 1983.
- Pereira, S. L.; Baker, A. J.; Wajntal, A. Combined Nuclear and Mitochondrial DNA Sequences Resolve Generic Relationships within the Cracidae (Galliformes, Aves). Systematic Biology. 51(6). 946-958. 2002.
- Presti, F. T. Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e do parentesco de Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.
- Pretti, V. Q. Relações Filogenéticas no gênero *Acestrorhynchus* (Teleostei, Characiformes) com base na análise de genes nucleares e mitocondriais. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.
- Ribeiro, T. S. Filogeografia de *Chiroxiphia caudata* (Pipridae, Aves) e de *Hemitriccus diops* (Rynchocyclidae, Aves): estruturação populacional e história demográfica de passeriformes de Mata Atlântica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de genética e biologia evolutiva. Universidade de São Paulo. 2013.
- Raikow, R. J.; Cracraft, J. Monophyly of the Piciformes: A Reply to Olson. Department of Biological Sciences. University of Pittsburgh. Pittsburgh. 100. 1983.
- Sibley, C. G.; Ahlquist, J. Phylogeny and classification of birds. New Haven: Yale University Press. 976. 1990.
- Sick, H. Ornitologia Brasileira. Edição Revisada e Ampliada por Jose Fernando Pacheco. 484-489. 1997.
- Silva, J. M. C. Sistemática e biogeografia da superespécie *Nystalus maculatus* (Piciformes: Bucconidae). Arajuba. 2. 75-79. 1991.
- Simpson, S.; Cracraft, J. The Phylogenetic Relationships of the Piciformes (Class Aves). Department of Zoology and Microbiology. Ohio University. USA. 1981.
- Strauss, E. Can mitochondrial clocks keep time? Science. 283. 1435-1438. 1999.
- Swierczewski, E. V.; Raikow, R. J. Hind Limb Morphology, Phylogeny, and Classification of the Piciformes. University of Pittsburgh. Pittsburgh. 1981.
- Witt, C. Rates of Molecular Evolution and their application to Neotropical Avian Biogeography. Louisiana State University. 2004.

CAPÍTULO 1

Reconstruções filogenéticas para o gênero *Nystalus* (Aves: Bucconidae): levantamento de hipóteses biogeográficas

RESUMO

O gênero *Nystalus* apresenta uma distribuição ampla pela região Neotropical. Inclui as espécies: *N. chacuru* (Vieillot, 1816), *N. maculatus* (Gmelin, 1788), *N. striolatus* (Pelzeln, 1856), *N. striatipectus* (Silva, 2001), *N. radiatus* (Sclater, 1854), *Nystalus obamai* (Whitney *et al.*, 2013) e *N. torridus* (Bond & Meyer de Schauensee, 1940). Desse modo, o objetivo deste capítulo é validar a taxonomia atual dos *taxa* analisados com base em sequências de DNA assumindo o conceito filogenético de espécies; além de estimar o tempo de divergência das espécies do gênero *Nystalus* com base na aplicação do método do relógio molecular. Para isso, foram utilizados dois segmentos de DNA, um segmento de DNA mitocondrial do gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) e um segmento de DNA nuclear da região do íntron 5 do β -fibrinogênio (FIB5). As genealogias foram reconstruídas por meio de análises filogenéticas, aplicando os métodos de máxima verossimilhança (ML) e análise de inferência bayesiana (IB). Também foi realizado o teste do relógio molecular relaxado para o gene mitocondrial, utilizando o método Reltime incorporado no software Mega 6.0. Dos resultados obtidos foi possível observar que não há uma concordância entre os diferentes segmentos nas suas reconstruções individuais para os diferentes métodos de reconstrução filogenética. Para o gene mitocondrial os dois métodos apresentaram duas linhagens, uma representada por *N. maculatus* e *N. striatipectus* de espécies de áreas abertas, e a segunda linhagem representada por espécies que na sua maioria são de habitat florestal, sendo representada pelas espécies de *N. chacuru*, *N. radiatus*, *N. striolatus*, *N. torridus* e *N. obamai*. De acordo com a hipótese do relógio molecular as linhagens de *Nystalus* se separaram das outras espécies da família Bucconidae no Mioceno, ocorrendo quatro eventos principais. Diante disso, os eventos que ocorreram na América do Sul que podem ter contribuído para a especiação das espécies de *Nystalus* foram fortemente influenciados pela hipótese da formação de regiões de savana, taxa de elevação dos Andes e a hipótese dos rios. No entanto, outros eventos ainda não elucidados para a América do Sul podem ter contribuído para a diversificação das espécies do gênero.

Palavras-chave: Neotrópico, filogenia, hipóteses de diversificação.

INTRODUÇÃO

A região neotropical possui grande extensão geográfica, abrangendo o sul do México, a América Central e a América do Sul. Pode ser dividida em quatro sub-regiões: (I) a sub-região Caribenha, que contém florestas centro-americanas, ilhas do Caribe e florestas baixas apresentando montanhas ao norte e noroeste da América do Sul; (II) a sub-região Amazônica, incluindo a área sob influência da bacia do Rio Amazonas; (III) a sub-região do Paraná, com formações florestais ombrófilas e estacionais, sofrendo forte influência climática da costa Atlântica; e (IV) a sub-região Chaquenha, que inclui a diagonal de áreas abertas da América do Sul. Esta última é dividida ainda em regiões de formações abertas como o Cerrado, a Caatinga, o Chaco e os Pampas (Morrone, 2006).

Essas diferentes formações vegetais encontradas na região Neotropical podem favorecer eventos de especiação, já que possibilitam o isolamento de espécies (Cracraft & Prum, 1988). Consequentemente, esta região apresenta uma riquíssima diversidade de fauna e flora ainda pouco explorada em termos de estudos genéticos e evolutivos. Grande parte dessa riqueza se concentra na América do Sul (Lacerda, 2004). E ainda, estima-se que 14% de toda biota mundial se encontra no Brasil (Carvalho & Almeida, 2010). No entanto, a origem de toda essa diversidade ainda não é muito bem compreendida. E várias hipóteses já foram levantadas para tentar explicar quais condições no passado permitiram que estas regiões atingissem um grau tão alto de biodiversidade (Ribas & Miyaki, 2007).

Em um primeiro momento, toda essa diversidade parece se relacionar com a heterogeneidade de habitats encontrada na região neotropical (Batalha-Filho, 2012), com grande parte apresentando diversificação recente, no Quaternário, com grande ênfase para o Pleistoceno (Witmore & Prance, 1987). Nesse período, o planeta passou por grandes mudanças (Martin *et al.*, 1982), favorecendo a fragmentação de uma série de organismos nas suas respectivas áreas de distribuição (Haffer, 1992). Esta é a fundamentação teórica da teoria dos refúgios (Haffer, 1969), uma das hipóteses mais discutidas para a diversificação da biodiversidade na região Neotropical durante o Quaternário.

De acordo com essa hipótese, havia sempre tipos de vegetação florestais e abertas, com suas respectivas comunidades de animais durante as fases de alterações climáticas (Haffer & Prance, 2002). Essas florestas úmidas se retraíam durante os períodos de máximo glacial (formando refúgios) e se expandiam durante os períodos mais quentes (ciclos interglaciais), simultaneamente as áreas de vegetação aberta se comportavam de maneira contrária. Diante disso, espécies dependentes de formações florestais

possivelmente acompanharam esses ciclos de retração e expansão das florestas durante o Pleistoceno, fazendo com que essas populações associassem a diferentes refúgios e se diversificassem de maneira alopátrica, mediante tempo suficiente de isolamento para o acúmulo de diferenças entre elas (Batalha-Filho, 2012). Contudo, críticas surgiram à hipótese dos refúgios florestais (Colinvaus *et al.*, 2000; Bush & Oliveira, 2006).

Envolvimento de rios como barreiras geográficas, eventos de tectônica de placas e gradientes ecológicos são hipóteses alternativas para explicar a origem da diversificação das espécies neotropicais. A hipótese dos rios como barreira foi sugerida primeiramente por Wallace (1852), na qual sugere que o surgimento de rios foi à principal barreira vicariante que levou a especiação (Patton *et al.*, 1994; Patton *et al.*, 2000). Já a hipótese de divergência baseada em tectonismo de placas, pressupõe que a especiação ocorreu em decorrência de algum evento vicariante entre duas populações de uma espécie (Cracraft, 1985), como exemplo soerguimento de uma montanha. A hipótese de gradientes ecológicos propõe que a diversificação pode ter ocorrido em parapatria, assim a diversificação de linhagens pode ter ocorrido mediante diferentes pressões seletivas que atuaram em ambientes distintos e adjacentes (Smith *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2001).

Entender sobre a diversificação da biota neotropical é relacionar quais dessas hipóteses mencionadas acima estiveram envolvidos na especiação de determinados grupos de organismos. Contudo, estudos biogeográficos que utilizem sequências de DNA são permissivos em inferir sobre processos temporais, como as estimativas de tempo de divergência entre as espécies, além de inferências demográficas baseadas na teoria da coalescência (Moritz *et al.*, 2000). No entanto, construir previsões para a região neotropical baseadas em análises genéticas é bastante desafiador, visto que o conhecimento de como e quando os eventos vicariantes e a evolução da paisagem ocorreram permanece incerto para a maioria das regiões (Brumfield, 2012).

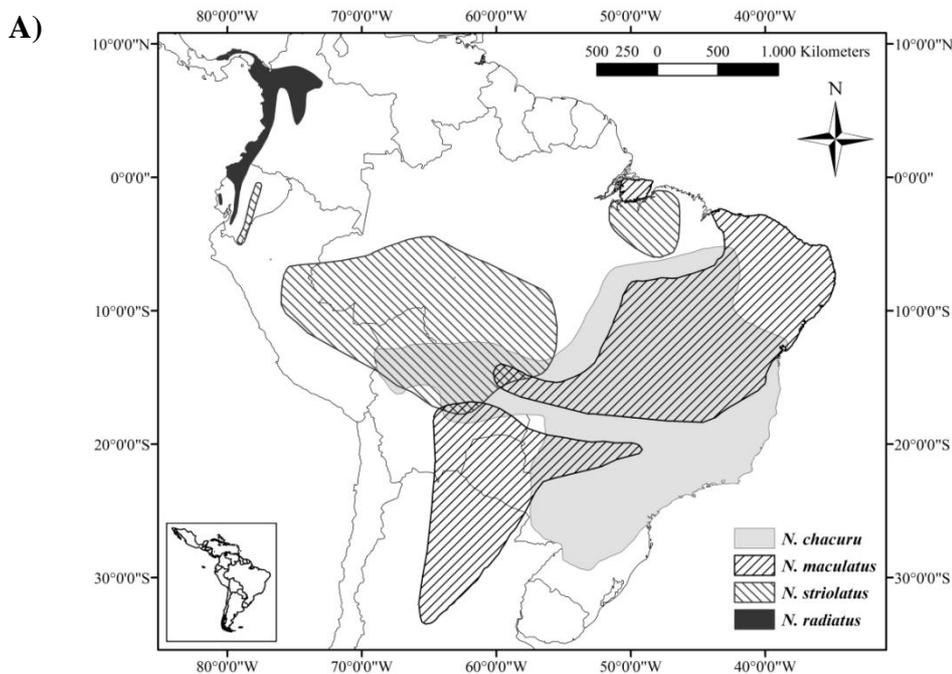
O gênero *Nystalus* inclui sete espécies: *N. chacuru* (Vieillot, 1816), *N. maculatus* (Gmelin, 1788), *N. striolatus* (Pelzeln, 1856), *N. striatipectus* (Silva, 2001), *N. radiatus* (Sclater, 1854), *Nystalus obamai* (Whitney *et al.*, 2013) e *N. torridus* (Bond & Meyer de Schauensee, 1940), com ocorrência exclusiva na região Neotropical. A maioria destas espécies apresenta ampla distribuição, ocorrendo em diversas formações vegetais. Portanto, trabalhar a filogenia molecular das espécies deste gênero pode ser uma ótima oportunidade para levantar hipóteses evolutivas sobre a origem e a diversificação destas espécies, assim como da diversificação da biodiversidade neotropical.

Diante disso, o objetivo principal deste capítulo é validar a taxonomia atual dos *taxa* analisados com base em sequências de DNA assumindo o conceito filogenético de espécie. Além disso, buscamos levantar hipóteses biogeográficas em relação à diversificação deste gênero, baseando-se nas estimativas de tempo de divergência com base na aplicação do método do relógio molecular relaxado.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram utilizadas amostras de tecido (sangue ou músculo) de 94 indivíduos, compreendendo as sete espécies descritas para o gênero *Nystalus*, sendo 33 *N. chacuru*, 28 *N. maculatus*, 15 *N. striatipectus*, 10 *N. obamai*, 5 *N. striolatus*, 2 *N. radiatus* e 1 *N. torridus* (Figura 3; Anexo 1). As amostras foram obtidas por empréstimo de coleções ornitológicas, museus nacionais, museus internacionais, além de amostras mantidas na coleção de tecidos do Laboratório de Genética e Biodiversidade (LabGenBio) da Universidade de Brasília. Todas as amostras de *N. maculatus* com distribuição pelo Chaco, foram renomeadas de *N. striatipectus*, levando em consideração a revisão na taxonomia por Silva (1991).



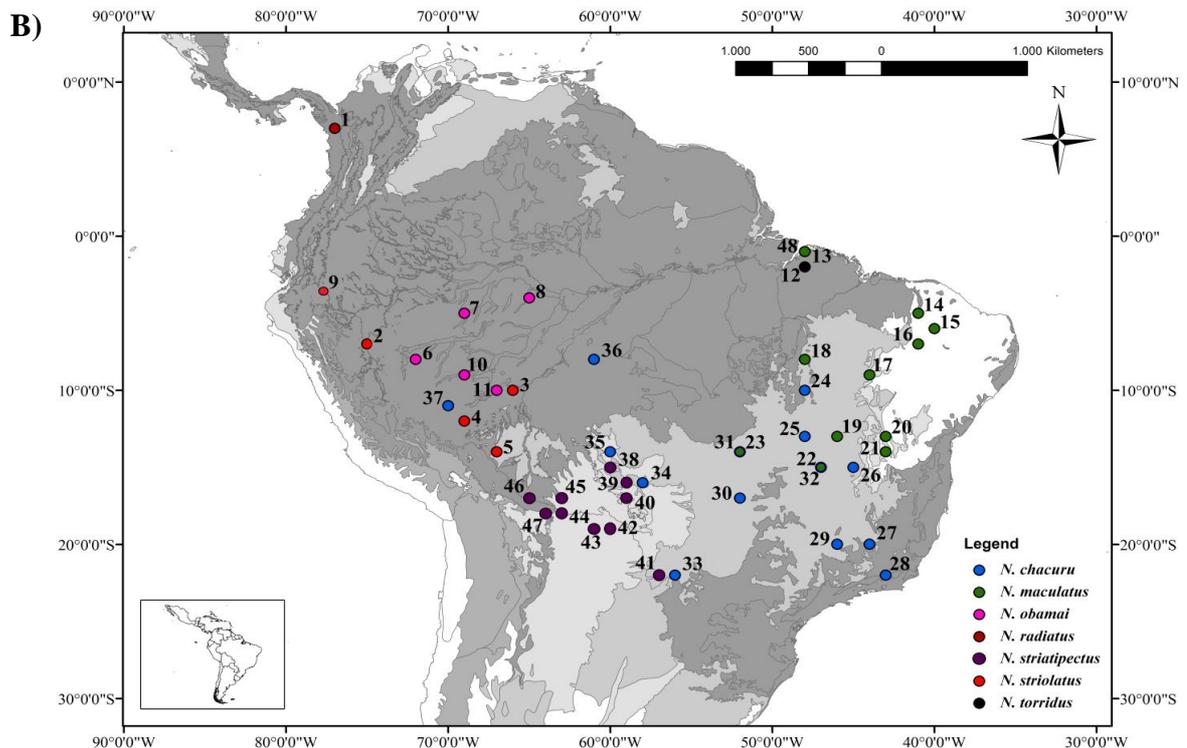


Figura 3. Representações geográficas para as espécies do gênero *Nystalus*, **A)** Mapa da distribuição das espécies do gênero *Nystalus* de acordo com os dados da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2006). **B)** Pontos de amostragem utilizados neste trabalho, cada cor corresponde a uma espécie do gênero. Os números correspondem a localidade amostrada (veja detalhes no Anexo 1). Os pontos amostrados 31/23, 22/32 e 13/48 são localidades de sobreposição entre as espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus*.

Extração de DNA

As amostras provenientes de sangue foram extraídas individualmente utilizando o procedimento padrão com digestão com proteinase K, seguindo de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico nas proporções de (25:24:1), de acordo com Bruford e colaboradores (1992). Contudo, as amostras de tecido provenientes dos museus foram extraídas utilizando os *kits* PureLink Genomic DNA (Invitrogen) e o Hiyied™Plus Genomic DNA (Blood/Tissue/Cultured Cells) Real Genomics™, segundo recomendações dos respectivos fabricantes.

Marcadores moleculares

Foram analisados um segmento de DNA mitocondrial e um segmento de DNA nuclear. O segmento de DNA mitocondrial foi do gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2), o qual foi amplificado utilizando os iniciadores LMET e H6313 (Sorenson *et al.*,1999), além de dois iniciadores internos L5758 e H5766 (Sorenson *et al.*,1999). O

segmento de DNA nuclear foi amplificado de uma região do íntron 5 do β -fibrinogênio (FIB5), com os iniciadores FIB5 e FIB6 (Marini & Hackett, 2002) (Anexo 3). Os segmentos foram amplificados por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando o seguinte protocolo de amplificação: uma desnaturação inicial de 7 minutos a 75°C, seguidos de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, com uma temperatura de anelamento de 55°C para a região do íntron 5 do β -fibrinogênio (FIB5) e 56°C para o gene desidrogenase subunidade 2 (ND2) por 40 segundos; extensão de 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados por reação enzimática com exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão (ExoI/SAP, USB), seguindo recomendações do fabricante. Em seguida, estes produtos foram sequenciados utilizando o *kit* Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências obtidas para os fragmentos mitocondrial e nuclear foram analisadas e corrigidas com auxílio do programa Geneious 6.1. (Drummond *et al.*, 2010) . O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) no programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999).

Análises genéticas

Os haplótipos para os dois segmentos foram identificados com o programa DNAsp versão v. 5 (Librado & Rozas, 2010). Foi também realizada uma plotagem gráfica das transições e transversões em função da distância para cada marcador com auxílio do programa Dambe (Xia & Xie, 2001), com intuito de avaliar uma possível saturação das bases.

As genealogias foram reconstruídas por meio de análises filogenéticas aplicando os métodos de máxima verossimilhança (ML) com o auxílio do programa Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2007). A análise consistiu em uma busca heurística tomando por base uma árvore pelo método *Neighbour joining*, seguida de correção dessa árvore utilizando o algoritmo *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI), com 1000 réplicas de *bootstrap*. Outro método empregado foi análise de inferência bayesiana (IB) com o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), que consistiu em duas corridas de quatro cadeias de MCMC para 20000000 de gerações amostradas a cada 1000 gerações. O programa Tracer v1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2007) foi usado para avaliar a convergência dos parâmetros amostrados pelas análises, sendo descartadas 20% das árvores amostradas

inicialmente (*burn-in*). A escolha do modelo evolutivo e seus parâmetros de análise foi realizado por meio do programa JModeltest 3.5 (Posada & Crandall, 1998). Estas análises foram realizadas para cada segmento individualmente e também combinando os diferentes segmentos, com intuito de identificar a contribuição de cada marcador nas relações filogenéticas obtidas. As reconstruções filogenéticas foram feitas pelo método de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (IB) para os dois segmentos em separado e também para os mesmo concatenados. Três sequências do Genbank de indivíduos de outros gêneros da família Bucconidae foram utilizados como grupos externos nas análises filogenéticas do segmento mitocondrial, sendo estes: *Notharchus macrorhynchus* (FJ175786.1), *Monasa atra* (JQ445582.1) e *Monasa morphoeus* (JQ445588.1). A escolha destes *taxa* foi baseada na filogenia obtida por (Witt, 2004). Já para as análises filogenéticas realizadas com o fragmento FIB5, foram utilizadas como grupos externos sequências de quatro espécies da família Piciformes: *Reinwardtipicus validus* (KC813377.1), *Picoides tridactylus* (KC813363.1), *Chrysocolaptes lucidus* (KC813378.1) e *Indicator maculatus* (KC813366.1).

Relógio molecular

Inicialmente, a hipótese do relógio molecular foi testada utilizando o programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2007) por meio da comparação de valores de ML com e sem restrição dos dados para o gene ND2. A hipótese foi rejeitada em nível de significância de 5%. Diante disso, as estimativas de tempo de divergência foram realizadas utilizando o método Reltime Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), o qual não assume taxa de evolução constante em todos os ramos. Os tempos relativos produzidos pelo método RelTime podem ser diretamente convertidos em tempos absolutos quando um único ponto de calibração com base em um registro fóssil ou outra informação disponível é aplicado. O fator de tempo global (f), que é calculado a partir do ponto de calibragem indicado, converte todas as estimativas de tempo relativo (NTs) para tempo absoluto (ATs), onde $AT_x = f \times NT_x$ para o nó interno x . Essa abordagem é utilizada porque NTs já são mostrados para ser linearmente relacionado com o tempo (Tamura *et al.*, 2012).

Contudo, é comum usar vários pontos de calibração, juntamente com informações de limites superiores e/ ou inferiores. Com intuito de considerar essas restrições quando estimar f , foi implementada no RelTime que a estimativa f produz estimativas AT, na qual satisfazem as restrições na calibração. Neste caso, se há uma gama de valores de f que não viola as constantes de calibração, o ponto médio do intervalo que se torna a estimativa da

f. Se uma ou mais estimativas de AT estiver fora das limitações de calibração, *f* será estabelecido de modo que os desvios em relação as restrições sejam minimizados. Estimativas de ATs são ajustadas para satisfazerem as restrições de calibração, de tal forma que o ATs estimado para os nós irão situar-se entre os tempos máximos e mínimos de restrição especificados pelo usuário. Esses ajustes NTs são seguidos por re-otimização de todos os outros Nts na árvore, utilizando o algoritmo padrão RelTime, com tempos absolutos apresentando intervalos de confiança de 95% (Tamura *et al.*, 2013).

Os pontos de calibração foram obtidos com base no estudo filogenético realizado por Witt (2004). Um dos pontos de calibração foi determinado com base no soerguimento do Istmo do Panamá, há aproximadamente 3,1 Maa. Diante disso, foi estipulado que o ramo que deu origem as espécies de *N. radiatus*, *N. striolatus*, *N. torridus* e *N. obamai* teria uma taxa fixa de 3,1 Maa. Um segundo ponto de calibração foi estipulado para as espécies utilizadas como grupo externo, com 17,9 Maa e desvio padrão (SD) de 3,90, sendo utilizado como valores máximo e mínimo na calibragem 21,8 e 14, respectivamente, já que foi está à datação de separação dessas linhagens obtidas pelo autor na filogenia. Os períodos e séries de diversificação foram estipulados com base na tabela estratigráfica da Comissão Internacional sobre Estratigrafia (International Commission on Stratigraphy - ICS).

RESULTADOS

Diversidade molecular

O DNA genômico total dos 94 indivíduos foi extraído e os segmentos de DNA sequenciados para a maioria dos indivíduos. Não foi obtido sucesso na amplificação do ND2 e do FIB, para 8 e 17 amostras, respectivamente. Uma matriz de 82 haplótipos com um total de 1.026 pares de base foi obtida para o gene mitocondrial ND2, apresentando 362 sítios variáveis. A frequência percentual por base nitrogenada foi de A= 0,31129; C= 0,34372; G= 0,11426 e T= 0,23072.

Para o segmento nuclear FIB5, foram obtidos 47 haplótipos com um total de 596 pares de base, sendo destes 154 variáveis. A frequência percentual de nucleotídeos foi de A= 0,32553; C= 0,15257; G= 0,20312 e T= 0,31878. Interessante destacar também que para a matriz do fragmento FIB5, as espécies apresentaram algumas peculiaridades: *N. torridus* apresenta uma inserção de 16 bases, enquanto *N. striolatus*, *N. obamai* e *N. radiatus* apresentam uma deleção de 378 pares de base para esse fragmento (Figura 4).

Não foi encontrada saturação de bases em nenhuma das comparações de distância para as diferentes matrizes analisadas (Figura 5).

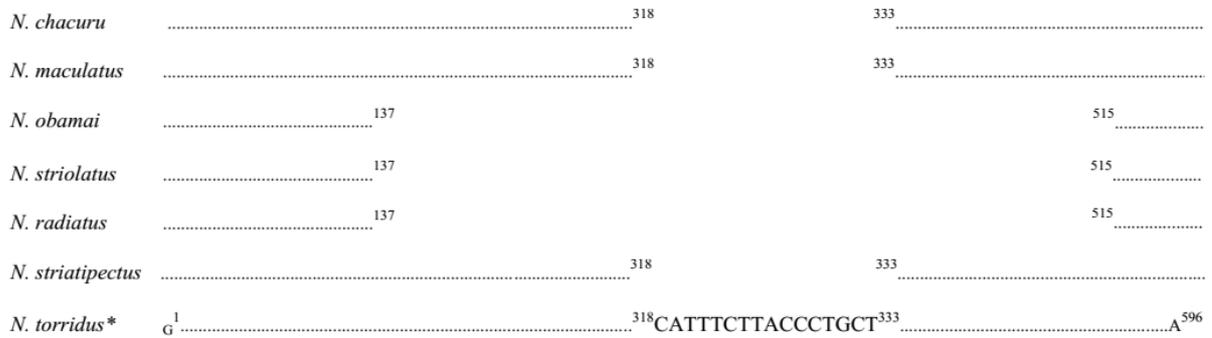


Figura 4. Desenho esquemático das deleções/inserções observadas para o fragmento nuclear FIB5 para as espécies do gênero *Nystalus*. Os números correspondem à posição das bases no alinhamento. *N. torridus* representa a espécie com a sequência completa para o gênero.

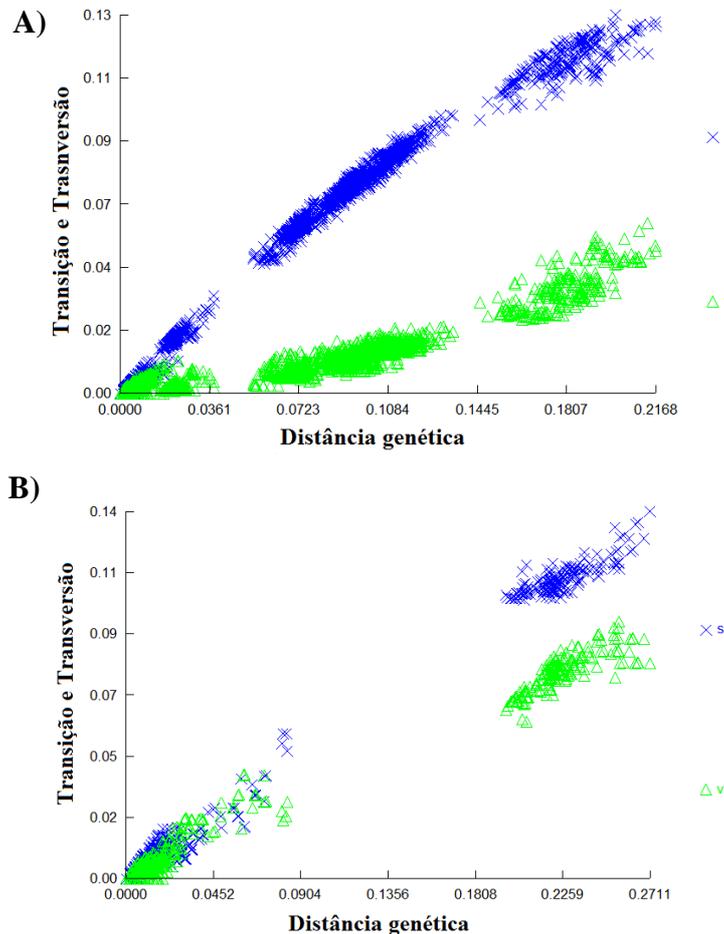


Figura 5. Gráfico dos testes de saturação mostrando as frequências de transições (Xs) e transversões (Δv) em relação a distância genética para cada fragmento analisado. **A)** ND2 e **B)** FIB5.

Para a matriz dos segmentos concatenados foi obtido um total de 1.622 pares de base, sendo 668 variáveis. Como não foi possível amplificar algumas amostras para os diferentes fragmentos, esses dados foram tratados como faltantes (?) para o segmento em questão na matriz concatenada.

Análises filogenéticas

O modelo evolutivo GTR+G+I foi escolhido para o fragmento mitocondrial, enquanto que para o fragmento nuclear o modelo indicado foi o TPM3uf+G. Contudo, no caso deste último, posteriormente foi utilizado o modelo evolutivo GTR+G por se aproximar mais do modelo outrora indicado. De acordo com a análise de ML para o gene mitocondrial ND2 foram identificadas duas linhagens principais (Figura 6): a primeira linhagem representada pelas espécies *N. maculatus* e *N. striatipectus* e a segunda linhagem representada pelas espécies *N. chacuru*, *N. radiatus*, *N. torridus*, *N. striolatus* e *N. obamai*. Ainda dentro da segunda linhagem, *N. chacuru* constitui a linhagem mais basal às demais espécies, seguido da divergência de *N. radiatus* e de *N. torridus*. O clado mais recente desta linhagem foi composta por *N. obamai* e *N. striolatus*, não sendo possível distinguir efetivamente estas últimas.

Já em relação ao método de reconstrução filogenético IB para o gene ND2 (Figura 7), demonstrou que as espécies do gênero *Nystalus* também se apresentam como duas linhagens. A primeira linhagem correspondente as espécies de *N. striatipectus* e *N. maculatus*, cujo o habitat são regiões de zonas abertas, não sendo verificado uma clara distinção entre o clado correspondente a *N. maculatus*. A segunda linhagem corresponde em grande parte a espécies que hoje são encontradas predominantemente em zonas florestais. Diferentemente da reconstrução de ML para o gene ND2, a primeira espécie que diversificou na segunda linhagem foi *N. radiatus*, seguida de *N. chacuru* e *N. torridus*. Porém, para as espécies *N. striolatus* e *N. obamai*, também não foi verificada uma distinção clara entre os estes *taxa*.

Contudo, os resultados obtidos para o segmento nuclear FIB5 com ambos os métodos de reconstrução filogenética utilizados evidenciaram que várias linhagens são parafiléticas, com valores de *bootstrap* muito baixos, não havendo sustentação dos ramos. De acordo com a hipótese filogenética para o método de ML (Figura 8) a espécie *N. maculatus* estaria mais relacionado com *N. chacuru*, contudo também foi verificado que alguns indivíduos de *N. maculatus* foram agrupados dentro de *N. striatipectus*. Já *N.*

torridus e *N. radiatus*, que por sua vez se mostraram mais relacionados com *N. obamai* e *N. striolatus*, sendo que esses últimos não apresentaram uma clara distinção.

Já a hipótese filogenética baseada no método de IB (Figura 9) distribuiu as seis espécies do gênero *Nystalus* em quatro linhagens principais: (I) uma composta por *N. maculatus*, *N. chacuru* e *N. striatipectus*; (II) composta por *N. torridus*; (III) linhagem composta por *N. radiatus* e (IV) linhagem composta por *N. striolatus* e *N. obamai*, não sendo possível ter uma distinção clara entre estas *taxa*, exceto para *N. radiatus* que aparentemente está mais relacionado com *N. obamai* e *N. striolatus*.

Em relação as hipóteses filogenéticas obtidas para os fragmentos concatenados é possível inferir também que os métodos de ML e IB são discordantes entre si, já que para a ML (Anexo 4) foi verificado um valor alto de bootstrap acima de 95% apenas para três linhagens (*N. radiatus*, *N. maculatus* e *N. striatipectus*). Em contrapartida, para método IB (Anexo 5) as espécies praticamente não se diferenciam.

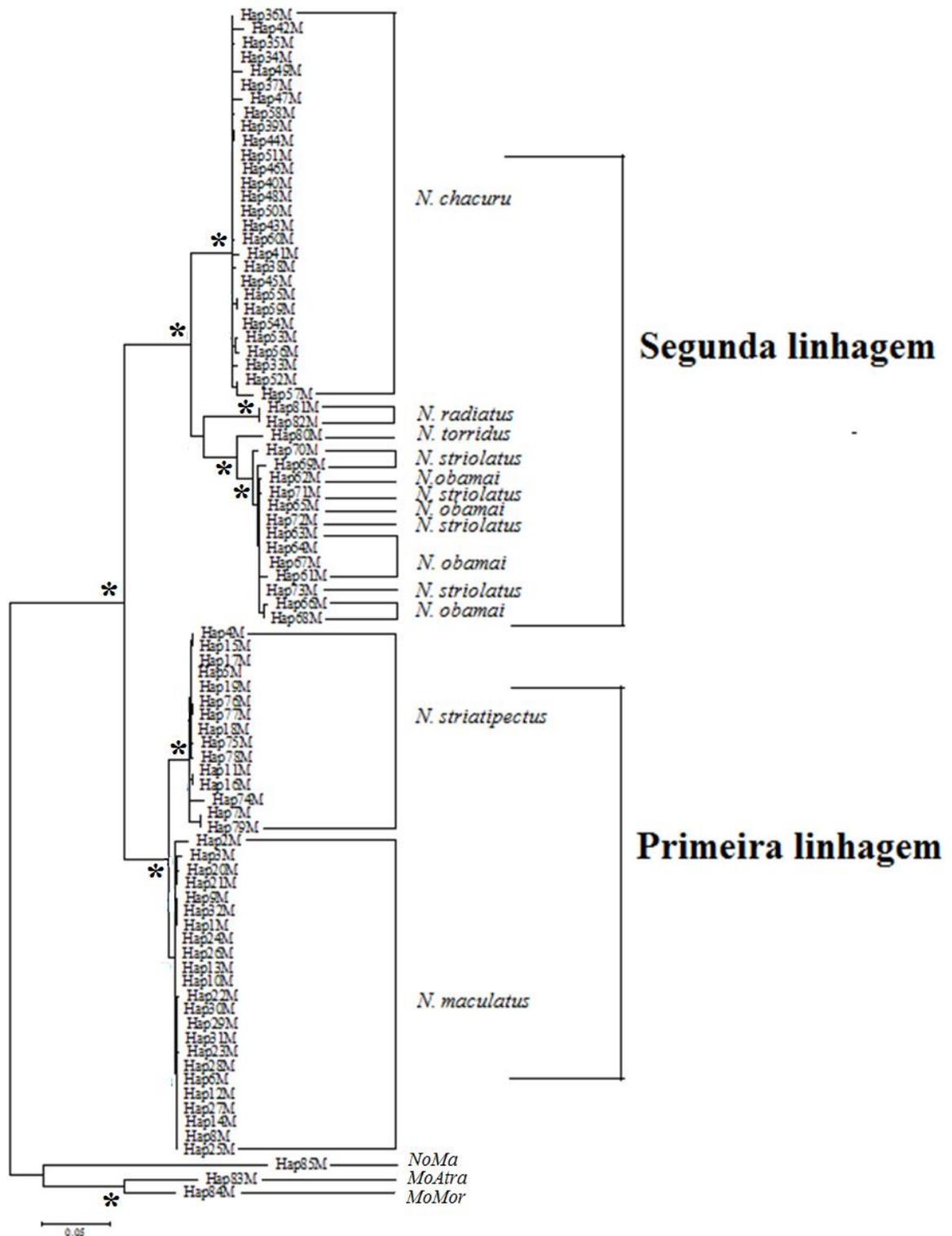


Figura 6. Árvore filogenética para as espécies do gênero *Nystalus* com base em 1.026 pb do gene ND2, utilizando o método de máxima verossimilhança (ML). Os terminais representam os haplótipos encontrados para este gene (ver detalhes no Anexo 1). Os terminais representados por Hap83M, Hap84M e Hap85M representam as espécies *Monasa atra*, *Monasa morphoeus* e *Notharchus macrorhynchos*, respectivamente. Os valores em cada nó representados com símbolo (*) descrevem valores de *bootstrap* acima de 0.90.

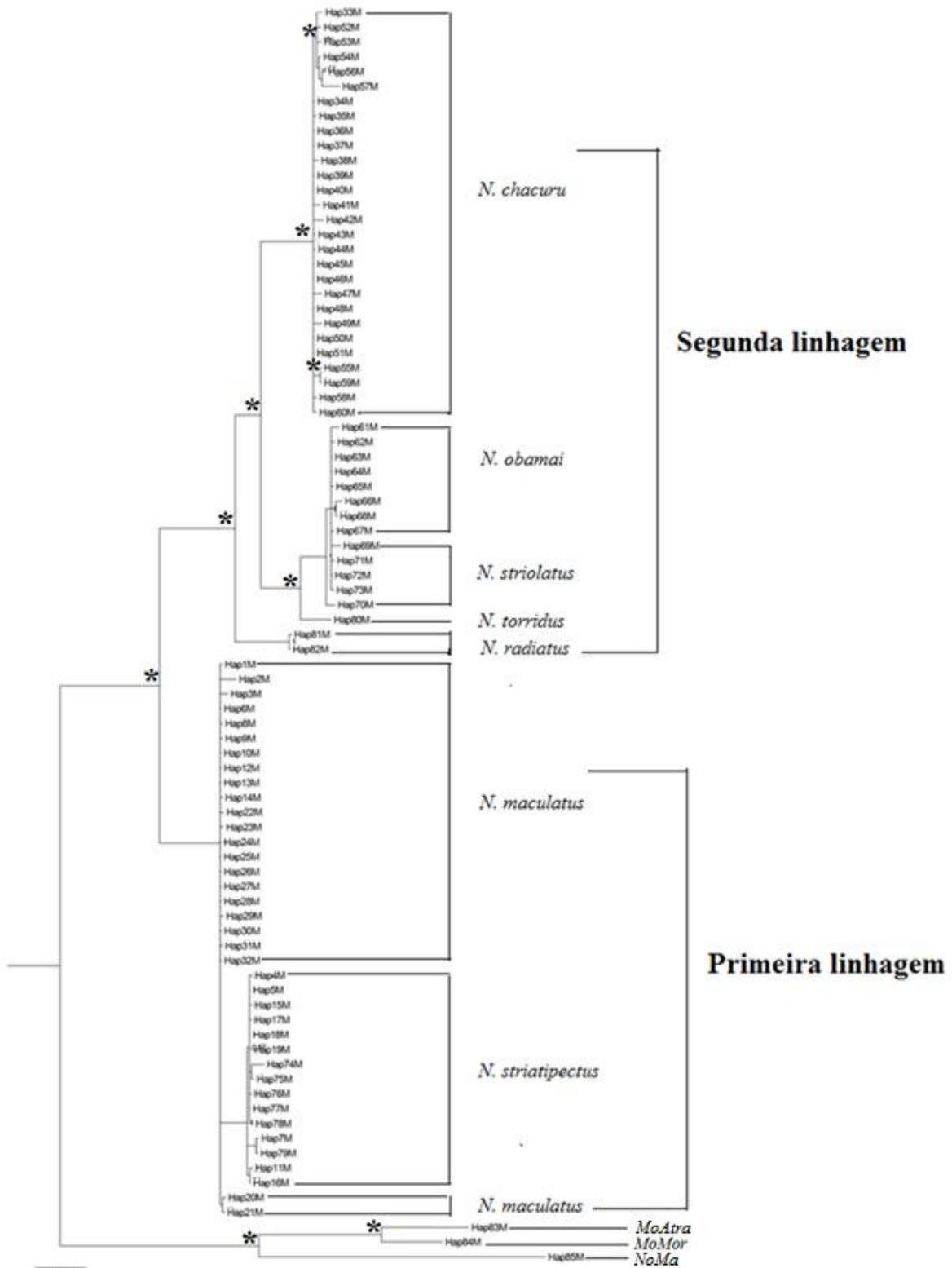


Figura 7. Árvore filogenética para as espécies do gênero *Nystalus* com base em 1026 pb do gene ND2, utilizando o método de inferência bayesiana (IB). Os terminais representam os haplótipos encontrados para este gene (ver detalhes no Anexo 1). Os terminais representados por Hap83M, Hap84M e Hap85M representam as espécies *Monasa atra*, *Monasa morphoeus* e *Notharchus macrorhynchos*, respectivamente. Os valores em cada nó representados com símbolo (*) descrevem valores de *bootstrap* acima de 0.90.

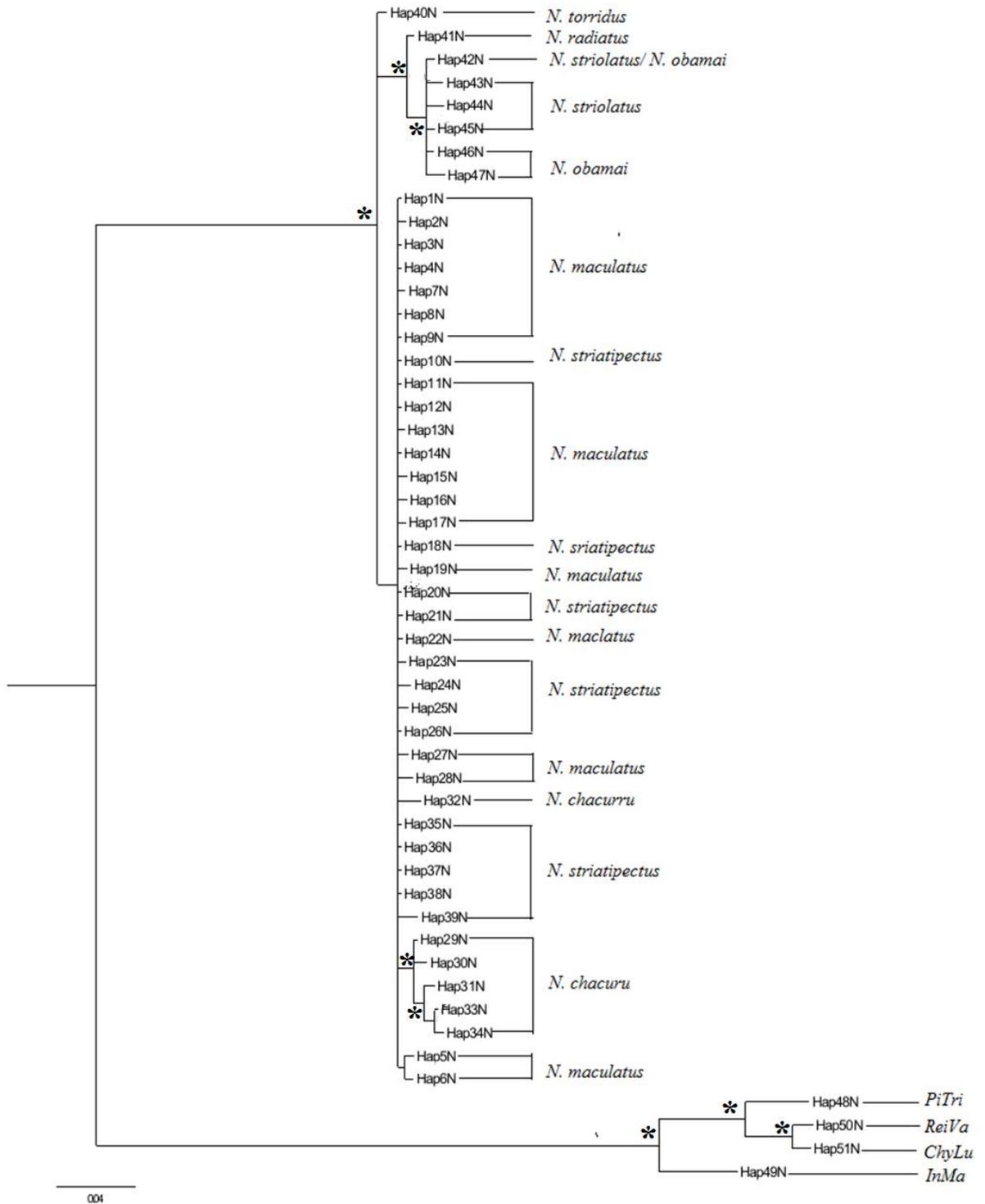


Figura 8. Árvore filogenética para as espécies do gênero *Nystalus* com base em 596 pb do fragmento nuclear FIB5, utilizando o método de máxima verossimilhança (ML). Os terminais representam os haplótipos encontrados para este segmento (ver detalhes no Anexo 1). Os terminais representados por Hap48N, Hap49N e Hap50N e Hap51N representam as espécies *Picoides tridactylus*, *Indicator maculatus*, *Reinwardtipicus validus* e *Chrysocolaptes lucidus*, respectivamente. Os valores em cada nó representados com símbolo (*) descrevem valores de *bootstrap* acima de 0.90.

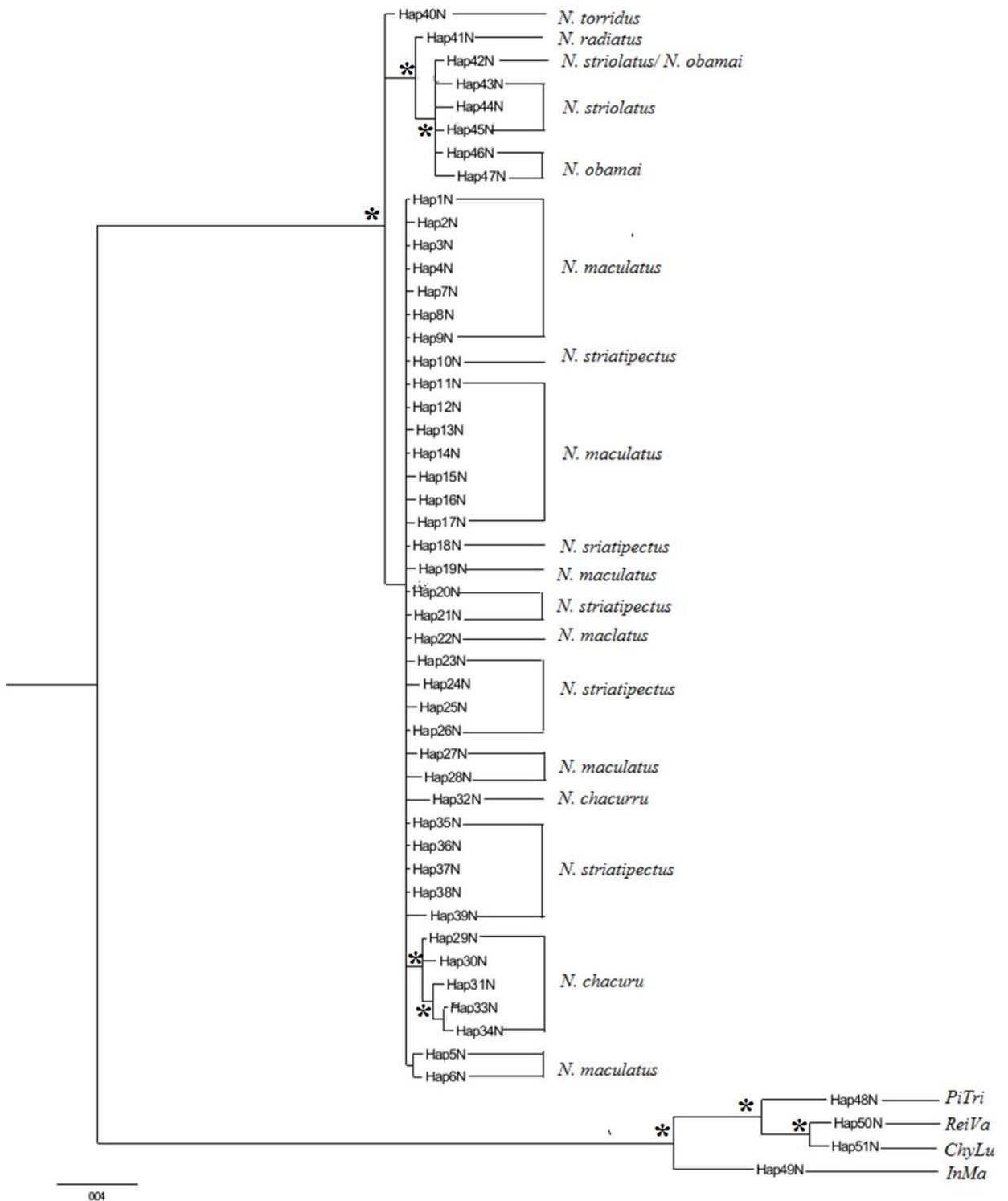


Figura 9. Árvore filogenética para as espécies do gênero *Nystalus* com base em 596 pb do fragmento nuclear FIB5, utilizando o método de inferência bayesiana (IB). Os terminais representam os haplótipos encontrados para este segmento (ver detalhes no Anexo 1). Os terminais representados por Hap48N, Hap49N e Hap50N e Hap51N representam as espécies *Picoides tridactylus*, *Indicator maculatus*, *Reinwardtipicus validus* e *Chrysocolaptes lucidus*, respectivamente. Os valores em cada nó representados com símbolo (*) descrevem valores de *bootstrap* acima de 0.90.

Relógio molecular e tempo de divergência

Os resultados sugerem que as espécies pertencente ao gênero *Nystalus* se separaram das outras espécies de Bucconidae há aproximadamente 22,96 milhões de anos atrás (Maa), no início do Mioceno (Figura 10, Tabela 1). Em seguida, ocorreu o primeiro evento de diversificação dentro do gênero separando este em duas linhagens principais: a primeira linhagem, representada por *N. radiatus*, *N. chacuru*, *N. obamai*, *N. striolatus* e *N. torridus*, e a segunda linhagem, representada por *N. striatipectus* e *N. maculatus*, há cerca de 9,41 Maa, no início no Mioceno tardio. O segundo evento de diversificação dentro do gênero ocorreu há aproximadamente 4,16 Maa, no início do Plioceno, e a primeira espécie a se diversificar foi *N. chacuru*, em seguida outro evento ocorre há 3,42 Maa, possibilitando à diversificação de *N. radiatus*. O terceiro evento já ocorreu no Pleistoceno, com aproximadamente 1,49 Maa, separando *N. torridus* de *N. striolatus* e *N. obamai*, que aparentemente se separaram por um outro evento mais recente. O mais recente evento que pode ter contribuído para divergência das espécies de *N. obamai* e *N. striolatus* provavelmente ocorreu há 0,45 Maa. Contudo, a árvore para a hipótese do relógio molecular não conseguiu recuperar um evento único, portanto não há uma distinção clara entre essas linhagens.

A segunda linhagem diversificou por um sexto evento aproximadamente 2,56 Maa e diferenciou as espécies de *N. maculatus* e *N. striatipectus* que sofreram especiação, respectivamente, há 1,22 Maa e 0,59 Maa, compreendendo ao Pleistoceno.

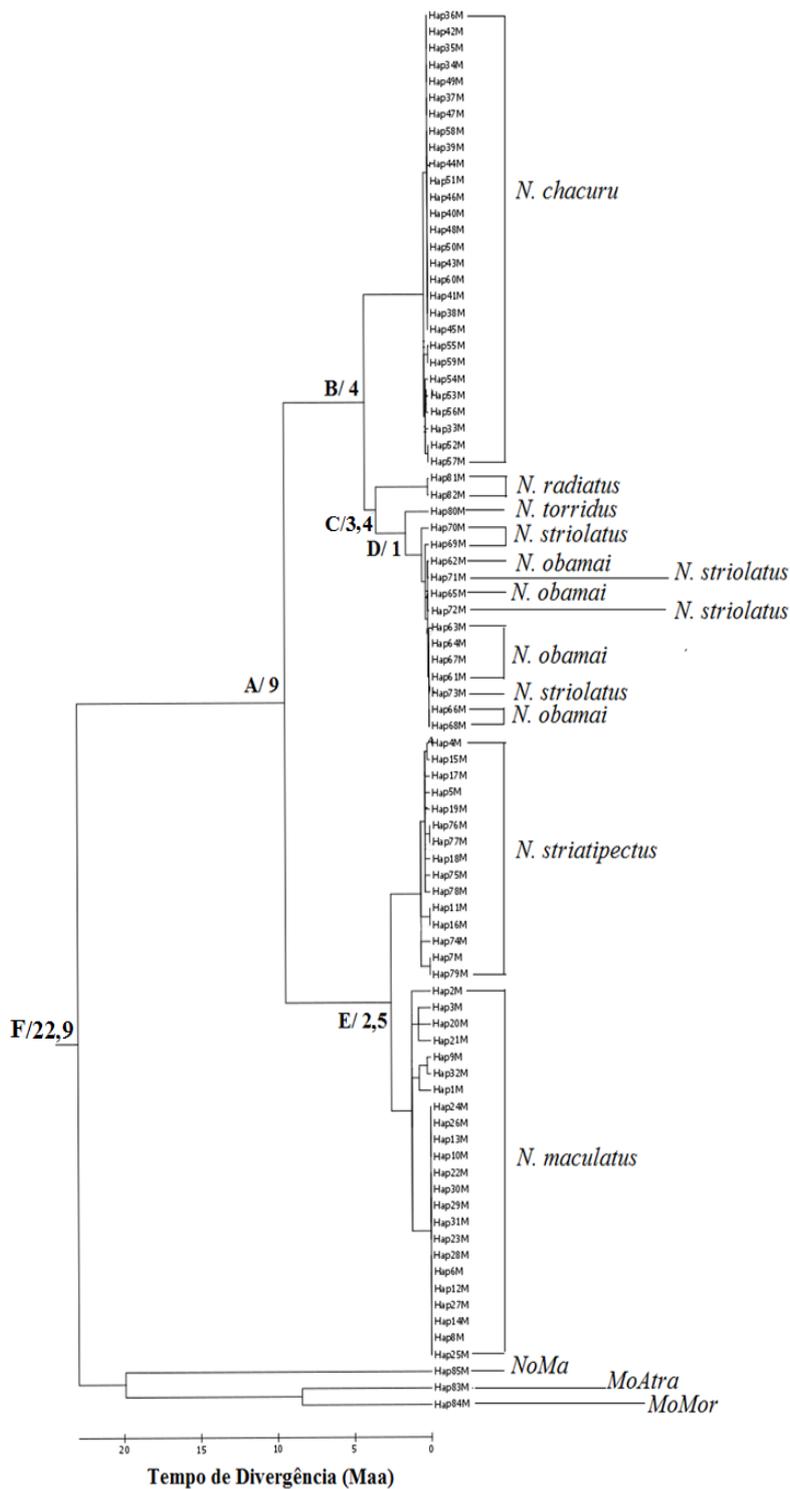


Figura 10. Hipótese do relógio molecular relaxado para as espécies do gênero *Nystalus* com base em 1.026 pb do gene ND2, utilizando o método de RelTime. Os terminais representam os haplótipos encontrados para este gene (ver detalhes no Anexo 1). Os haplótipos Hap83M, Hap84M e Hap85M representam as espécies *Monasa atra*, *Monasa morphoeus*, e *Notharchus macrorhynchos*, respectivamente. As letras representam o nó no qual ocorreu algum evento de diversificação com suas respectivas datações (detalhes na Tabela 1).

Tabela 1. Tempo de divergência das espécies do gênero *Nystalus*, com respectivo desvio padrão (SD), correspondendo aos ramos para a hipótese do relógio molecular (Figura 10).

Nó	Tempo de Divergência (Maa)	SD
A	9,41	17,89
B	4,16	7,93
C	3,42	6,65
D	1,49	2,89
E	2,56	5,46
F	22,96	43,47

DISCUSSÃO

As reconstruções filogenéticas para o ND2 com os métodos de ML e IB apresentaram de certa forma resultados congruentes. As duas árvores mostraram que as espécies do gênero *Nystalus* apresentam duas linhagens, uma linhagem composta pelas espécies predominantemente de formações florestais tropicais sazonalmente secas (SDTF), representadas por *N. maculatus* e *N. striatipectus*. A segunda linhagem composta, em sua maioria, por espécies de áreas com florestas úmidas, representadas por *N. chacuru*, *N. radiatus*, *N. obamai*, *N. striolatus* e *N. torridus*. Interessante notar que *N. chacuru*, uma espécie que hoje é exclusiva e representativa de formações de áreas abertas, seja filogeneticamente mais relacionada com as outras espécies de formações florestais, sugerindo que *N. chacuru* tenha emergido em uma linhagem florestal e que tenha ocupado formações abertas.

Para as espécies *N. striolatus* e *N. obamai* não foi possível identificar uma clara distinção, para ambos os métodos filogenéticos empregados para o gene ND2. Contudo, analisando o trabalho de revisão de *N. striolatus* (Whitney *et al.*, 2013) e revendo as localidades de distribuição das espécies, é provável que as amostras utilizadas neste trabalho proveniente de museus e denominadas de *N. striolatus* seriam, na verdade, *N. obamai*. Fato que explicaria a falta de resolução obtida nas árvores de ML e IB para o gene ND2.

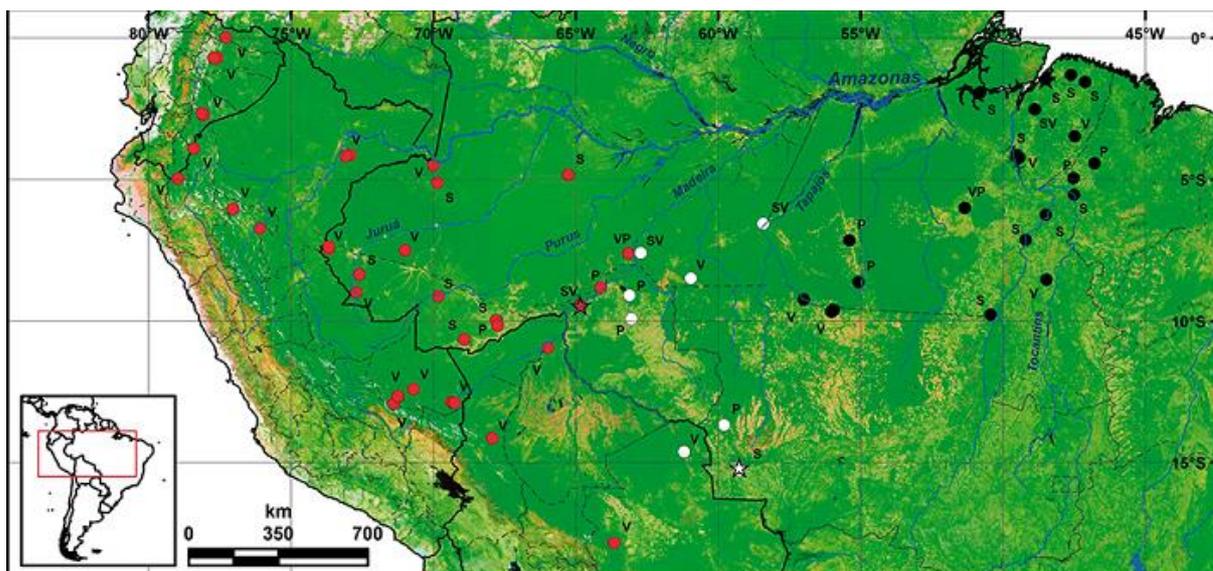


Figura 11. Imagens extraída do trabalho de Whitney *et al.*, 2013. Os pontos representam as localidades amostradas. Os pontos em vermelho são de indivíduos de *N. obamai*; os pontos em branco são *N. striolatus* e os pontos em preto são de *N. torridus*. Os tipos de informação e amostras estão representadas em V: vocalização; S: espécime; P: fotografia digital.

As relações interespecíficas foram bem elucidadas para a reconstrução filogenética para o gene mitocondrial, com altos valores de *bootstrap*, onde *N. maculatus* está proximamente relacionado com *N. striatipectus*, enquanto *N. radiatus* está mais próximo filogeneticamente das espécies de *N. torridus*, *N. obamai/striolatus*. Contudo, os métodos discordam apenas em qual espécie seria a basal da linhagem de florestas úmidas, isso porque para a ML, a primeira espécie a divergir foi *N. chacuru*, enquanto na IB, a primeira espécie a se divergir foi *N. radiatus*.

Já para as relações filogenéticas do gênero *Nystalus* obtidas com base no segmento nuclear não foi observada boa resolução das relações interespecíficas, além de serem evidenciados valores de suporte muito baixos para os nós. Resultado similar também foi encontrado por Martins (2012), trabalhando com dois fragmentos nucleares (β Fib7 e G3PDH) em um estudo das relações evolutivas do gênero *Phoenicircus*. Neste trabalho, Martins chegou à conclusão de que a pouca resolução interna estaria relacionada com o processo de “incomplete lineage sorting” para esses *loci*. Já que este processo ocorre quando um ancestral polimórfico que possui dois ou mais alelos (haplótipos) em um determinado locus divide em duas linhagens, sendo que ambos os alelos podem ser retidos nos ramos descendentes, e quando uma destas linhagens divide novamente, a árvore

filogenética (árvore do gene) pode ou não coincidir com a ordem de ramificação para a árvore da espécie (Rogers & Gibbs, 2014).

Diante disso, as histórias genealógicas de locos gênicos individuais podem parecer enganosas ou não informativas sobre as relações entre as espécies ou populações, isso é especialmente provável se os tamanhos das linhagens, ou seja, o tamanho efetivo da população é maior em relação ao comprimento dos ramos na filogenia (tempo de divergência). Neste caso, é improvável que tenha ocorrido a fixação de alelos favorecidos pela deriva genética antes das divergências posteriores (Pamilo & Nei, 1988; Maddison & Knowles, 2006). Processo similar pode também estar influenciando os resultados obtidos neste trabalho com as reconstruções filogenéticas das espécies do gênero *Nystalus* com o segmento nuclear FIB5. Assim, os resultados encontrados para os métodos de inferência filogenética para os dados concatenados também podem ter sido fortemente influenciados pelo segmento nuclear, por não ter sido encontrado uma boa resolução das relações desse grupo.

Hipóteses biogeográficas relacionadas com os processos de divergência das espécies do gênero Nystalus

Os resultados obtidos indicam que o gênero *Nystalus* se separou das outras espécies da família Bucconidae na era Cenozóica, período Neogene, início do Mioceno. Apresentando uma linhagem tipicamente de formações florestais tropicais sazonalmente secas, e uma segunda composta, em sua grande maioria, por espécies que hoje são de florestas úmidas. Os eventos paleogeográficos de maior impacto que ocorreram na América do Sul no início do período de diversificação do gênero *Nystalus*, e que potencialmente podem ter contribuído para o isolamento desta linhagens são: a formação de regiões de savana e a elevação dos Andes (Carvalho & Almeida, 2010).

O Mioceno foi marcado por uma intensa atividade geológica de soerguimento da Cordilheira dos Andes, apresentando uma maior atividade entre o Mioceno tardio e Plioceno, entre 10-5 Maa (Ortiz-Jaureguizar & Cladera, 2006). No Mioceno inferior (22-18 Maa), ocorreu o soerguimento de algumas partes da Cordilheira Oeste da Colômbia (Hooghiemstraet *al.*, 2006). No Mioceno médio (16-15 Maa), iniciou o processo de soerguimento do Istmo do Panamá, tornando-se mais intenso no final do período (12-11 Maa) (Lundenberget *al.*, 1998). No entanto, na porção norte da Cordilheira dos Andes, compreendendo a região da Colômbia e da Venezuela, houve uma soerguida entre 15-3 ma, obtendo um período de soerguimento máximo entre o final do Mioceno tardio e o

Plioceno (6-3 Maa) (Hooghiemstra *et al.*, 2006). O que pode explicar a divergência de 3,4 Maa para *N. radiatus*, resultado vicariante do final do soerguimento dos Andes (Figura 12).

A cordilheira dos Andes apresentou um rápido aumento entre o Plioceno e o início do Pleistoceno (4-2 Ma) (Noblet *et al.*, 1996; UBA *et al.*; 2007), e possivelmente também foi um agente de controle na primeira organização da bacia Amazônica (Campbell *et al.*, 2006; Latrubesse *et al.*, 2010). Ainda no Plioceno, este período foi marcado pelo final do soerguimento do Istmo do Panamá, há aproximadamente 2,82 Maa (Coates & Obando, 1996; Coates *et al.*, 2004; Farris *et al.*, 2011). Este evento paleogeológico agiu como uma ponte para flora e fauna terrestres, no chamado Grande Intercâmbio Biótico Americano (GIBA) (UBA *et al.*, 2007), que possivelmente também contribuiu para a invasão da América Central pela espécie *N. radiatus* (Witt, 2004).

Contudo, quando se trata da diversificação das espécies da Amazônia, três hipóteses principais são levantadas baseadas nos fundamentos dos eventos geográficos ou alópatricos, sendo elas: as incursões marinhas do Mioceno, hipótese dos refúgios e os rios como barreira (Antonelli *et al.*, 2010). Contudo, sob a óptica das distribuições geográficas e os resultados das filogenias encontradas neste trabalho, as espécies de *Nystalus* com distribuição pela região norte do Brasil, sendo representadas por *N. torridus* e *N. obamai/N. striolatus*, provavelmente tiveram como agente vicariante, os rios da bacia Amazônica, seguindo a hipótese dos rios como barreiras. Segundo essa hipótese, durante a formação da bacia hidrográfica da Amazônia, os rios foram surgindo e se tornando um agente vicariante para as populações, que foram se divergindo e formando novas espécies e subespécies (Haffer, 2008). Essa hipótese foi comprovada pelo trabalho de Ribas e colaboradores (2011), ao trabalhar com as relações filogenéticas e biogeográficas para as aves do gênero *Psophia*, onde os autores verificaram por meio de análises do relógio molecular que a divergência das aves desse gênero era congruente com o estabelecimento atual da bacia amazônica. De acordo ainda com este trabalho, a formação do rio Madeira seria de aproximadamente 2,0-1,0 Maa, e teria sido o evento vicariante para a diversificação de *P. Viridis*. Já a formação do rio Tapajós seria de 1,3-0,8 Maa, atuando como agente de controle para a diversificação da espécie de *P. dextralis*.

Assim, os resultados encontrados no presente trabalho corroboram os apresentados por Ribas e colaboradores (2011), sendo que as estimativas de tempo de divergência encontradas para o gênero *Nystalus* sugerem que o rio Madeira seria o agente vicariante

para a separação de *N. obamai*/*N. striolatus*, enquanto o rio Tapajós atuaria como controle na diversificação de *N. torridus*.

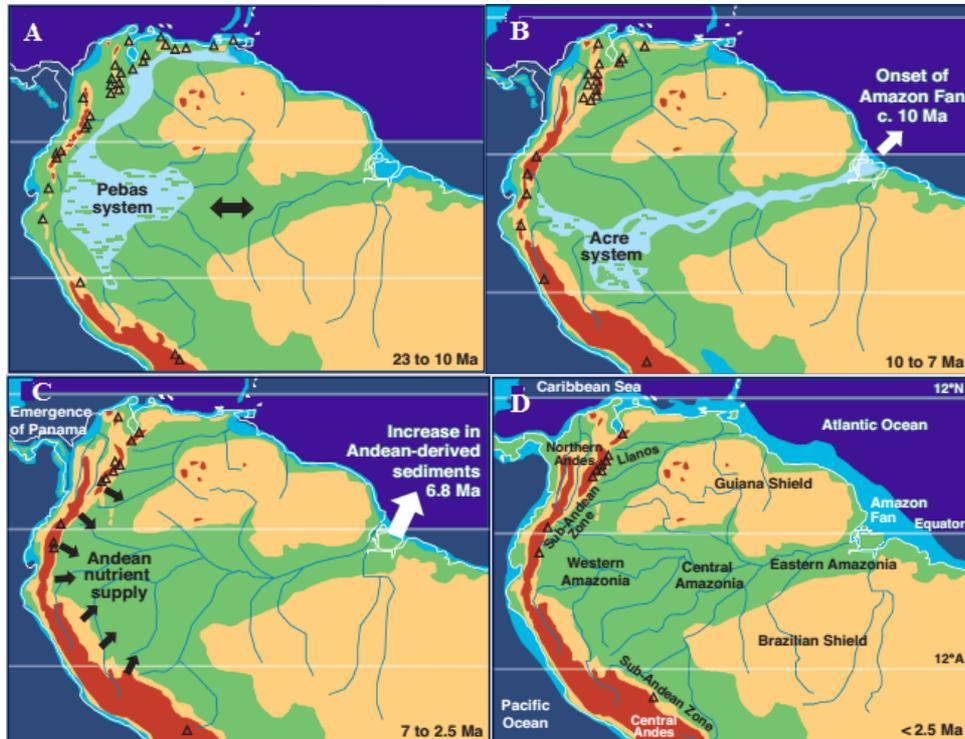


Figura 12. Mudanças paleogeológicas relacionadas com o domínio da paisagem da América do Sul pelos Andes. **A)** Soerguimento dos Andese e início da mudança do sistema de drenagem em direção ao noroeste. **B)** Soerguimento dos Andes na porção central e sul. **C)** Mudança no sistema de drenagem dos rios. **D)** Quaternário. Imagem modificada do trabalho de Hoorn colaboradores (2010).

Algumas evidências indiretas indicam que o sul da AS foi dominado por campos e formações arbustivas, com algumas áreas de florestas ocorrendo no centro norte da Argentina, Paraguai e leste da Bolívia, e formações florestais pluviais restrita as regiões do litoral do Brasil (Dowsett *et al.*, 1999). A formação de áreas de hábitat de clima seco e temperados nas altas latitudes do sul da América do Sul no Plioceno apresenta evidências paleobotânicas coincidindo apenas com regiões próximas a latitude de 15°S, e mostra sucessiva mudança na vegetação tropical de terras baixas para uma vegetação bem característica das formações de altas altitudes devido ao soerguimento dos Andes (Ortiz-Jaureguizar & Cladera, 2006). O aparecimento dessas vegetações abertas tornou-se possível a instalação das espécies de *N. chacuru* que apresenta nicho em zonas de Cerrado campestres, com zonas de sobreposição com *N. maculatus* que ocupa fitofissionomias florestais tropicais sazonalmente secas, como também *N. striatipectus* com distribuição pela região Chaquenha. Assim, nas extensões que predominava formações mais fechadas

penetrava-se a espécie de *N. maculatus* e *N. striatipectus*, enquanto que nas regiões com cobertura vegetal mais escassa penetrava *N. chacuru* (Hammen, 1981 *apud* Silva, 1991).

Além disso, a expansão para as regiões de Mata Atlântica de *N. chacuru* pode estar fortemente influenciado pela ação antrópica nessas regiões, fazendo com que zonas que outrora eram de mata fechada se tornassem zonas abertas, possibilitando a invasão dessa espécie para essas regiões. É sabido que as formações vegetais abertas já existiam na AS no período correspondente com a divergência das espécies de *Nystalus* da linhagem áreas abertas. Contudo, não foi possível relacionar o surgimento dessas espécies com algum ou alguns eventos biogeográficos que se tenha embasamento na literatura para este período de tempo. Isso possivelmente está relacionado com a escassez de estudos filogeográficos com aves para as áreas abertas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que o gênero *Nystalus* é formado por duas linhagens principais: uma representada pelas espécies exclusivamente de áreas florestais tropicais sazonalmente secas: *N. maculatus* e *N. striatipectus*, enquanto a outra é formada pelas espécies, que na sua maioria, pertencem a formações florestais, sendo estas: *N. chacuru*, *N. radiatus*, *N. striolatus*, *N. obamai* e *N. torridus*. A única discordância entre os métodos filogenéticos empregados na análise do ND2 foram em relação à espécie mais basal da segunda linhagem, isso porque para a hipótese com ML a espécie que primeiro divergiu foi *N. chacuru* e para o método de IB foi *N. radiatus*.

Por outro lado, nas reconstruções filogenéticas baseadas no fragmento nuclear não foi observado boa resolução das relações entre as espécies, já que se mostraram, em sua grande maioria, polifiléticas e com baixos suportes dos nós. Essa baixa resolução pode estar fortemente relacionada com o processo de “incomplete lineage sorting”. Portanto, essa pouca resolução entre o fragmento nuclear pode estar influenciando fortemente os resultados das hipóteses filogenéticas para os fragmentos concatenados, já que também os resultados não foram conclusivos.

Para a hipótese do relógio molecular baseado no ND2 é possível concluir que a separação do gênero *Nystalus* ocorreu há aproximadamente 22,96 Maa, compreendendo o início do período Mioceno. O evento que deu origem a linhagem florestal e a linhagem de áreas abertas foi aproximadamente 9,41 Maa, no início do Mioceno tardio. O evento que deu origem a *N. chacuru* ocorreu a 4,16 Maa, seguida de *N. radiatus* com 3,42 Maa, e de

1,49 Ma para as espécies de *N. striolatus*, *N. obamai* e *N. torridus* dentro da linhagem florestal. Dentro da linhagem de áreas abertas houve a diversificação com 2,56 Ma e *N. maculatus* e *N. striatipectus* sofreram especiação, respectivamente, há 1,22 Ma e 0,59 Ma, compreendendo ao Pleistoceno. Contudo, com relação aos aspectos biogeográficos, é possível que as mudanças ocorridas na América do Sul, como a formação de regiões de savana, a taxa de elevação dos Andes e a hipótese dos rios tenham contribuído fortemente para a diversificação das espécies do gênero, no entanto, possivelmente não foram os únicos, já que nem todos os eventos ocorridos no passado na América do Sul foram bem elucidados até o momento.

REFERÊNCIAS

- Absy, M. L.; T. van der Hammen. Some paleoecological data from Rondonia, Southern part of the Amazon basin. *Acta Amazonica*. 6. 293-299. 1976.
- Antonelli, A.; Quijada-Mascareñas, A.; Crawford, A.J.; Bates, J. M.; Velasco, P. M.; Wüster, W. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. 386-404. Em: Hoorn, C.; Wesselingh, F. P. (eds.). *Amazonia: landscape and species evolution*. Oxford. Blackwell Publishing. 2010.
- Batalha-Filho, H. Padrões e processos de diversificação em aves da Amazônia e da Mata Atlântica. Instituto de Biociências. Departamento de genética e biologia evolutiva. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012.
- Bruford, M. W.; Hanotte, O.; Brokfield, J. F. Y.; Burke, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach* (ed. by A.R. Hoelzel). 225-269. IRL Press. Oxford. 1992.
- Brumfield, R. T. Inferring the origins of lowland neotropical birds. *Auk*. 129. 367-376. 2012.
- Bush, M. B.; de Oliveira, P. E. The rise and fall of the refugial hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. *Biot. Neotrop.* 6. 1-17. 2006.
- Campbell, J. R.; Frailey, K. E.; Romero-Pittman, L. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 239. 166-219. 2006.
- Carvalho, C. J. B.; Almeida, E. A. B. *Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos*. Roca. São Paulo. 2010.
- Coates, A. G.; Obando, J. A. The geologic evolution of the Central American isthmus. 21-56 in J. B. C. Jackson, A. F. Budd, and A. G. Coates, eds. *Evolution and environment in tropical America*. Univ. Chicago Press, Chicago. 1996.
- Coates, A. G.; Collins, L. S. M. P.; Berggren, W. A. The geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with northwestern South. 2004.
- Colinvaux, P.A.; de Oliveira, P. E.; Bush, M. B. Amazonian and Neotropical plant communities on glacial time scales: The failure of the aridity and refuge hypothesis. *Quaternary Sci. Rev.* 19. 141-169. 2000.
- Cracraft, J. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: areas of endemism. *Ornithol. Monogr.* 36. 49-84. 1985.
- Cracraft, J.; Prum, R. O. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution*. v.42. 603-620. 1988.
- Dowsett, H. J.; Barron, J. A.; Poore, R. Z. Thompson, R. S. M.; Cronin, T. M.; Ishman, S. E.; Willard, D. A. Middle Pliocene Paleoenvironmental Reconstruction: PRISM2. *US Geological*. 103. 1999.
- Drummond, A. J., Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Heled, J.; Kearse, M.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Thierer, T.; Wilson, A. Geneious. Version 6.1. <http://www.geneious.com/>. 2010.
- Farris, D. W., Jaramilo, C., Bayona, G., Restrepo-Moreno, S. A., Montes, C., Cardona, A., Mora, A., Speakman, R. J., Glasscock, M. D.; Valencia, V. Fracturing of the Panama Isthmus during initial collision with South America. *Geology*. 39. 1007-1010. 2011.
- Haffer, J. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*. 165. 131-137. 1969.

- Haffer, J. Ciclos de tempo e indicadores de tempos na história da Amazônia. *Estudos Avançados*. 15. 7-39. 1992.
- Haffer, J.; Prance, G. T. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. *Estudos Avançados*. 2002.
- Haffer, J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz. J. Biol.* 68. 917-947. 2008.
- Hall, T. A.; BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 41. 95-98. 1999.
- Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 17.754-755. 2001.
- Hooghiemstra, H.; Wijninga, V. M.; Cleff, A. M. The paleobotanical records of Colombia: implications for biogeography and biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 93. 297-325. 2006.
- Hoorn, C.; Wesselingh, F. P.; ter Steege, H.; Bermudez, M. A.; Mora, A.; Sevink, J.; Antonelli, A. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science (New York, N.Y.)*. 330. 927-931. 2010.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Disponível em: <http://www.iucn.org/>. Acessado dia 25 de Julho de 2013.
- Lacerda, D. R. Filogeografia comparada e filogenia de espécies de *Thamnophilidae* (aves passeriformes) de mata atlântica de Minas Gerais. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/labs/lbem/pdf/danidout.pdf>. Acessado em 21 de novembro de 2013. 2004.
- Latrubesse, E. M.; Cozzuol, M.; Silva-Caminha, S. A. F.; Da Rigsby, C. A.; Absy, M. L.; Jaramillo, C. The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth Science Reviews*. 99. 99-124. 2010
- Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25. 1451-1452. 2010.
- Lundenberg, J. G.; Marshall, L. G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M. C. S. L.; Wesselingh, F. The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. 13-48 In: L. R.; Malabarba, R. E. Reis, R. P.; Vari, Z. M.; Lucena, C. A. S. Lucena (eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs. 603. 1998.
- Maddison, W. P.; Knowles, L. L. Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. *Syst. Biol.* 55. 21-30. 2006.
- Marini, M. A.; Hackett, S. J. A multifaceted approach to the characterization of an intergeneric hybrid manakin (*Pipridae*) from Brazil. *Auk* 119. 1114-1120. 2002.
- Martin, L.; Mörner, N. A.; Flexor, J. M.; Suguio, K. Reconstrução de antigos níveis marinhos do Quaternário. Sociedade Brasileira de Geologia. São Paulo. 1982.
- Martins, D. M. Sistemática molecular e filogeografia do gênero *Phoenicircus* Swainson, 1832 (Aves: Cotingidae). Museu Paraense Emílio Goeldi. Dissertação. 2012.
- Moritz, C.; Patton, J. L.; Schneider, C. J.; Smith, T. B. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31. 533-563. 2000.
- Morrone, J. J. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annu Rev Entomol.* 467-494. 2006.
- Noblet, V.; Lavenu, A.; Marocco, R. Concept of continuum as opposed to periodic tectonism in the Andes. *Tectonophysics*. 255. 65-78. 1996.
- Ortiz-Jaureguizar, E.; Cladera, G. A. Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments*. 66. 498-532. 2006.
- Pamilo, P.; Nei, M. Relationships between Gene Trees and Species Trees. *Mol. Biol. Evol.* 5. 568-583. 1988.
- Patton, J.L.; da Silva, M. N. F.; Malcolm, J. R. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (*Rodentia*, *Echimyidae*) of the Amazon basin - a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution*. 48. 1314-1323. 1994.
- Patton, J. L.; da Silva, M. N. F.; Malcolm, J. R. Mammals of the rio Jurua and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 244. 1-306. 2000.
- Posada, D.; Crandall, K. A. JModeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14. 817-818. 1998.
- Rambaut, A.; Drummond, A. J. Tracer v1.4. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Acessado em dezembro de 2014. 2007.
- Ribas, C. C.; Miyaki, C. Análise comparativa de padrões de diversificação em quatro gêneros de psitacídeos neotropicais. *Revista Brasileira de Ornitologia*. 15. 245-252. 2007.
- Ribas, C. C.; Aleixo, A.; Nogueira, A. C. R.; Miyaki, C. Y.; Cracraft, J. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proc. R. Soc. B*. 2011.

- Rogers, J.; Gibbs, R. A. Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Genetics*. 3. 347-359. 2014.
- Silva, J. M. C. Sistemática e biogeografia da superespécie *Nystalus maculatus* (Piciformes: Bucconidae). *Arajuba*. 2. 75-79. 1991.
- Smith, T. B.; Wayne, R. K.; Girman, D. J.; Bruford, M. W. A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science*. 276. 1855–1857. 1997.
- Smith, T. B.; Schneider, C.J.; Holder, K. Refugial isolation versus ecological gradients. *Genetica*. 112. 383–398. 2001.
- Sorenson, M. D.; Ast, J. C.; Dimcheff, D. E.; Yuri, T.; Mindell, D. P. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12. 105-114. 1999.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24. 1596-1599. 2007.
- Tamura, K.; Battistuzzi, F. U.; Billings-Ross, P.; Murillo, O.; Filipowski, A.; Kumar, S. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109.19333–19338. 2012.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipowski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30. 2725-2729. 2013.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24. 4876-4882. 1997.
- Uba, C. E.; Strecker, M. R.; Schmitt, A. K. Increased sediment accumulation rates and climatic forcing in the central Andes during the late Miocene. *Geology*. 35. 979-982. 2007.
- Xia, X.; Xie, Z. DAMBE. Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*. 92. 371-373. 2001.
- Wallace, A. R. On the monkeys of the Amazon. *Proc. Zool. Soc. London*. 20. 107– 110. 1852.
- Whitmore, T. C.; Prance, G. T. *Biogeography and Quaternary History in Tropical America*. Oxford: Oxford University Press. 1987.
- Whitney, B. M.; Piacentini, V. Q.; Schunck, F., Aleixo, A., Souza, B. R. S., Silveira, L. F., Rego, M. A. A name for Striolated Puffbird west of the Rio Madeira with revision of the *Nystalus striolatus* (Aves: Bucconidae) complex. 240–244 in: del Hoyo, J. A.; Elliott, J.; Sargatal, D. A.; Christie (eds.) (2013). *Handbook of the Birds of the World. Special Volume: New Species and Global Index*. Lynx Edicions. Barcelona. 2013.
- Witt, C. *Rates of Molecular Evolution and their application to Neotropical Avian Biogeography*. Louisiana State University. 2004.

CAPÍTULO 2

Distribuição espacial da variabilidade genética em *N. chacuru* e *N. maculatus*

RESUMO

Estudos filogeográficos são definidos com base na distribuição geográfica das linhagens genéticas interespecíficas ou entre espécies próximas filogeneticamente, o que permite investigar processos demográficos como migrações, dispersão e isolamento. A análise combinada de diferentes marcadores apresenta um grande potencial como ferramenta para o estudo da estrutura populacional e para a inferência da história evolutiva das espécies. Esse tipo de análise tem representado um avanço significativo para determinar a contribuição relativa do isolamento e do fluxo gênico nos processos de divergência. Assim, o objetivo deste capítulo é elucidar os padrões filogeográficos das espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus* com intuito de entender como os eventos históricos podem ter contribuído para moldar a distribuição atual da variabilidade genética nestas duas espécies. Foram utilizadas amostras de tecido 61 de indivíduos, sendo 33 *N. chacuru* e 29 *N. maculatus*. Foi utilizado dois segmentos de DNA, o segmento de DNA mitocondrial foi do gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2), e o segmento de DNA nuclear amplificado foi de uma região do íntron 5 do β -fibrinogênio (FIB5). Foram realizadas as análises populacionais de distância genética, inferência da diversidade genética e cálculo de análise variância molecular (AMOVA), além de construção de rede de haplótipos. Os dados obtidos para a diversidade entre as espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus* foi de 48%, enquanto dentro de cada uma das espécies foi respectivamente de 0,9 e 0,2%. Os resultados sugerem que para a caracterização genética do gene mitocondrial a diversidade haplotípica foram maiores para as duas espécies estudadas. A AMOVA sugeriu que as suas espécies são distintas e estão estruturadas. A rede de haplótipos para o gene mitocondrial sugere que *N. chacuru* apresenta três haplogrupos, C-1 com espécies distribuídas mais ao leste do Brasil, C-II localizadas mais o oeste de sua distribuição e C-III representada pelos indivíduos do Pará; já para *N. maculatus* apresentando dois haplogrupos M-I situado mais ao nordeste do Brasil e o M-2 com uma distribuição mais entre centro-norte do Brasil. No entanto, mesmo o fragmento nuclear apresentando uma menor variação, a espécie de *N. maculatus* apresentou dois haplogrupos corroborando com o resultado para ND2. Portanto conclui-se que as espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus* são espécies válidas e apresentam estruturadas.

Palavras-chave: Filogeografia, diversidade genética, estruturação.

INTRODUÇÃO

A filogeografia é definida como o estudo da distribuição geográfica de linhagens genéticas dentro da mesma espécie ou entre espécies próximas filogeneticamente, o que permite investigar processos demográficos como migrações, dispersão e isolamento (Ströher, 2013). Primeiramente, as análises eram baseadas em dados filogenéticos intraespecíficas de segmentos do DNA mitocondrial (Avise et al., 1987; Avise, 2000). Porém, críticas vêm aumentando sobre a utilização de marcadores mitocondriais empregados isoladamente para os estudos filogeográficos, alegando que os mesmos não são suficientes para inferir sobre a história biogeográfica das espécies de aves (Edwards, 1993; Edwards *et al.*, 2005).

Diante disso, estudos filogeográficos que combinam marcadores molecular nuclear e mitocondrial, com intuito de investigar indícios mais robustos que corroborem ou refutem hipóteses vêm crescendo na literatura (Cabanne *et al.*, 2008; Sternkopf *et al.*, 2010; Flórez-Rodríguez *et al.*, 2011). As análises combinadas de diferentes marcadores apresentam grande potencial como ferramenta para o estudo da estrutura populacional e para a inferência da historia evolutiva das espécies. Esse tipo de análise tem oferecido um avanço significativo para determinar a contribuição relativa do isolamento e do fluxo gênico nos processos de divergência (Sousa, 2012), além de abrir a possibilidade de inferências mais confiáveis dos aspectos da história evolutiva, reduzindo o risco de se perder um evento ou processo devido à falta de variação adequada no tempo e no espaço em uma sequência particular do DNA (Templeton, 2004).

De acordo com Silva (1991), *N. maculatus* e *N. chacuru* são espécies simpátricas em grande parte da sua distribuição geográfica, mas não sintópicas. Espécies sintópicas, que utilizem recursos similares no ambiente, podem ter na diferenciação de nicho a base para sua coexistência (Begon *et al.*, 1996). Isso pode ser favorecido devido ao princípio da exclusão competitiva, onde duas espécies competidoras coexistem em um ambiente estável, resultando na diferenciação dos seus nichos efetivos. Assim se não houver uma diferenciação entre as espécies competidoras uma eliminará a outra (Begon *et al.*, 2007). Porém, alguns estudos indicam que a competição pode ter menos influência na estruturação da taxocenose do que outrora se pensava (Barbault & Maury, 1981; Gonzalez-Romero *et al.*, 1989).

O interesse em estudar a coexistência de espécies está no fato que populações são limitadas por fatores comuns e por interações antagônicas. No entanto, a existência de

super-espécies capazes de dominar o ambiente e excluir outra é uma possibilidade teórica, já que o que se observa na natureza, e em especial nos trópicos, são lugares repletos de espécies co-ocorrentes (Giacomini, 2007).

Assim, o objetivo deste capítulo é elucidar os padrões filogeográficos das espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus* com intuito de entender como os eventos históricos podem ter contribuído para moldar a distribuição atual da variabilidade genética nestas duas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram utilizadas amostras de tecido (sangue ou músculo) de 61 indivíduos, sendo 33 *N. chacuru* e 29 *N. maculatus* (Figura 13; Anexo 1), compreendendo os estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Piauí, Tocantins; além da Bolívia, Peru e Paraguai. As amostras foram cedidas pelos curadores de diversas coleções ornitológicas de museus nacionais e internacionais. Além de amostras da coleção do laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade de Brasília (LabGenBio)

Extração de DNA

As amostras provenientes de sangue foram extraídas individualmente utilizando o procedimento padrão com digestão com proteinase K, seguindo de purificação com Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico nas proporções de (25:24:1) de acordo com Bruford e colaboradores (1992) (Anexo 2). As amostras de músculo provenientes dos Museus foram extraídas utilizando o Kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen) e Hiyied™Plus Genomic DNA Mini Kit (Blood/ Tissue/ Cultured Cells) Real Genomics™, segundo recomendações dos fabricantes.

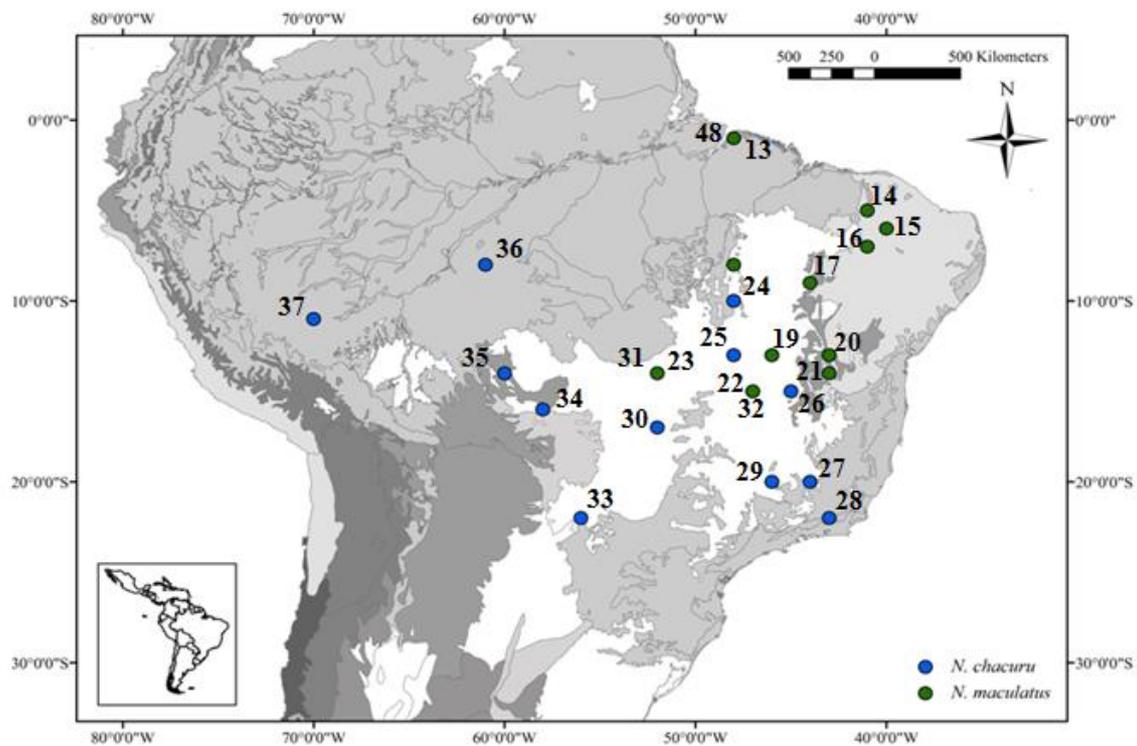


Figura 13. Mapa da distribuição dos pontos de amostragem para as espécies de *N. chacuru* (pontos azuis) e *N. maculatus* (pontos verdes). Os números correspondem às localidades amostradas e discriminadas no Anexo 1. Os pontos 31/23, 22/32 e 13/48 são localidades de sobreposição entre *N. chacuru* e *N. maculatus*.

Marcadores moleculares

Foram utilizados um segmento de DNA mitocondrial e um segmento de DNA nuclear. Os fragmentos de DNA mitocondrial foram do gene NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2), amplificado utilizando os iniciadores LMET e H6313 (Sorenson *et al.*,1999), além de dois iniciadores internos L5758 e H5766 (Sorenson *et al.*,1999). O segmento de DNA nuclear amplificado foi da região do íntron 5 do β -fibrinogênio (FIB5), com os iniciadores FIB5 e FIB6 (Marini & Hackett, 2002). (anexo 3). Os segmentos foram amplificados por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando o seguinte protocolo de amplificação: uma desnaturação inicial de 7 minutos a 75°C, seguidos de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, seguido de temperatura de anelamento de 55°C para a região do íntron 5 do β -fibrinogênio (FIB5) e 56°C para o gene desidrogenase subunidade 2 (ND2) por 40 segundos; extensão de 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados por reação enzimática com exonuclease I e a fosfatase alcalina de camarão (ExoI/SAP, USB), seguindo recomendações do fabricante.

Os produtos amplificados por PCR foram sequenciados utilizando o *kit* Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências obtidas para o gene mitocondrial e nuclear foram analisadas e corrigidas com auxílio do programa Geneious 6,1. (Drummond *et al.*, 2010) O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) no programa BioEdit.

Análises populacionais

Distância genética

Para a realização de análises que avaliam os padrões de variação em nível interespecífico para as espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus*, foi verificado a distância genética não corrigida (distância p) dentro e entre as espécies estudadas. Esses cálculos foram realizados com base no programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2007), utilizando apenas os dados mitocondriais, por apresentar uma maior número de sítios variáveis em comparação com o número de sítios variáveis para o locus nuclear.

Inferência da diversidade genética e Amova

Para medir os parâmetros de diversidade genética foi utilizado o programa DNAsp (Librado & Rozas, 2010). O mesmo programa foi utilizado para identificar os haplótipos e extrair o arquivo de entrada (.arp) para análise no Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010). Neste último, foi calculada a diversidade nucleotídica (D_N) e a diversidade haplotídica (D_H) para os segmentos mitocondrial e nuclear. Também foi realizada Análise da Variância Molecular (AMOVA, Excoffier & Lischer, 2010) para o gene mitocondrial por apresentar um número amostral com maior número de localidades. A significância dos valores dos índices de fixação foi testada por permutações não-paramétricas (10.000 permutações foram realizadas). Matrizes de distância genética (Φ_{ST}) par a par também foram estimadas com o mesmo programa.

Construção de rede de haplótipos

Primeiramente, foi inferido os haplótipos para os locus ND2 e FIB5 com auxílio do programa DNAsp (Librado & Rozas, 2010). A construção da rede de haplótipos foi feita com o programa Network (Fluxus Technology, 2012), usando o método *Median Joining*.

RESULTADOS

Divergência genética

Os índices de diversidade genética não corrigidos (distância p) foram obtidos para o ND2 (1026 pb). A diversidade genética entre as espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus* foi de 48%, enquanto dentro de cada uma das espécies foi, respectivamente, de 0,9% e 0,2%.

Índices de diversidade nucleotídica e haplotípica

Nas 56 sequências obtidas para o ND2 (1026 pb) foram identificados 151 sítios variáveis e 875 sítios conservados, com 27 haplótipos para *N. chacuru* e 22 haplótipos para *N. maculatus* (Tabela 2). Para o fragmento nuclear foi analisado 47 sequências, apresentando 25 sítios variáveis e 554 sítios conservados, sendo destascinco haplótipos par *N. chacuru* e 20 haplótipos para *N. maculatus*.

Tabela 2. Caracterização genética das espécies de *N. chacuru* e *N. maculatus* para o gene mitocondrial (ND2) e o fragmento nuclear (FIB5).

Táxon	ND2			FIB5		
	NH	D _N	D _H	NH	D _N	D _H
<i>N. chacuru</i>	27	0,003 +/- 0,002	0,984 +/- 0,015	5	0,002 +/- 0,002	0.490 +/- 0.142
<i>N. maculatus</i>	22	0,002 +/- 0,001	0,986 +/- 0,016	20	0,0009+/-0,0009	0,960 +/- 0,022

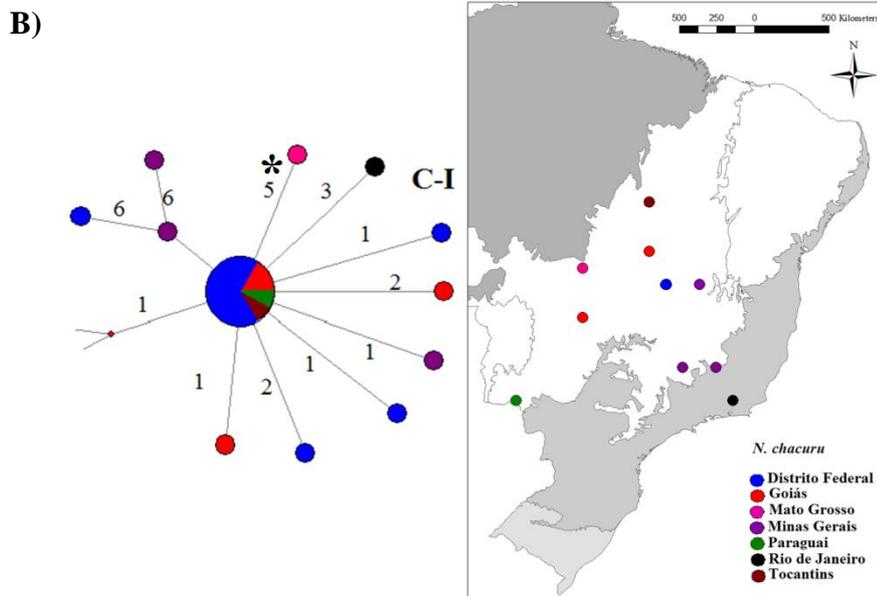
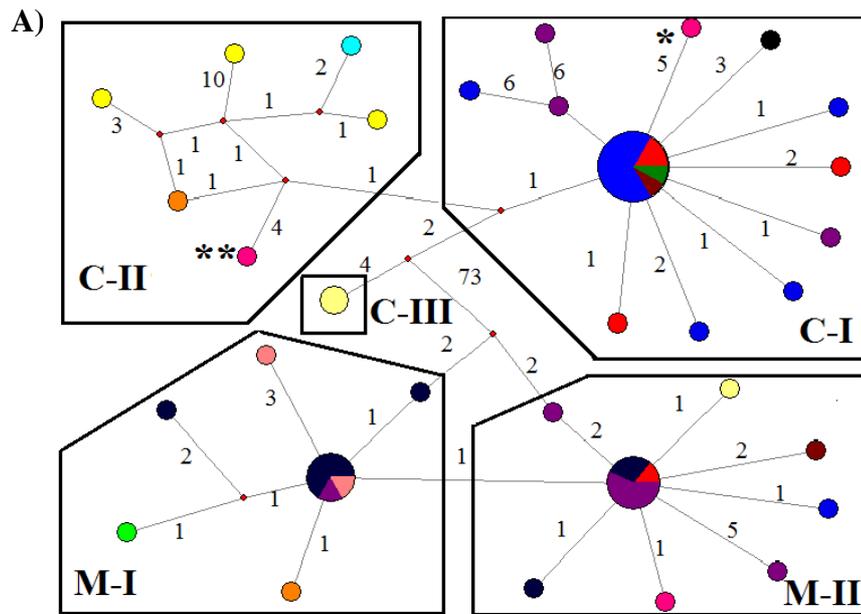
NH: número de haplótipos; **D_N:** Diversidade nucleotídica; **D_H:** Diversidade haplotípica.

Rede de haplótipos

Diante dos resultados observados pela rede de haplótipos para o ND2 (Figura 14) é possível inferir que *N. chacuru* apresenta três grupos, um mais a leste da sua distribuição, haplogrupo C-I, outro mais a noroeste da sua distribuição, haplogrupo C-II, e por último, o haplogrupo C-III, com indivíduos do Pará. Para o fragmento nuclear (Figura 15), o resultado foi de certa forma congruente com o gene mitocondrial. Contudo, não foi possível utilizar os dados das amostras do oeste da distribuição de *N. chacuru*, compreendendo as regiões do Amazonas, Bolívia e Peru, por haver dificuldades na amplificação dessas amostras para este fragmento. O que resultou em apenas um grupo de haplótipos mais central e outros quatro haplótipos mais recentes

Para o gene mitocondrial ND2, foi possível identificar para a espécie de *N. maculatus*, apenas dois haplogrupos denominados de M-1, situado mais ao nordeste do

Brasil e o M-2, com distribuição mais pelo centro-norte do Brasil. Para estes dois grupos foram observados o compartilhamento de haplótipos das regiões do norte de Minas Gerais e Piauí. No entanto, mesmo o fragmento nuclear apresentando uma menor variação, a espécie de *N. maculatus* apresentou dois haplogrupos corroborando com o resultado para ND2



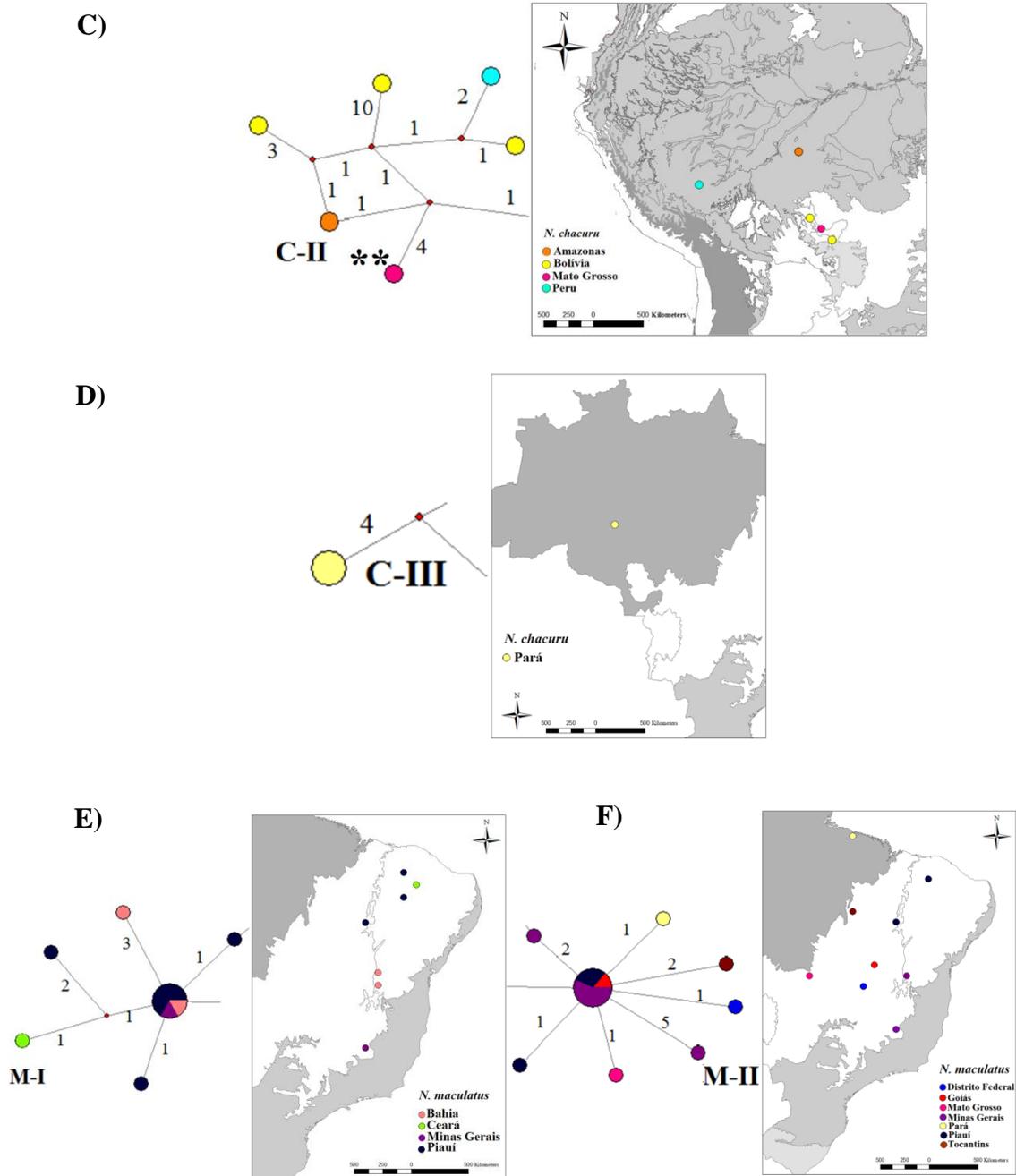


Figura 14. Rede de haplótipos obtidas pela análise de um fragmento de 1.026 pb do gene mitocondrial ND2 (A). As cores dos haplótipos correspondem as localidades amostradas em seus respectivos mapas. **B) C-I-** corresponde a espécie de *N. chacuru* a leste da sua distribuição; o(*) corresponde à região de Nova Xavantina- Mato Grosso. **C) C-II** indivíduos de *N. chacuru* pertencentes à região oeste da sua distribuição; o (**) corresponde à cidade de Vila Bela da Santíssima Trindade- Mato Grosso. **D) C-III** indivíduos de *N. chacuru* pertencentes à região do Pará. **E) M-I** corresponde à espécie de *N. maculatus*, situado mais ao nordeste da sua distribuição geográfica. **F) M-II** com distribuição geográfica mais ao centro-norte do Brasil.

Análise da Variância Molecular (AMOVA)

N. chacuru

As populações estipuladas partindo dos resultados da rede de haplótipos para o gene ND2 foram: População 1, correspondente ao haplogrupo C-I com representatividade pelas regiões de Nova Xavantina, Mato Grosso (MT), Goiás (GO), Distrito Federal (DF), Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG) e Paraguai (PY). O haplogrupo C-II foi chamado de População 2, correspondendo a Vila Bela da Santíssima Trindade, Mato Grosso (MT), Amazonas (AM), Peru (PER) e Bolívia (BOL). A terceira população, correspondendo ao haplogrupo C-III, apresenta distribuição pelo Pará(PA). Dos resultados obtidos, foi possível observar que a variação entre as populações foi de 71% e dentro das populações foi em torno de 29% ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Análise da variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de *N. chacuru*.

Tipo de variação	G.L	Varição %
Entre as populações	2	71,18
Dentro das populações	28	28,82
Total	30	100

Os resultados para o índice de Fixação (ϕ_{ST}) par a par entre as populações mostraram valores estatisticamente significativos entre as populações 1 e 2 ($P > 0,05$), como também entre as populações 1 e 3 ($P > 0,05$). Sendo que as populações 1 e 2 são mais diferentes do que as populações 1 e 3. Os valores de ϕ_{ST} não foram significativos para as populações 2 e 3, mostrando que essas duas populações são geneticamente mais similares.

N. maculatus

Partindo do resultado da rede de haplótipos, a espécie de *N. maculatus* apresenta dois haplogrupos: M-II designado de população 1, correspondendo os estados da Bahia (BA), Piauí (PI) e Ceará (CE); e M-II, intitulado população 2, compreendendo as regiões de Minas Gerais (MG), Serra Vermelha, Piauí (PI), Tocantins (TO), Distrito Federal (DF), Goiás (GO) e Pará (PA). Os resultados da AMOVA mostram que a variação entre as populações foi de aproximadamente 33%, enquanto a variação dentro das populações foi de 67% ($P > 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4. Análise da variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de *N. maculatus*

Tipo de variação	G.L	Varição %
Entre as populações	1	32.69
Dentro das populações	23	67.31
Total	24	100

DISCUSSÃO

Neste estudo baseado em um marcador mitocondrial e um nuclear foi possível identificar que para o gene mitocondrial a resolução da estrutura populacional das duas espécies foi mais bem elucidada, o que resultou na identificação de três haplogrupos (C-I, C- II e C-III). Em contraste, para o fragmento nuclear não foi possível verificar esses três haplogrupos para a espécie *N. chacuru*, devido as dificuldades de amplificação de algumas amostras.

A rede de haplótipos para as duas espécies com base no ND2 mostra que não ocorre o compartilhamento de haplótipos, sendo duas unidades taxonômicas distintas. E ainda, para o ND2, análise da rede sugere que a espécie de *N. chacuru* encontra-se em uma expansão demográfica recente na região leste da distribuição: haplogrupo C-I, correspondendo às regiões do Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso chegando atéo Paraguai. Tal processo pode ser inferido uma vez que se observa um haplótipo central gerando conexões únicas com outros haplótipos. O haplótipo central apresenta localização pela região mais central de sua distribuição equivalente ao centro-oeste do Brasil, cercado por haplótipos mais recentes, o que sugere que a espécie de *N. chacuru* esteja se dispersando para a região sudeste do Brasil, chegando atéo estado do Rio de Janeiro. Essa expansão recente pode estar sendo favorecida pela ação antrópica, jáque essas regiões da Mata Atlântica sofrem com a grande exploração humana, além de serem as regiões brasileiras, onde se concentra os maiores centros urbanos do Brasil. Diante disso, as regiões de mata ficam escassas, o que pode estar favorecendo a expansão de *N. chacuru*, uma espécie de habitat em zonas de vegetação mais abertas.

As hipóteses filogenéticas para o gene mitocondrial ND2 (veja Capítulo 1), sugerem que *N. chacuru* deriva de uma linhagem florestal que muito provavelmente tenha surgido no que hoje é o oeste da Amazônia por algum evento biogeográfico desconhecido que ocorreu na AS e que contribuiu para a migração de *N. chacuru* para regiões abertas.

Além disso, o resultado obtido pela construção da rede de haplótipos parece congruente com a taxonomia atual de acordo com o *Handbook of the birds of the World* (del Hoyo *et al.*, 2013) e pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) para *N. chacuru* que consideram duas subespécies: *N. c. chacuru* com distribuição formada na rede de haplótipo pelos representantes do leste e *N. c. uncistrostris* com distribuição pela Bolívia, Peru e regiões adjacentes.

Já para *N. maculatus* que se apresenta na rede de haplótipos como uma população estruturada apesar da baixa divergência genética, apresentando duas populações: uma população localizada mais a nordeste e a segunda população localizada mais na região centro-oeste, com dois haplótipos centrais com uma distribuição geográfica mais ampla, podendo estes representarem os haplótipos ancestrais. Este padrão de estruturação sugere que elas estariam em uma expansão demográfica de *N. maculatus* para o gene ND2 em direção a região mais ao nordeste do Brasil, provavelmente influenciada pela ação antrópica. Conclusão similar foi obtida por Vasconcelos e colaboradores (2003) ao trabalhar com a variação da plumagem de *N. maculatus*. Os autores inferiram que uma vez que *N. maculatus* ocorre preferencialmente em ambientes secos como a caatinga e as florestas decíduas, o registro no bioma Mata Atlântica pode estar ligado a uma expansão geográfica ligada a desmatamentos, já que o aparecimento de formações florestais secundárias mais secas pode estar favorecendo a dispersão de *N. maculatus* para essa região.

CONCLUSÃO

Os estudos populacionais em *N. chacuru* e *N. maculatus* indicam estruturação das duas espécies. Tanto *N. chacuru* como *N. maculatus* apresentam uma diversidade haplotípica alta, como também uma variação alta; não compartilham nenhum haplótipo para o gene mitocondrial. Portanto, corroborando com a taxonomia como espécies diferentes, visto que apresentam alta diferenciação genética.

A espécie *N. chacuru* apresenta três haplogrupos para o gene mitocondrial bem distinguíveis geograficamente, sendo que os haplogrupos C-I e C-II parecem corresponder às subespécies taxonomicamente descritas. E ainda, os resultados sugerem que *N. c. chacuru* aparentemente esteja passando por um processo de expansão demográfica recente para a região sudeste do Brasil, caracterizadas por apresentar grande ação antrópica,

fazendo com que a floresta Atlântica recue e dêem espaço a regiões abertas, favorecendo a permanência de *N. chacuru*.

Para *N. maculatus*, conclui-se que existem duas subpopulações apesar da baixa diversidade genética obtida para essa espécie. Uma população com ocorrência pela região nordeste da sua distribuição e outra pela região centro-oeste da sua distribuição, com compartilhamento de alguns haplótipos entre essas duas populações.

REFERÊNCIAS

- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A.; Saunders, N. C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18. 489–522. 1987.
- Avise, J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press. 2000.
- Barbault, R., Maury, M. E. Ecological organization of a Chihuahuan desert lizard community. *Oecologia (Berl)*. 51. 335-342. 1981.
- Begon, M.; Harper, J. L.; & Townsend, C. R. *Ecology: Individuals, Populations and Communities* (Second edition). Blackwell Science, Oxford. 1996.
- Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. *Ecology: Individuals, Populations and Communities* (four edition). Blackwell Science, Oxford. 2007.
- Bruford, M. W.; Hanotte, O.; Brokfield, J. F. Y.; Burke, T. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach* (ed. by A.R. Hoelzel). p. 225–269. IRL Press, Oxford. 1992.
- Cabanne, G. S.; Horta, F. M.; Sari, E. H. R.; Santos, F. R.; Miyaki, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49. 760–773. 2008.
- CBRO. Comissão Brasileira de Registros Ornitológicos. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/>. Acessado dia 23 de novembro de 2014.
- Drummond, A. J., Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Heled, J.; Kearse, M.; Moir, R.; Stones-Havas, S.; Thierer, T.; Wilson, A. Geneious. Version 6.1. <http://www.geneious.com/>. 2010.
- Excoffier, L. H. E. L.; Lischer. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10. 564-567. 2010.
- Edwards, S. V. Long-distance gene flow in a cooperative breeder detected in genealogies of mitochondrial DNA sequences. *Proc. Roy. Soc. (London). Biol. Sci.* 252. 177–185. 1993.
- Edwards, S. V.; Kingan, S. B.; Calkins, J. D. Speciation in birds: genes, geography, and sexual selection. *Proc. Natl Acad. Sci.* 102. 6550–6557. 2005.
- Flórez-Rodríguez, A.; Carling, M. D.; Cadena, C. D. Reconstructing the phylogeny of “Buarremon” brush-finches and near relatives (Aves, Emberizidae) from individual gene trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 58. 297–303. 2011.
- Fluxus Technology. Disponível em: <http://www.fluxus-technology.com> Acessado em janeiro de 2015. 2012
- Giacomini, H. C. Os mecanismos de coexistência de espécies como vistos pela teoria ecológica. *Oecologia Bras.* 11. 521–543. 2007.
- González-Romero, A.; Ortega, A.; Barbault, R. Habitat partitioning and spatial organization in a lizard community of the Sonora Desert, Mexico. *Amphibia-Reptilia*. 10. p. 1-11. 1989.
- del Hoyo, J.; Andrew, E.; Sargatal, J.; Christie, D.A. *Handbook of the Birds of the World* Disponível em : <http://www.hbw.com/plates/start>. Acessado dia 26 de novembro de 2013. 2013.
- Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. v. 25. p. 1451-1452. 2010.
- Marini, M. A.; Hackett, S. J. A multifaceted approach to the characterization of an intergeneric hybrid manakin (Pipridae) from Brazil. *Auk* 119. p. 1114–1120. 2002.
- Silva, J. M. C.; Sistemática e biogeografia da superespécie *Nystalus maculatus* (Piciformes: Bucconidae). *Arajuba*. 2. 75-79. 1991.

- Sorenson, M. D.; Ast, J. C.; Dimcheff, D. E.; Yuri, T.; Mindell, D. P. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12. 105-114. 1999.
- Sousa, S. A. Análise filogeográfica e populacional do gênero *Corythopsis* Sundevall, 1936 (aves: Rhynchocyclidae). Museu Paraense Emílio Goeldi. Dissertação. 2012.
- Sternkopf, V.; Liebers-Helbig, D.; Ritz, M. S.; Zhang, J.; Helbig, A. J.; De Knijff, P. Introgressive hybridization and the evolutionary history of the Herring Gull complex revealed by mitochondrial and nuclear DNA. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 348. 2010.
- Ströher, P. Novos marcadores moleculares e filogeografia comparada de formi (Hymenoptera: Formicidae) do Sul da Floresta Atlântica. Dissertação. Curitiba. 2013.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24. 1596-1599. 2007.
- Templeton, A. R. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*. 13. 789–809. 2004.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24. 4876-4882. 1997.
- Vasconcelos, F. M.; Matrangolo, C. A. R.; Neto, S. D' Angelo. Variação de plumagem e expansão geográfica do Rapazinho-dos-velhos *Nystalus maculatus*. *Catinga*. 20. 66-67. 2003.

CONCLUSÃO GERAL

As reconstruções filogenéticas se mostraram mais informativas para o gene mitocondrial ND2. No entanto, os diferentes métodos utilizados apresentaram arranjos diferentes, particularmente em relação a posição de *N. radiatus* e *N. chacuru*;

As reconstruções filogenéticas para o fragmento FIB5 não foram conclusivas, sendo que a ML mostrou as espécies do gênero são polifiléticas, porém com suporte dos ramos muito baixos. O método de IB mostrou-se um pouco mais informativo que a ML. Contudo, com muitas incertezas nas relações intraespecíficas;

A matriz dos fragmentos concatenados também se mostrou muito pouco informativas, o que leva a concluir que o fragmento nuclear utilizado pode ter forte influência em seus resultados;

As espécies formam dois clados distintos: um clado composto pelas espécies de *N. maculatus* e *N. striatipectus*, de habitat de formações florestais tropicais sazonalmente secas; e o segundo clado representado pelas espécies de *N. chacuru*, *N. radiatus*, *N. torridus*, *N. obamai* e *N. striatipectus*, espécies de habitat florestal, com exceção de *N. chacuru*;

As espécies do gênero *Nystalus* são monofiléticas, com exceção de *N. striolatus* e *N. obamai*. Porém, isso parece ser devido a incongruências na identificação taxonômica dos espécimens analisados;

A separação do gênero *Nystalus* dos outros Bucconidae ocorreu no final no Mioceno inferior, aproximadamente 22,9 Maa. *N. striatipectus* e *N. maculatus* se instalaram nas regiões do centro oeste do Brasil, e posteriormente foi sobrepostas com *N. chacuru*. Já *N. torridus* ocupou as regiões do extremo leste do Brasil, *N. striolatus*/*N. obamai* ocuparam as regiões das margens do rio Madeira no Amazonas e *N. radiatus* se dispersou para o extremo oeste da América do Sul;

O primeiro evento de diversificação no gênero deu origem a dois clados: o primeiro clado composto pelas espécies florestais e o segundo clado com representatividade pelas espécies de habitat de florestas tropicais sazonalmente secas;

A primeira espécie a se diversificar dentro do clado das espécies florestais foi *N. chacuru* que emergiu de uma linhagem florestal, conseguiu ocupar as regiões abertas do Cerrado, e ser considerada hoje uma espécie exclusiva de áreas abertas;

Já *N. radiatus* possivelmente favorecido pelo soerguimento dos Andes no final do Plioceno e soerguimento do Istmo do Panamá, que possibilitou a dispersão dessa espécie para a América Central;

Em contrapartida, o evento que pode ter contribuído para a diversificação das espécies *N. obamai/ striatipectus* e *N. torridus*, possivelmente foi a hipótese de rios como barreira;

Para os estudos filoegográficos não foi evidenciado nenhum compartilhamento de haplótipos entre *N. maculatus* e *N. chacuru*, o que reforça o *status* de espécie para estes dois *taxa*;

Tanto *N. maculatus* quanto *N. chacuru* apresentam forte estruturação genética, sendo que as populações geneticamente diferenciadas parecem condizer com as subespécies descritas na literatura.

ANEXO 1. Relação das amostras que serão analisadas no presente trabalho e suas respectivas localidades de coleta.

Espécie	Localidade	País	Voucher	Museu	Haplótipo ND2	Haplótipo FIB
<i>Nystalus maculatus</i>	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	C38	LabGenBio	Hap6	Hap9
	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	C49	LabGenBio	Hap13	Hap17
	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	H68501	LabGenBio	Hap23	Hap11
	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	H68443	LabGenBio	—	Hap12
	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	H88002	LabGenBio	Hap27	Hap1
	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	NMC4-1	LabGenBio	Hap28	Hap11
	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	MC4NM01	LabGenBio	Hap2	Hap13
	21- Manga-Minas Gerais	Brasil	MS1-103	LabGenBio	Hap28	Hap4
	22- Apa Gama Cabeça de Veado- Distrito Federal	Brasil	P-27	LabGenBio	Hap31	Hap1
	22- Apa Gama Cabeça de Veado- Distrito Federal	Brasil	P-65	LabGenBio	—	Hap14

Continuação da tabela.

23 -Nova Xavantina- Mato Grosso	Brasil	NX15	LabGenBio	Hap8	Hap8
16 -Fazenda Morro Redondo-PI	Brasil	10831	GOELDI	Hap10	Hap4
13 -Ilha do Marajó- Pará	Brasil	1221	GOELDI	Hap29	Hap1
14 - Castelo de PiauÍ- PiauÍ	Brasil	6912	GOELDI	Hap30	Hap22
14 - Castelo de PiauÍ- PiauÍ	Brasil	7009	GOELDI	Hap32	Hap2
14 - Castelo de PiauÍ- PiauÍ	Brasil	7010	GOELDI	—	Hap3
14 - Castelo de PiauÍ- PiauÍ	Brasil	7403	GOELDI	Hap9	Hap16
14 - Castelo de PiauÍ- PiauÍ	Brasil	9993	GOELDI	Hap25	Hap27
14 - Castelo de PiauÍ- PiauÍ	Brasil	9994	GOELDI	Hap26	Hap9
14 - Castelo de PiauÍ- PiauÍ	Brasil	10006	GOELDI	Hap1	Hap15

Continuação da tabela.

	17-Serra Vermelha- Piauí	Brasil	13021	GOELDI	Hap13	Hap1
	17-Serra Vermelha- Piauí	Brasil	13022	GOELDI	Hap14	Hap28
	15-Guadalupe- Piauí	Brasil	15155	GOELDI	—	Hap5
	15- Guadalupe- Piauí	Brasil	15156	GOELDI	Hap20	Hap6
	15-Parambú- Ceará.	Brasil	16846	GOELDI	Hap21	Hap11
	18- Presidente Kennedy-Tocantins	Brasil	2220	MNRJ	Hap22	Hap7
	20- São Félix do Coribe - Bahia	Brasil	1718	MNRJ	Hap24	Hap1
	20- Palmas de Monte Alto - Bahia	Brazil	JMS1	ZMCU	Hap3	Hap13
	19- Fazenda CIPASA - São Domingos - Goiás	Brazil	JMS4	ZMCU	Hap12	Hap19
<i>Nystalus striatipectus</i>	38- Província Velasco- Santa Cruz	Bolivia	DOT6174	AMNH	Hap79	Hap39

Continuação da tabela.

39 -Província Velasco- Santa Cruz	Bolivia	DOT6171	AMNH	Hap7	Hap26
42 -Província Cordillera-Izozog,Santa Cruz	Bolivia	DOT2195	AMNH	Hap77	Hap35
42 - Província Cordillera- Santa Cruz	Bolivia	DOT2208	AMNH	Hap4	Hap24
42 - Província Cordillera- Santa Cruz	Bolivia	DOT2233	AMNH	Hap5	Hap10
42 -Província Cordillera- Santa Cruz	Bolivia	DOT6085	AMNH	Hap76	Hap36
42 -Província Cordillera- Santa Cruz	Bolivia	DOT6102	AMNH	Hap78	Hap37
41 - Concepcion- San Luis National Park	Paraguai	46	KUNHM	Hap74	Hap10
41 - Concepcion- San Luis National Park	Paraguai	96	KUNHM	Hap75	Hap38
40 - Santa Fe- São Matias	Bolívia	42	LSUMNS	Hap18	Hap21
45 - Santa Fe- Santa Cruz	Bolívia	894	LSUMNS	Hap17	Hap20

Continuação da tabela.

	43- Cordellera-Departamento Santa Cruz	Bolívia	7727	LSUMNS	Hap15	Hap25
	47- Província El Tambo- Santa Cruz	Bolívia	47	LSUMNS	Hap16	Hap23
	44- Cordellera- Santa Cruz	Bolívia	238	LSUMNS	Hap19	Hap10
	46- Mizque- Cochabamba	Bolívia	JF4	ZMCU	Hap11	Hap18
<i>Nystalus chacuru</i>	36- Manicoré - Amazonas	Brasil	57554	GOELDI	Hap54	—
	48- Ilha do Marajó- Pará	Brasil	57835	GOELDI	Hap59	Hap29
	48- Ilha do Marajó- Pará	Brasil	57836	GOELDI	Hap55	Hap29
	24- Corrego Porteira- Tocantins	Brasil	0375	GOELDI	—	Hap29
	30- Parque Nacional das Emas- Goiás	Brasil	97	LabGenBio	Hap48	Hap29
	30- Parque Nacional das Emas- Goiás	Brasil	92BR	LabGenBio	Hap34	Hap29

Continuação da tabela.

30- Parque Nacional das Emas- Goiás	Brasil	40BR	LabGenBio	Hap60	Hap29
31- Nova Xavantina- Mato Grosso	Brasil	NX52	LabGenBio	Hap41	—
26- Parque Nacional Grande Sertão Veredas – Minas Gerais	Brasil	33 amarela	LabGenBio	Hap42	Hap29
29- Parque Nacional Serra da Canastra- Minas Gerais	Brasil	42V	LabGenBio	Hap46	—
32- Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73774	COMB	Hap47	Hap29
32- Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73784	COMB	Hap45	—
32- Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73785	COMB	Hap40	Hap34
32- Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H730787	COMB	Hap39	—
32- Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73788	COMB	Hap48	Hap29
32- Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73786	COMB	Hap58	—

Continuação da tabela.

32 -Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H47302	COMB	Hap35	Hap32
32 -Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73789	COMB	Hap34	Hap31
32 -Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73780	COMB	Hap36	—
32 -Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73790	COMB	Hap37	Hap33
32 -Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73791	COMB	Hap49	Hap30
32 -Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73792	COMB	Hap50	—
32 -Estação Ecológica Àguas Emendadas- Distrito Federal	Brasil	H73793	COMB	Hap51	Hap29
25 - Campinaçu – Goiás	Brasil	MZUSP94599	MZUSP	Hap43	—
35 - Vila Bela da Santíssima Trindade - Mato Grosso	Brasil	MZUSP98567	MZUSP	Hap53	—
35 - Vila Bela da Santíssima Trindade - Mato Grosso	Brasil	MZUSP98568	MZUSP	—	Hap29

Continuação da tabela.

	27- Passatempo - Minas Gerais	Brasil	MZUSP88354	MZUSP	Hap44	Hap13
	28- Petrópolis- Rio de Janeiro	Brasil	2344	MNRJ	Hap38	—
	34- Estanica Cambaras- Santa Cruz	Bolívia	573	LSUMNS	Hap57	—
	35- Serrania de Huanchaca- Santa Cruz	Bolívia	3204	LSUMNS	Hap33	—
	35- Parque Nacional Noel Kempff	Bolívia	936	LSUMNS	Hap56	—
	33- Cerro Cora National Park	Paraguai	3563	KUNHM	Hap48	Hap29
	37- Pampas del Heath -Madre de Dios	Peru	BW4	ZMUC	Hap52	—
<i>Nystalus striolatus</i>	4- Madre de Dios; Cuzco Amazonico Reserve	Peru	654	KUNHM	Hap73	Hap44
	5- Rio Beni- La Paz Department	Bolívia	2785	LSUMNS	Hap69	Hap43
	3- Nicolas Suarez - Departamento Pando	Bolívia	3914	LSUMNS	Hap71	Hap42

Continuação da tabela.

	09- Cordillera del Cutucu- Província Morona-Santiago	Equador	1266	LSUMNS	Hap70	Hap42
	2- Rio Pauya-Departamento Loreto	Peru	1347	LSUMNS	Hap72	Hap45
<i>Nystalus obamai</i>	8- Urucu– Amazonas	Brasil	56996	GOELDI	Hap66	Hap45
	8- Urucu -Amazonas	Brasil	56998	GOELDI	Hap62	Hap45
	8- Urucu -Amazonas	Brasil	56997	GOELDI	Hap63	Hap47
	8- Urucu -Amazonas	Brasil	58289	GOELDI	Hap67	Hap42
	10- Santa Rosa -Acre	Brasil	63279	GOELD	Hap65	Hap42
	6- Porto Walter - Acre	Brasil	62028	GOELDI	Hap61	—
	6- Porto Walter - Acre	Brasil	62027	GOELDI	Hap64	—
	6- Porto Walter - Acre	Brasil	62026	GOELDI	—	Hap45

Continuação da tabela.

	11- Capixaba–Acre	Brasil	64437	GOELDI	—	Hap46
	7- RDS Cujubim - Amazonas	Brasil	60122	GOELDI	Hap68	Hap45
<i>Nystalus radiatus</i>	1- Cana-Darién Province	Panamá	589	LSUMNS	Hap81	Hap41
	1- Cana-Darién Province	Panamá	912	LSUMNS	Hap82	Hap41
<i>Nystalus torridus</i>	12- Tailandia- Pará	Brasil	MZUSP98851	MZUSP	Hap80	Hap40

AMNH: American Museum of Natural History; **COMB:** Coleção Marcelo Bagno, Universidade de Brasília (UNB); **GOELDI:** Museu Paranaense Emilio Goedi; **LabGenBio:** Laboratório de Genética e Biodiversidade, Universidade de Brasília (UNB); **LSUMNS:** Louisiana State University Museum of Natural Science; **MNRJ:** Museu Nacional do Rio de Janeiro; **MUZSP:** Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; **KUNHM:** Kansas University Natural History Museum; **ZMUC:** Zoologisk Museum Compenhagen Os haplótipos indicados com (—) para os fragmento mitocondrial (ND2) e nuclear (FIB5), correspondem ausência de sequências.

Anexo 2.

Protocolo de extração SDS

- 300 µl de tampão TNE 1x;
- 30µl de Tris HCL 1M pH 7,5;
- 12,5µl de SDS 20%;
- 20µl de proteinase K 20mg/ml
- Colocar 362,5µl por amostra

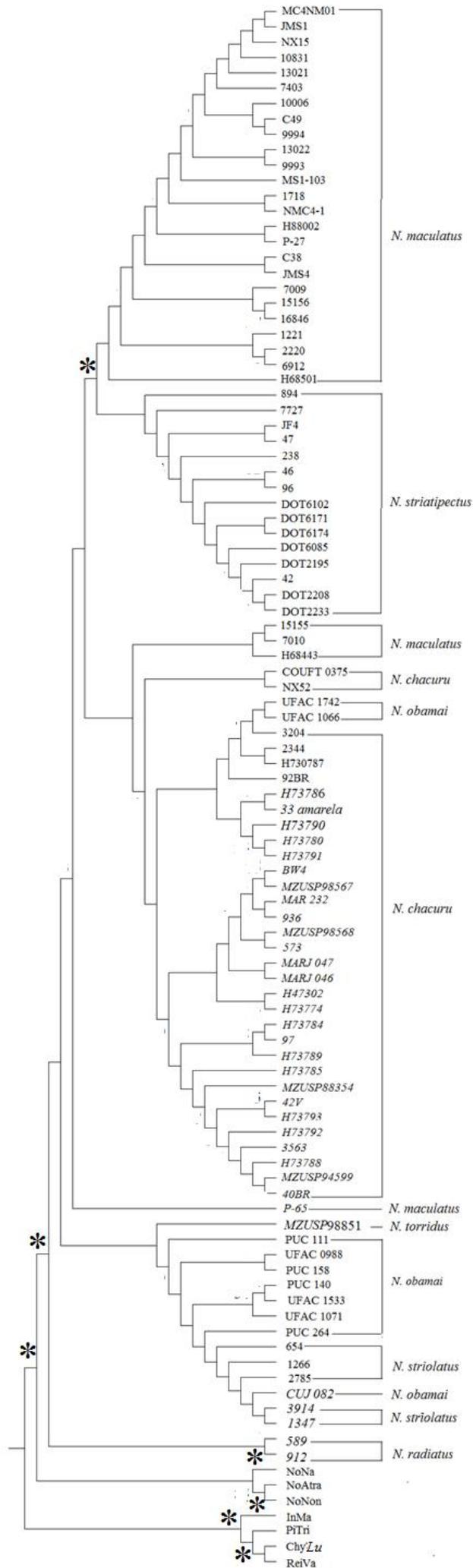
Procedimentos

1. Macerar o capilar contendo sangue e acrescentar o tampão SDS;
2. Inverter levemente o tubo por 15 segundos;
3. Incubar a 55°C por 4 horas ou a 42°C durante 12 horas (overnight);
4. Deixar esfriar e colocar o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 (Colocar 250µl de fenol e 250µl de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) = 370µl;
5. Levantar ao vortex vigorosamente por no mínimo 20 vezes;
6. Centrifugar à 12.000rpm por 10 minutos;
7. Retirar o sobrenadante e colocar em tubo de 1,5ml (pode repetir a centrifugação com o sobrenadante se tiver muita sujeira);
8. Ao sobrenadante colocar 2 a 3 volumes de etanol absoluto para precipitar o DNA (colocar de 800µl a 1 ml);
9. Inverter o tubo levemente até precipitação do DNA (deve ficar com a cor branca);
10. Centrifugar por 5 minutos à 12.000 rpm;
11. Descartar o sobrenadante cuidadosamente;
12. Acrescentar 300µl de etanol 70% ao pellet e dar uma leve agitação para ressuspender;
13. Centrifugar à 12.000 rpm por 5 minutos;
14. Descartar todo etanol e deixar o pellet;
15. Deixar secar todo etanol do tubo, invertendo-o sob um papel toalha. Ressuspender de 50 µl a 200 µl de TE, dependendo da qualidade da amostra.

Anexo 3.

Relação de iniciadores utilizados (5'-3') utilizados. Gene ND2 com iniciadores externos* e internos e para o fragmento nuclear FIB5 e seus respectivos iniciadores.**

Gene	Iniciador	Sequência	Autor
	Lmet *	GGA CCA TAC CCC GAA AAT GA	SORENSEN <i>et al.</i> ,1999
	H6313*	CTC TTA TTT AAG GCT TTG AAG GC	SORENSEN <i>et al.</i> ,1999
ND2	L5758**	GGC TGA ATR GGM CTN AAY CAR AC	SORENSEN <i>et al.</i> ,1999
	L5766**	GGC TGA ATR GGM CTN AAY CAR AC	SORENSEN <i>et al.</i> ,1999
β-fibrinogênio	FIB5	CGC CAT ACA GAG TAT ACT GTG ACA T	MARINI & HACKETT, 2002
	FIB6	GCC ATC CTG GCG ATT CTG AA	MARINI & HACKETT, 2002



Anexo 4. Árvore filogenética para as espécies do gênero *Nystalus* com base em 1622 pb dos segmentos nuclear e mitocondrial concatenados, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). Os terminais representados os números de tombo dado por cada coleção ou museu. (Ver anexo 1) os terminais NoNa, MoAtra e MoMor correspondem ao grupo respectivamente as *Notharchus macrorhynchos*, *Monasa atra*, *Monasa morphoeus*, grupo externos utilizados para o gene mitocondrial ND2. Os terminais representados por InMa, PiTri, ChyLu e ReiVa, correspondem as espécies *Indicator maculatus*, *Picoides tridactylus*, *Chrysocolaptes lucidus* e *Reinwardtipicus validus* respectivamente, utilizada como grupo externo para o segmento nuclear FIB5. Os valores em cada no representados com símbolo (*)descrevem valores de *bootstrap* acima de 0.90.

Anexo 5. Árvore filogenética para as espécies do gênero *Nystalus* com base em 1622 pb dos segmentos nuclear e mitocondrial concatenados, utilizando o método de Inferência Bayesiana (IB). Os terminais representados os números de tombo dado por cada coleção ou museu. (Ver anexo 1) os terminais NoNa, MoAtra e MoMor correspondem ao grupo respectivamente as *Notharchus macrorhynchos*, *Monasa atra*, *Monasa morphoeus*, grupo externos utilizados para o gene mitocondrial ND2. Os terminais representados por InMa, PiTri, ChyLu e ReiVa, correspondem as espécies *Indicator maculatus*, *Picoides tridactylus*, *Chrysocolaptes lucidus* e *Reinwardtipicus validus* respectivamente, utilizada como grupo externo para o segmento nuclear FIB5. Os valores em cada no representados com símbolo (*)descrevem valores de *bootstrap* acima de 0.90.