

CAMILA INGRID MARQUES ALMEIDA

FILOGEOGRAFIA DE *TOLMOMYIAS FLAVIVENTRIS* (WIED, 1831). AVES:
RHYNCHOCYCLIDAE

Belém

2017

CAMILA INGRID MARQUES ALMEIDA

FILOGEOGRAFIA DE *TOLMOMYIAS FLAVIVENTRIS* (WIED, 1831). AVES:
RHYNCHOCYCLIDAE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Dr. Alexandre Luis Padovan Aleixo. Laboratório de Ornitologia. Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Zoologia.

Co-orientador: Bruno Almeida. Mestre em Zoologia UFPA/MPEG.

Belém

2017

CAMILA INGRID MARQUES ALMEIDA

FILOGEOGRAFIA DE *TOLOMOMYIAS FLAVIVENTRIS* (WIED, 1831). AVES:
RHYNCHOCYCLIDAE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Dr. Alexandre Luis Padovan Aleixo
Coordenação de Zoologia, MPEG

Co-orientador: Bruno Almeida
Coordenação de Zoologia, MPEG

Avaliador: MSc. Áurea Aguiar Cronemberger
Coordenação de Zoologia, MPEG

Avaliador: Dr. Sidnei de Melo Dantas
Coordenação de Zoologia, MPEG

Belém
2017

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. AMOSTRAGEM	16
2.2. ANÁLISE MOLECULAR	21
2.2. ANÁLISES VOCAIS E MORFOLÓGICAS	25
3. RESULTADOS	26
3.1. MOLECULARES	26
3.1. MORFOLÓGICOS E VOCAIS	31
4. DISCUSSÃO	35
4.1. ASPECTOS TAXONÔMICOS	35
4.2. ASPECTOS FILOGEOGRÁFICOS	36
5. CONCLUSÃO	38
6. REFERÊNCIAS	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição de *T. flaviventris* e suas subespécies (conforme Caballero, 2016).

-----15

Figura 2 - Mapa de distribuição das amostras utilizadas no trabalho. -----21

Figura 3 - Árvore filogenética *multilocus* construída com base no banco de dados dos genes CYTB, ND2, MUSK e G3PDH, concatenados, com 50 milhões de gerações. Os nós representam os apoios encontrados para a árvore obtida através do método de Inferência Bayesiana (IB) e Árvore de Espécies (AE), respectivamente.-----27

Figura 4 - Distribuição geográfica e localização das amostras, destacando os filogrupos aos quais pertencem. (Filogrupo A - Azul; Filogrupo B - Verde; Filogrupo C - Amarelo; Filogrupo D - Laranja; Filogrupo E - Vermelho).-----27

Figura 5 - Árvore filogenética *multilocus* baseada nos genes CYTB, ND2, MUSK e G3PDH inferida através do método de Árvore de Espécies (AE). Os nós representam os tempos de divergência de cada clado (em milhões de anos). As barras indicam o intervalo de confiança de 95% dos tempos de divergência entre os filogrupos.-----29

Figura 6 - Redes de haplótipos geradas para os genes CYTB (a), ND2 (b), MUSK (c) e G3PDH (d). As cores representam os filogrupos encontrados na árvore filogenética.-----30

Figura 7 - visão lateral dos indivíduos selecionados para análise morfológica (direita - grupo “*viridiceps*” e esquerda - grupo “*flaviventris*”). Os números indicados pelas setas representam os caracteres comparados. I - Bico; II - Garganta; III - Peito e IV - Barriga.-----32

Figura 8 - visão ventral dos indivíduos selecionados para análise morfológica (direita - grupo “*viridiceps*” e esquerda - grupo “*flaviventris*”). Os números indicados pelas setas representam os caracteres comparados. I - Bico; II - Garganta; III - Peito e IV - Barriga.-----33

Figura 9 - Comparação de sonogramas de *calls* dos grupos *flaviventris* (A) e *viridiceps* (B).-----34

Figura 10 - Distribuição geográfica estimada para os grupos *viridiceps* e *flaviventris* (representado aqui pelos filogrupos B, C, D e E), indicados no mapa. A área destacada com os traços horizontais representa a área de sobreposição da distribuição geográfica dos Filogrupos B, E e *viridiceps*.---37

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, em especial à minha mãe, Roselene Marques por todo empenho e dedicação na minha criação, por todo apoio financeiro e emocional durante estes 22 anos de amizade e companheirismo, serei para sempre grata à você. Em segundo lugar gostaria de agradecer ao universo pelos eventos aleatórios que me trouxeram até este momento e a mim mesma por todos os obstáculos superados, mesmo que nem sempre eu acreditasse que conseguiria.

Agradeço ao governo brasileiro, em especial ao CNPq pela bolsa concedida para a realização deste trabalho e a todo apoio financeiro. À todos os cientistas brasileiros e estrangeiros que com seu esforço e dedicação formaram toda a base de referência deste trabalho. A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, do Jardim I até a universidade, em especial à Dra. Roberta Valente, Dr. Leonardo Sena, Dr. Edmar Costa, Dra. Silvia Mardegan e Dr. Nilson Praia Anselmo (*in memoriam*), que foi um dos responsáveis pelo meu interesse em biologia evolutiva. Agradeço a todo o quadro docente do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, e a todos os funcionários e colaboradores do Instituto de Ciências Biológicas e Museu Paraense Emílio Goeldi

Agradeço a minha família, à minha querida avó Conceição, que foi de fundamental importância em meu desenvolvimento durante meus primeiros anos de vida. À minha querida prima-irmã Caroline Casadei, ao meu querido padrasto, Márcio Gusmão, aos meus irmãos, tios e primos de Belém e Recife.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Dr. Alexandre Aleixo pela confiança em me oferecer este belíssimo projeto no qual tive grande prazer em participar e ao apoio incondicional. Foi uma grande honra trabalhar com você durante este tempo no Museu Goeldi. Ao meu querido co-orientador Bruno Almeida, agradeço muitíssimo por todo o auxílio e por todo conhecimento que adquiri com você (principalmente sobre memes) e acima de tudo, obrigada pela paciência!

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Museu Goeldi, Tânia Quaresma, Nayron Francês, Áurea Cronemberger, Matheus Carvalho, Juliana Damasceno, Gilmax Ferreira, Tibério Burlamaqui, Roxiris Azuarje, Bernardo Prestes, Nany Simões, Larissa Hasnah, Saulo Borges, Kaio Hage, Hanna Pamplona, Antonita Santana e Lincoln Carneiro. Um agradecimento especial à Sofia Marques por todo apoio intelectual (desculpe Sofia por atraparlar tanto você com as minhas dúvidas o tempo todo! Volte logo para o Brasil!) e ao Geraldo Filho pelo profissionalismo e competência em ser o responsável por gerar as sequências de DNA utilizadas neste estudo. Obrigada a todos por esses quase dois anos de risadas, abraços e muita amizade. Sentirei bastante saudade de vocês!

Agradeço a todos os colegas de turma do Bacharelado 2013, mesmo não tendo sido parte da turma durante todo o tempo da graduação, vocês fizeram eu me sentir como se fosse, muito obrigada pela simpatia, companheirismo e solidariedade e aos vários cinco minutos que passamos juntos. Gostaria de agradecer aos meus colegas de 2012 Danielson Amaral e Ana Laura Santos por todo esse tempo de amizade à todos os milhões de trabalhos e seminários que fizemos juntos. Aos outros queridos colegas do Bacharelado 2012 que também fizeram parte da minha trajetória na graduação, muito obrigada.

Aos amigos que arranjei pela vida e que contribuíram fundamentalmente na minha trajetória, Lísis Ruschel, my bro Camila Felix, Ana Marina Coutinho, Yasmin Cantuária, Murilo Bitar, Lorena Dinelly, e aos meus irmãos-de-outra-mãe de Liverpool, Bruno Sampaio, Amanda Weber, Mari Peifer, Victor Hugo, Aline Nudi, Nicolinda Neumann, Daniel Sangiorge e meu ursinho favorito, Diego Moura. Vocês são muitíssimo especiais para mim, muito obrigada por existirem.

Agradeço à banca, à querida Áurea Cronemberger e Sidnei Dantas por dispor de seus tempos para avaliar meu trabalho e comparecer à defesa. Acredito muitíssimo na competência e intelecto de vocês e agradeço desde já.

E por último, um agradecimento mais que especial à minha namorada e companheira de vida. Cristina Müller. Obrigada por estar sempre presente, mesmo estando há 4,000km de distância. Obrigada por todo carinho, por todos os sorrisos, por toda felicidade que você me proporciona todo dia, por aguentar todas as frustrações, choros e pessimismo e, principalmente, por sempre acreditar em mim não importa o quão difícil as coisas pareçam. Eu te amo.

Gostaria de pedir desculpas antecipadas a qualquer pessoa que tenha contribuído para minha formação mas que não foi incluída nestes agradecimentos, quem me conhece sabe que boa

memória não está entre as minhas maiores qualidades. À todas essas pessoas, sinto-me imensamente agradecida.

Muitíssimo Obrigada!

“You're an interesting species. An interesting mix. You're capable of such beautiful dreams, and such horrible nightmares. You feel so lost, so cut off, so alone, only you're not. See, in all our searching, the only thing we've found that makes the emptiness bearable, is each other.”

(Carl Sagan, *Contact*)

RESUMO

A biodiversidade da região neotropical é uma das mais maiores do mundo, entretanto, ainda se mostra um desafio explorar e compreender todos os aspectos de tamanha riqueza biológica, principalmente no que diz respeito as relações evolutivas entre os organismos. *Tolmomyias flaviventris* é uma ave da família Rhynchocyclidae, com seis subespécies reconhecidas: *T. flaviventris aurulentus*, *T. flaviventris dissors*, *T. flaviventris flaviventris*, *T. flaviventris viridiceps*, *T. flaviventris zimmeri* e *T. flaviventris subsimilis*, apresentando ampla distribuição ao longo da América do Sul. Apesar disso, não existem estudos direcionados acerca das relações filogenéticas dentro do grupo, com objetivo de definir se as diferentes subespécies representam unidades taxonômicas válidas. Utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, foi investigada a validade dos táxons propostos para *T. flaviventris*, estimando os tempos de divergência entre eles e verificando se os mesmos encontram-se relacionados com a formação de barreiras geográficas e ecológicas. Utilizando 42 amostras de tecidos que cobriram quatro das seis subespécies de *T. flaviventris*, as análises moleculares mostraram a filogenia do grupo, com uma intensa separação entre a população do oeste amazônico e as demais, evidenciadas nas redes de haplótipos e divergências genéticas, configuração esta congruente com a elevação de *T. viridiceps* ao nível de espécie, como já reconhecida por alguns autores e corroborado neste estudo também por diagnoses morfológicas e vocais distintas para as duas espécies. As análises de tempos de diversificação estimaram uma separação de 1,11 milhões de anos entre as duas espécies, congruente com o tempo de formação da bacia amazônica, em meados do Pleistoceno. As diversificações dentro do grupo *flaviventris* também apontam para uma diversificação tendo rios como barreira, embora seja possível que outros processos tenham atuado, como dispersão ou diversificação através de refúgios florestais.

1. INTRODUÇÃO

A região neotropical é uma região biogeográfica cuja diversidade de vida é um imenso repositório de informação genética (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 2008), abrangendo toda a América do Sul e parte da América Central (Olson *et al.*, 2001). A sua diversidade possui uma imensurável importância ecológica e econômica, incluindo paisagens extremamente diversas que vão desde florestas tropicais úmidas à desertos secos. O Brasil é o país neotropical com a fauna e flora de maior abundância. Em seus aproximadamente 8.5 km² de extensão, ela ocupa a maior parte do continente sul-americano e possui aproximadamente 100 mil espécies de vertebrados descritos (Peres *et al.*, 2011). De fato, a medida que os estudos sobre a biodiversidade avançam, mais espécies novas são descritas e os catálogos de biodiversidade precisam ser constantemente atualizados. Além da descrição de espécies totalmente novas para a ciência, novas pesquisas, principalmente as que envolvem dados moleculares, têm mostrado que uma quantidade significativa de espécies que são tradicionalmente divididas em subespécies ou raças mostram-se na verdade um conjunto de duas ou mais espécies diferentes, a chamada diversidade críptica (Mata *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2009; Zimmer *et al.*, 2001; Thom & Aleixo, 2015). Uma vez que a especiação nem sempre é acompanhada de mudanças morfológicas, é provável que o verdadeiro número de espécies biológicas seja maior do que o atualmente descrito, já que grande parte da taxonomia vigente ainda é delineada puramente em caracteres morfológicos (Bickford *et al.*, 2007, Condon *et al.*, 2008).

A filogeografia é o campo de estudo que se preocupa com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente aquelas no nível interespecífico, lidando com componentes históricos e filogenéticos da distribuição espacial das linhagens gênicas (Avice, 2000). As análises e interpretações das distribuições das linhagens requerem a contribuição de diversas disciplinas como a biologia molecular, genética de populações, sistemática filogenética, etologia, biogeografia, ecologia e geologia (Avice, 1998).

Em última análise, a filogeografia é uma subdisciplina da biogeografia em que as unidades básicas de estudo são clados monofiléticos que são inferidos através de análises filogenéticas (Avice, 2009). Estes estudos geralmente exigem a utilização de um ou vários marcadores moleculares quando são examinadas filogenias de populações intraespecíficas (Arbogast & Kenagy, 2001).

Os marcadores moleculares mais comumente utilizados em estudos filogeográficos são genes de DNA mitocondrial (mtDNA) que possuem diversas propriedades desejadas de um marcador ideal para análises filogenéticas. Entre elas, destacando: (a) ser distinto, ainda que universalmente distribuído, de maneira que comparações homólogas seguras possam ser feitas ao longo de uma grande variedade de organismos; (b) ser facilmente isolado e examinado; (c) ter uma estrutura genética simples, deficiente de características complicadas como DNA repetitivo, elementos transponíveis, pseudogenes e íntrons; (d) exibir um modo direto de transmissão genética, sem recombinação ou outros rearranjos genéticos (Avice, 1987) e por essas razões tem sido amplamente utilizados neste tipo de estudo. Entretanto, há algumas considerações sobre o mtDNA que causam preocupação sobre sua exclusiva utilização em estudos filogeográficos, relacionadas, por exemplo, as suas altas taxas de mutação, que podem causar substituições decorrentes de bases em uma única posição (a chamada homoplasia ou saturação), o que pode obscurecer relações evolutivas mais profundas (Hare, 2001). Deste modo, embora os marcadores mitocondriais tenham sido a principal fonte de dados para estudos filogeográficos em ornitologia, a utilização de marcadores nucleares faz-se necessária como uma fundamental complementação aos dados mitocondriais (Zink & Barrowclough, 2008; Edwards et al., 2005), pois resultados superiores são esperados à medida que mais loci não ligados são adicionados às análises (Madison, 1997). Uma maior quantidade de genes também pode aumentar a possibilidade de se detectar anomalias relacionadas aos loci, como por exemplo, de eles serem cópias de genes parálogos que podem corromper as estimativas de tempo e filogenias (Fernandes et al., 2013; Liu et al., 2008). Além disso, análises feitas utilizando-se um único loci estão sujeitas a erros estocásticos, oferecendo pouca variação na inferência de processos históricos (Amaral et al., 2016).

As aves estão entre os vertebrados mais abundantes e diversos da região neotropical, sendo aproximadamente 2000 espécies conhecidas apenas no Brasil (CBRO, 2015). Embora vários aspectos delas sejam bem conhecidos, há por vezes um grande abismo no entendimento acerca das relações evolutivas das espécies. Antes do advento da genética na filogenia das linhagens, eram utilizados marcadores morfológicos, que como demonstrado por Irestedt *et. al.*

(2004) por vezes falham em demonstrar o verdadeiro grau de parentesco entre espécies. O próprio conceito de espécie é bastante controverso e se tratando de ornitologia, há uma enorme necessidade de uma unificação de critérios taxonômicos (Aleixo, 2007). Por conta desta problemática, se torna necessário a análise mais criteriosa de grupos que possuem uma filogenia e classificação não muito bem elucidada, principalmente se tratando de relações interespecíficas. Estudos filogeográficos de aves brasileiras têm contribuído enormemente para esclarecer como se deu a evolução das linhagens e é um campo que vem ganhando bastante destaque nas pesquisas em biologia evolutiva (Cutter, 2013, Hickerson et al., 2010).

Tolmomyias flaviventris, também conhecido como bico-chato amarelo, é uma espécie de ave neotropical que passou por diversas modificações taxonômicas ao longo do tempo. Descrito primeiramente em 1831 pelo príncipe Alexander Maximilian zu Wied como *Muscipeta flaviventris*, atualmente encontra-se na família Rhynchocyclidae, descrita por Berlepsch (1907) e estabelecida através de amplos estudos taxonômicos e filogenéticos, destacando os de Tello & Bates (2007) e Tello et al. (2009), abrangendo cerca de 66 espécies atualmente (CBRO, 2015). Antes destes estudos, *T. flaviventris* encontrava-se alocado na família Tyrannidae, em um grupo que incluía 12 gêneros de aves conhecidos como “bico-chato”, descrita por Lanyon (1988), que baseou a monofilia do grupo na semelhança entre a morfologia do crânio, morfologia da siringe e padrões de nidificação, suportada por estudos morfológicos e moleculares mais recentes, embora nenhum deles tenha incluído todos os táxons da família simultaneamente, e portanto a monofilia do grupo continuava incerta (Tello & Bates, 2007; Tello et al., 2009). Um extenso estudo filogenético utilizando marcadores mitocondriais realizado por Tello (2009), incluindo 93% de todos os gêneros de tiranídeos descritos, foi usado para examinar a monofilia e relacionamentos de grupos tradicionais e não-tradicionais dentro dos tiranídeos. O estudo concluiu que os tiranídeos estavam divididos em seis grandes linhagens, representando táxons a nível de família, entre elas a família Rhynchocyclidae, que inclui três subfamílias: Pipromorphinae, Todirostrinae e Rhynchocyclinae, sendo o gênero *Tolmomyias* incluído na última (Ohlson et al., 2013; Tello et al., 2009). O gênero é composto por um grupo de seis espécies de aves de cabeça relativamente grande e bico chato, além da citada neste estudo: *Tolmomyias assimilis*, (Pelzeln, 1868), *Tolmomyias sulphurescens* (Spix, 1825), *Tolmomyias poliocephalus* (Taczanowski, 1884) e *Tolmomyias traylori* (Schulenberg & Parker, 1997) (Caballero, 2016).

A espécie é descrita, de um modo geral, como sendo de pequeno porte (em média 12cm e 11,3 gramas), chama atenção pela intensidade de amarelo do lado inferior (Sick, 1997). É um

papa-moscas comum, silvícola, de tamanho médio. Habita uma grande variedade de tipos de florestas, de úmidas a secas, florestas de galeria, clareiras, restinga e caatinga. Na Amazônia habita principalmente florestas de várzea e com menor frequência, floresta de terra firme. Habita também áreas de mangue em Trinidad e nas Guianas e jardins e plantações de café no Suriname. A cabeça, asa, dorso e cauda são de cor verde oliva; a garganta, peito e ventre são amarelos. O olho é grande, escuro e circundado por um anel periocular amarelo dourado. O bico é achatado e preto e não há dimorfismo sexual (Caballero, 2006). *T. flaviventris* tem sua distribuição em grande parte do norte e centro da América do Sul, do norte da Colômbia e Venezuela, assim como em Trinidad e Tobago, e mais ao sul nas florestas da costa do leste do Brasil (Figura 1) (Caballero, 2006). Atualmente existem seis subespécies descritas, algumas com critérios taxonômicos pobres, baseados principalmente em caracteres morfológicos como plumagem e tamanho, assim como diferenças qualitativas no canto, havendo extrema necessidade de estudos mais abrangentes. As seis subespécies são:

T. f. flaviventris (Wied, 1831), o táxon nominal. Ocorre no Leste do Brasil do estado do Maranhão até o estado do Espírito Santo e estado do Mato Grosso, e também no Leste da Bolívia.

T. f. viridiceps (Sclater & Salvin, 1873), possui o dorso oliváceo mais escurecido, a coloração amarela ou ocre na face presente em *T. f. flaviventris* está reduzida ou ausente. Possui também ventre mais oliváceo na garganta e peito, o bico é mais escuro, com base da mandíbula de coloração rosada. Ocorre no Sudeste da Colômbia, no Leste do Equador, no Leste do Peru e no Oeste da região amazônica do Brasil.

T. f. subsimilis (Carriker, 1935), considerada uma forma entre *T. f. flaviventris* e *T. f. borbae*, (um táxon descrito como intermediário entre *T. f. viridiceps* e *T. f. flaviventris*, porém em desuso), separada da mesma por possuir o ventre oliváceo mais amarelado, especialmente na garganta e abdômen e mais parecido com *T. f. flaviventris*, mas não possui coloração mais avermelhada na garganta e peito. O bico e mandíbula possuem cores diferenciadas. Ocorre no Sudeste do Peru, no Sudoeste do Brasil e no Nordeste da Bolívia.

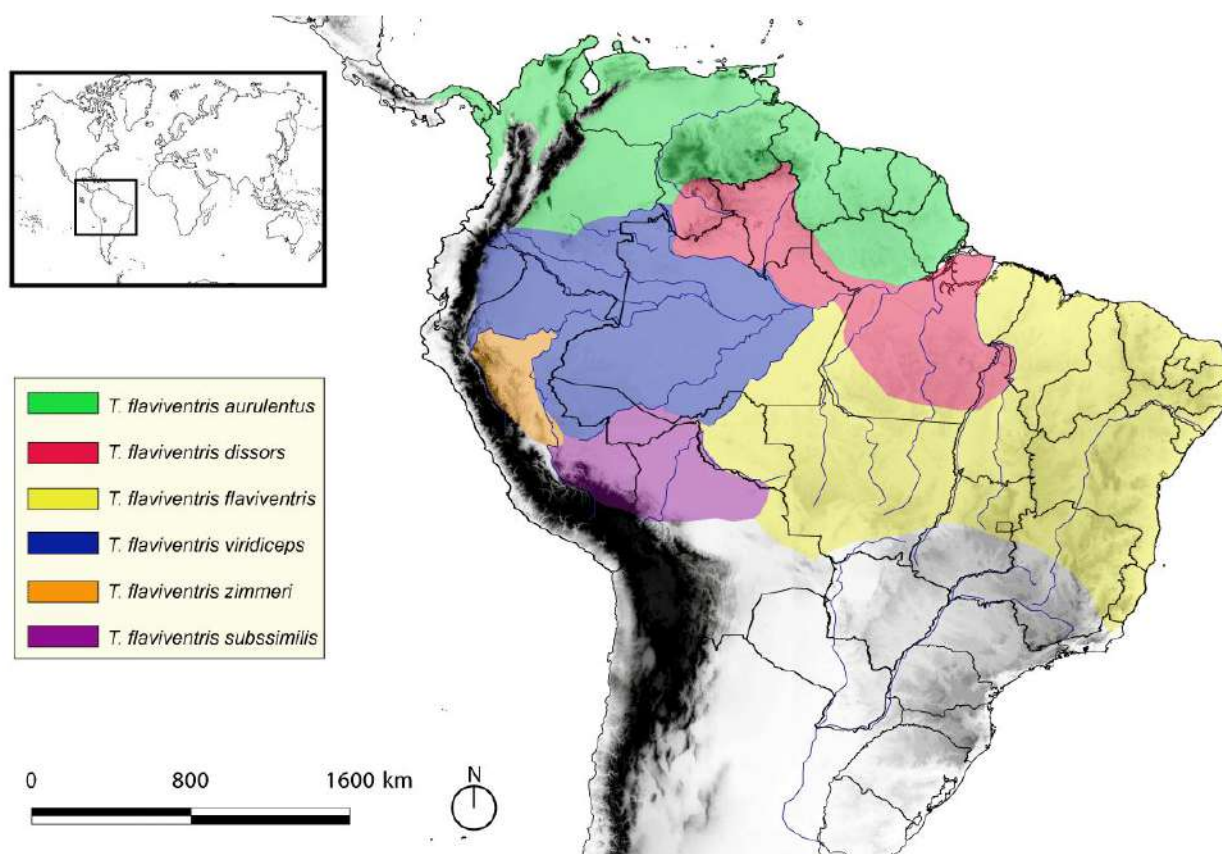
T. f. dissors (Zimmer, 1939) difere de *T. f. flaviventris* por possuir dorso um pouco mais escuro, barriga de cor amarela mais clara, garganta e peito de cor mais castanho ou amarronzado. Difere de *T. f. collingwoodi* (subespécie primeiramente descrita para os indivíduos de Trinidad e Tobago, mas que posteriormente foi incluída em *T. f. aurulentus*) por possuir dorso esverdeado mais escuro e ventre amarelo mais claro. Ocorre no Sudoeste da Venezuela e no Brasil, da região do Rio Jamundá no estado do Pará até a Ilha de Marajó.

T. f. zimmeri (Bond, 1947) assemelha-se a *T. f. subsimilis*, porém com o ventre mais esverdeado, menos amarelo-dourado, o que é mais evidente na garganta. Assemelha-se a *T. f. viridiceps*, porém sutilmente mais claro, amarelo-esverdeado no dorso e mais amarelo no ventre. Ocorre na região Norte e Central do Peru;

T. f. aurulentus (Todd, 1913), descrita como similar a *Rhynchocyclus flaviventris flaviventris* (táxon que hoje é denominado *T. f. flaviventris*), mas em geral com a coloração mais viva, mais amarelada. Ocorre no Leste do Panamá, no Norte e Leste da Colômbia, no Norte e Centro da Venezuela, nas Ilhas de Trinidad e Tobago no Caribe, nas Guianas e no Norte do Brasil, da região do Rio Branco ao Amapá.

As subespécies do oeste amazônico (*T. f. viridiceps*, *T. f. zimmeri* e *T. f. subssimilis*) são consideradas por muitos autores como sendo uma espécie biológica distinta por conta de diferenças significativas nas propriedades do canto do grupo, sendo portanto descrito como a espécie *Tolmomyias viridiceps*. Embora esteja descrito em diversos guias de aves recentes (Caballero, 2016; Bates, 1992; Hilty 2003; Zimmer, 1939), *T. viridiceps* ainda não é reconhecido por órgãos como o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) e a South American Classification Committee (SACC), embora a última reconheça que *T. flaviventris* envolve pelo menos duas espécies distintas, sendo a subespécie *T. f. viridiceps* quase certamente uma espécie plena (Renssen et al., 2017), não havendo ainda um estudo detalhado que confirme a validade de *T. viridiceps*.

Figura 1 – Mapa de distribuição de *T. flaviventris* e suas subespécies (conforme Caballero, 2016).



Embora a espécie seja relativamente comum em toda sua área de ocorrência e com uma ampla distribuição geográfica, até o momento não houve nenhum estudo que enfoque especificamente na espécie politípica *T. flaviventris* com a utilização de marcadores moleculares e análises filogeográficas. Pela importância de se conhecer adequadamente a biodiversidade brasileira, compreender os aspectos históricos, biogeográficos, genéticos e evolutivos da espécie é uma peça fundamental para preencher cada vez mais as lacunas do conhecimento que existem acerca da vida no neotrópico. Portanto, o presente estudo tem por objetivo analisar as relações filogenéticas dentro do complexo *T. flaviventris* utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, assim como comparar dados vocais e morfológicos com o objetivo de revisar a taxonomia e os limites intraespecíficos do grupo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAGEM

42 amostras de tecidos de *Tolmomyias flaviventris* foram utilizadas no presente estudo, sendo 36 oriundas da coleção ornitológica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e 6 da coleção ornitológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP). Adicionalmente, uma sequência do gene ND2 foi obtidas do banco de dados genéticos do National Center for Biotechnological Information (Genbank - NCBI). As subespécies foram então inferidas pela sua localização geográfica e a amostragem abrangeu 4 das 6 subespécies de *T. flaviventris* atualmente descritas (*T. f. zimmeri* e *T. f. subssimilis* não puderam ser incluídas na amostragem).

Para compor o grupo externo, foram obtidas sequências do Genbank de *Tolmomyias poliocephalus* e *Tolmomyias assimilis*, consideradas as espécies do gênero mais próximas de *T. flaviventris* (Rheidt et al., 2007) e de *Rhynchocyclus olivaceus*, também proximoamente relacionado (Rheidt et al., 2007; Tello & Bates, 2007; Tello et al., 2009 Ohlson et al., 2007). Detalhes das amostras, assim como sua localização geográfica podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sumário das amostras de tecido e sequências utilizadas neste estudo.

Espécie	Subespécie	Tombo	Nº de Campo	Localidade
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	58342	MPDS 567	RR, Mun. Mucajaí, Sítio S. Lucas, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	58070	MARJ 136	PA, Mun. de Chaves, Ilha do Marajó, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	61031	PEMA 034	PA, Parque Estadual Monte Alegre, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>aurulentus</i>	61033	PEMA 068	PA, Parque Estadual Monte Alegre, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	63025	JAP 613	AM, Japurá, Rio Acanauí, Brasil

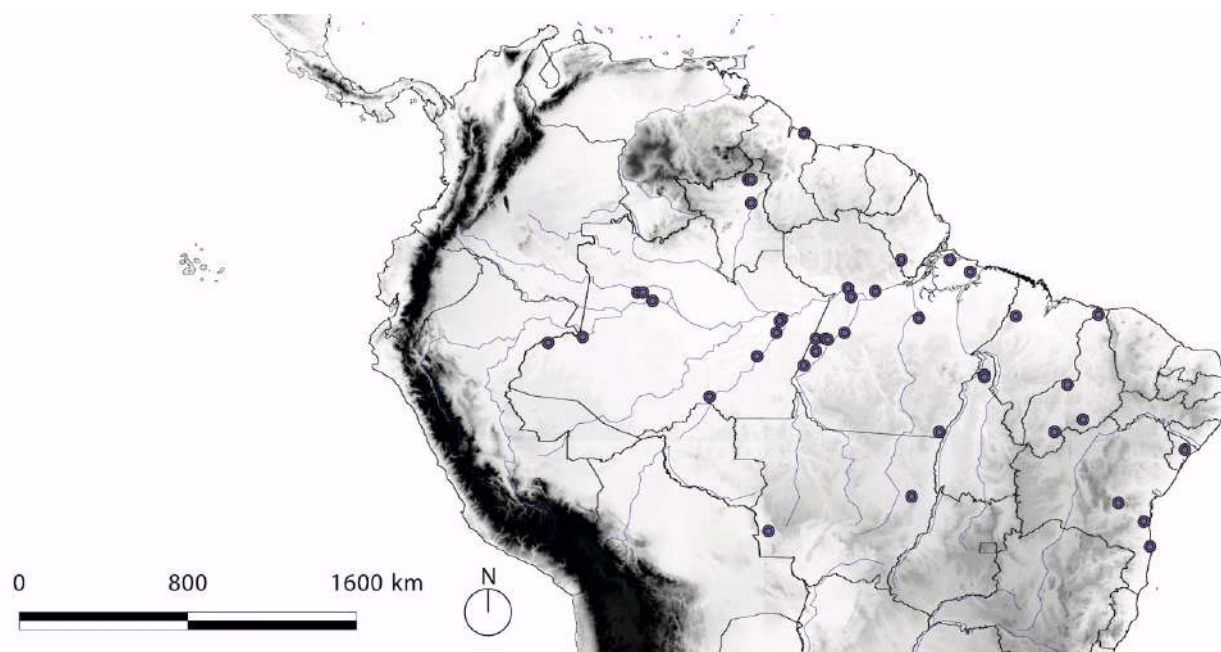
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	-	65140	AMANA 051	PA, Itaituba,Pista de Pouso Maranhão, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	-	65141	AMANA 064	PA, Itaituba,Pista de Pouso São Pedro, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	-	65637	AMANA 084	PA, Itaituba,Igarapé Montanha, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	-	65636	AMANA 174	PA, Jacareacanga, Ponte sobre o Rio Igarapé Preto, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	61595	MT 045	MT, Querência, Fazenda Tanguero, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	63026	JAP 491	AM, Japurá, Rio Acanauí, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	62223	JAP 613	PA, Juruti, Base Capiroanga, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	70369	FZS 001	PI, Buriti dos Lopes, Fazenda Serragem, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	73815	MAD 588	AM, Autazes, Uricurituba, Ilha, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	73816	MAD 589	AM, Autazes, Uricurituba, Ilha, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	COUFT 0454	016 SAP	TO, Fazenda Sapucaia, Trilha Marco da Divisa, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	COUFT 0332	R 025	TO, Fazenda Sapucaia, Trilha Marco da Divisa, Brasil
<i>Tolmomyias</i>	-	-	JAT (B) 245	PA, Jatobá, Margem Esquerda

<i>flaviventris</i>				do Rio Tapajós, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	70762	UNA 136	BA, Ilhéus, Ecoparque de Una, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	-	70883	MIRI 050	PA, Itaituba, Miritituba, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	72732	AMA 174	AM, Tabatinga, Margem Norte do Rio Solimões, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	72942	AMA 445	AM, Estirão do Equador, Atalaia do Norte, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	71761	ORX 361	PA, Oriximiná, Lago Sapucaia, Comunidade Casinha, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	71432	GLD 008	PI, Guadalupe, Fazenda São Pedro, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	73337	MAD 101	AM, Humaitá, Margem Oeste do Rio Madeira, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	74335	SRR 031	RO, Amajari, Fazenda Viçosa, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	74336	SRR 032	RO, Amajari, Fazenda Viçosa, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	75493	CAPI 015	PI, São Raimundo Nonato, P.E. Serra da Capivara, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	77053	GUR 318	MA, Centro Novo, REBIO Gurupi, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	76733	CAPI 070	PI, São Raimundo Nonato, P.E. Serra Vermelha, Brasil

<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	78887	ETA 153	AM, Fonte Boa, Margem Esquerda do Solimões, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>viridiceps</i>	79056	ETA 364	AM, Borba, Rio Madeira, Ilha do Mandi, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	79923	AMG 071	BA, Iberaba, Serra do Orobo, Fazenda Floresta, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	80271	CDA 059	PA, Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>aurulentus</i>	88223	MBR 3932	Onverwagt, West Berbice, Guiana
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>aurulentus</i>	MZUSP 81952	-	PA, Vila Marinho, Laranjal do Jari, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	MZUSP 84528	-	SE, Rio São Francisco, Margem Direita, Capela, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	MZUSP 89018	-	MT, Vila Velha da Santíssima Trindade, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	MZUSP 90134	-	PA, Santana do Araguaia, Fazenda Fortuna, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>flaviventris</i>	MZUSP 91460	-	BA, Mata do Pacangê, Reserva Michelin, Brasil
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	<i>dissors</i>	MZUSP 93448	-	PA, Rio Xingu, Vitória do Xingu, Brasil
<i>Tolmomyias poliocephalus</i>	-	FMNH 391187		El Beni, Hacienda Los Angeles, Bolivia
<i>Tolmomyias</i>	-	FMNH		RO, Cachoeira Nazaré, Rio

<i>assimilis</i>		389997		Jiparana, Brasil
<i>Rhynchocyclus</i>	-	FMNH	-	PA, Serra dos Carajás, Brasil
<i>olivaceus</i>		391502		
<i>Rhynchocyclus</i>	-	FMNH	-	AL, Ibateuoara, Engenho
<i>olivaceus</i>		427086		Coimbra, Brasil
<i>Rhynchocyclus</i>	-	ZMUC	-	Costa Rica
<i>brevirostris</i>		127248		

Figura 2 - Mapa de distribuição das amostras utilizadas no trabalho.



2.2. ANÁLISE MOLECULAR

Todas as etapas laboratoriais do presente estudo foram realizadas nas dependências do Laboratório Multidisciplinar de Biologia Molecular do Museu Paraense Emílio Goeldi (LMBM-MPEG). O DNA total das amostras foi extraído utilizando protocolo padrão de extração com fenol-clorofórmio (Sambrook, 1989), sendo amostras mais degradadas extraídas utilizando Kit DNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA). Os produtos das extrações foram então verificados em gel de agarose a 1% para verificar a integridade das amostras, que em seguida tiveram suas concentrações quantificadas utilizando NanoDrop2000 (ThermoScientific), tendo como medida de concentração ng/ μ l. As amostras que possuíam quantidades satisfatórias de concentração e pureza foram amplificadas por meio do método da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes volumes de reagentes em todas as reações para cada amostra: 10,5 μ l de água, 12,5 μ l de Master Mix (Promega), 1 μ l para cada par de primer e 1 μ l de DNA, totalizando 25 μ l de volume total da reação para cada amostra. Os genes amplificados por meio de PCR foram os genes mitocondriais Citocromo b (CYTB), NADH Dehidrogenase 2 (ND2), e os genes nucleares Gliceraldeído-3-fosfodehidrogenase (G3PDH) e o gene receptor de Tirosina Kinase (MUSK). Os protocolos de amplificação podem ser observados nas tabelas 2 a 5. O sumário de primers utilizados neste estudo pode ser observado na tabela 6.

Tabela 2 - Condições de amplificação para o marcador CYTB utilizando o par de primers L14841 (*forward*), (Kocher et al., 1989) e H16065 (*reverse*), (Lougheed, et al., 2000).

Fase da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	5	1
Desnaturação	94	1	
Anelamento	41.1	1	35
Extensão	74	1	
Extensão Final	72	10	1

Tabela 3 - Condições de amplificação para o marcador ND2 utilizando o par de primers L5215 (*forward*) e H6313 (*reverse*), (Hackett, 1996).

Fase da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	5	1
Desnaturação	94	1	
Anelamento	51.1	1	35
Extensão	74	1	
Extensão Final	72	10	1

Tabela 4 - Condições de amplificação para o marcador MUSK utilizando os primers 13F (*forward*) e 13R (*reverse*), (Clark & Witt, 2006).

Fase da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	5	1
Desnaturação	94	1	
Anelamento	45.0	1	35
Extensão	74	1	
Extensão Final	72	10	1

Tabela 5 - Condições de amplificação para o marcador G3PDH utilizando os primers G3PL890 (*forward*) e G3PH950 (*reverse*), (Friesen et al., 1997).

Fase da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	94	5	1
Desnaturação	94	1	
Anelamento	56.1	1	35
Extensão	74	1	
Extensão Final	72	10	1

Tabela 6 - Sumário de primers utilizados neste estudo.

Gene	Primer	Sequência 5' - 3'
CYTB	L14841	GCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATG
	H16065	GGAGTCTTCAGTCTCTGGTTTACAAGAC
ND2	L5215	TATCGGGCCCATACCCCGAAAAT
	H6313	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC
MUSK	13F	CTTCCTGCACTACAATGGGAAA
	13R	CTCTGAACATTGTGATC TCAA
G3PDH	G3PL890	ACCTTTAATGCGGGTGCTGGCATTGC
	G3PH950	CATCAAGTCCACAACACGGTTGCTGTA

Os produtos de PCR obtidos para cada amostra foram então purificados utilizando Polietilenoglicol-8000 (PEG-8000) a fim de remover eventuais resíduos da amplificação tais como DNTPs, oligos e sais. As amostras purificadas foram então sequenciadas utilizando sequenciador automático modelo 3130 da AppliedBiosystems.

Após obtidas, as sequências cruas foram alinhadas e reconciliadas em ambas as direções utilizando o software Sequencher 4.1.4 (Genecodes, Madison, Wisconsin) corrigindo-se eventuais erros de leitura. Em seguida todas as sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta *ClustalW* do software Bioedit 7.2.5 (Hall, T. A., 1999).

As filogenias foram estimadas baseando-se no método de Inferência Bayesiana (IB), utilizando o software MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O software PartitionFinder 1.1.1 foi utilizado na determinação do modelo evolutivo e partição que melhor se adequa a evolução dos genes. Foram realizadas 50.000.000 gerações para análise de IB com amostragem de uma árvore a cada 100 gerações. Para determinar o ponto em que é alcançada a zona ótima, foi utilizado o programa TRACER 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009), sendo todas as árvores encontradas abaixo da zona ótima descartadas através do estabelecimento do valor de *burnin*. As redes de haplótipos foram construídas utilizando o programa HaploView (Salzburger et al., 2011),

utilizando como *input* os alinhamentos e árvores filogenéticas geradas para os genes Cytb, ND2, MUSK e G3PDH, obtidas através dos métodos de Inferência Bayesiana (IB).

Estudos recentes têm mostrado que dados concatenados de análises *multilocus* podem eventualmente resultar em topologias bem suportadas, mas que não refletem a realidade da verdadeira árvore de espécies, principalmente se tratando de cenários de diversificação recentes (Degnan & Rosenberg, 2009; Kubatko & Denegan, 2007). Por este motivo, como alternativa para a árvore filogenética utilizando o método de Inferência Bayesiana, foi também realizada uma análise de árvore de espécies (AE) para os clados de maior relevância encontrados na árvore de IB. Para esta análise foi utilizado o *software* Beast 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007), que consiste em estimar a melhor topologia a partir de uma abordagem coalescente, utilizando dados *multilocus*. A análise foi feita com dados dos quatro marcadores (CYTB, ND2, MUSK e G3PDH), semelhante aos dados utilizados na árvore de IB, porém para o grupo externo foram utilizadas apenas sequências de *Rhynchocyclus olivaceus* (CYTB, ND2 e MUSK) e *Rhynchocyclus brevirostris* (G3PDH), concatenados. A partir de uma amostragem de 50 milhões de gerações, sendo o valor de *burnin* estabelecido em 5,000, a estimativa de tempos de diversificação das linhagens foi feita utilizando como base a taxa de evolução molecular do gene CYTB, de 2,1% de substituições nucleotídicas para cada milhão de anos (Weir & Schluter, 2008). O relógio molecular utilizado foi o relaxado logonormal não-correlacionado, o qual assume taxas independentes de evolução entre os diferentes ramos da filogenia (Drummond et al., 2007) e então realizada uma corrida de 50 milhões de gerações.

A distância genética não-coriada (distância *p*) foi calculada dentro e entre as populações mais relevantes encontradas nas análises filogenéticas, utilizando o *software* MEGA 7 (Kumar et al., 2004) com base no banco de dados dos genes mitocondriais CYTB e ND2, possuindo 2,030 pares de base.

2.3. ANÁLISES VOCAIS E MORFOLÓGICAS

Para as análises morfológicas, foram feitas comparações diretas entre peles taxidermizadas de indivíduos de diferentes subespécies de *Tolmomyias flaviventris* de modo a destacar-se as diagnoses entre o grupo *T. f. flaviventris* e *T. f. viridiceps*. As peles são oriundas da coleção

ornitológica do Museu Paraense Emílio Goeldi. Os caracteres comparados foram I) Bico II) Garganta III) Peito e IV).

As análises vocais foram feitas utilizando gravações de *Tolmomyias flaviventris* de diferentes localidades baixadas do *website* Xeno-canto America (<http://www.xeno-canto.org/>), em formato *wave*. As gravações foram então importadas para o *software* Raven Pro 1.5 (Krein et al., 2008) para obtenção de sonogramas e posteriormente foram separadas em *calls* e *songs* através de análises auditivas e comparativas dos sonogramas. As gravações de maior qualidade foram selecionadas e então filtradas para melhor visualização das propriedades sonoras e aspecto geral das notas. Foram então escolhidos um sonograma de *call* representativo do grupo “*flaviventris*” e outro para do grupo “*viridiceps*”.

3. RESULTADOS

3.1. MOLECULARES

Após o processamento e edição das sequências, foram obtidos um total de 3,014 pares de bases, sendo 994 para CYTB, 1,036 para ND2, 440 para G3PDH e 544 para MUSK.

A árvore filogenética dos genes concatenados baseada no método de Inferência Bayesiana (IB) mostrou a existência de cinco grupos monofiléticos distintos dentro de *Tolmomyias flaviventris*, possuindo apoio acima de 95% para IB nos nós que os separam (figura 3). Esta topologia foi corroborada pela filogenia gerada através da análise de Árvore de Espécies (AE), também com apoios acima de 95% para os cinco filogrupos apresentados, embora a resolução interna de alguns clados não seja bem apoiada. A distribuição geográfica das amostras relacionando-as ao seu respectivo filogrupo (Figura 4) não parece corroborar com a distribuição geográfica das diferentes subespécies (ver Figura 1), sugerindo que a taxonomia tradicional da espécie esteja equivocada.

Figura 3 - Árvore filogenética *multilocus* construída com base no banco de dados dos genes CYTB, ND2, MUSK e G3PDH, concatenados, com 50 milhões de gerações. Os nós representam os apoios encontrados para a árvore obtida através do método de Inferência Bayesiana (IB) e Árvore de Espécies (AE), respectivamente.

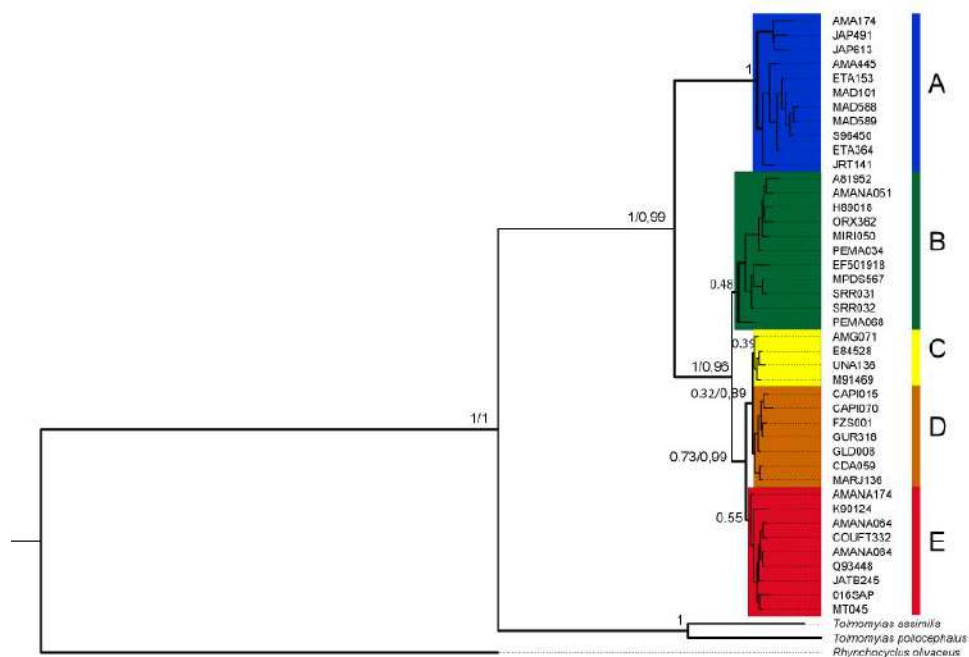
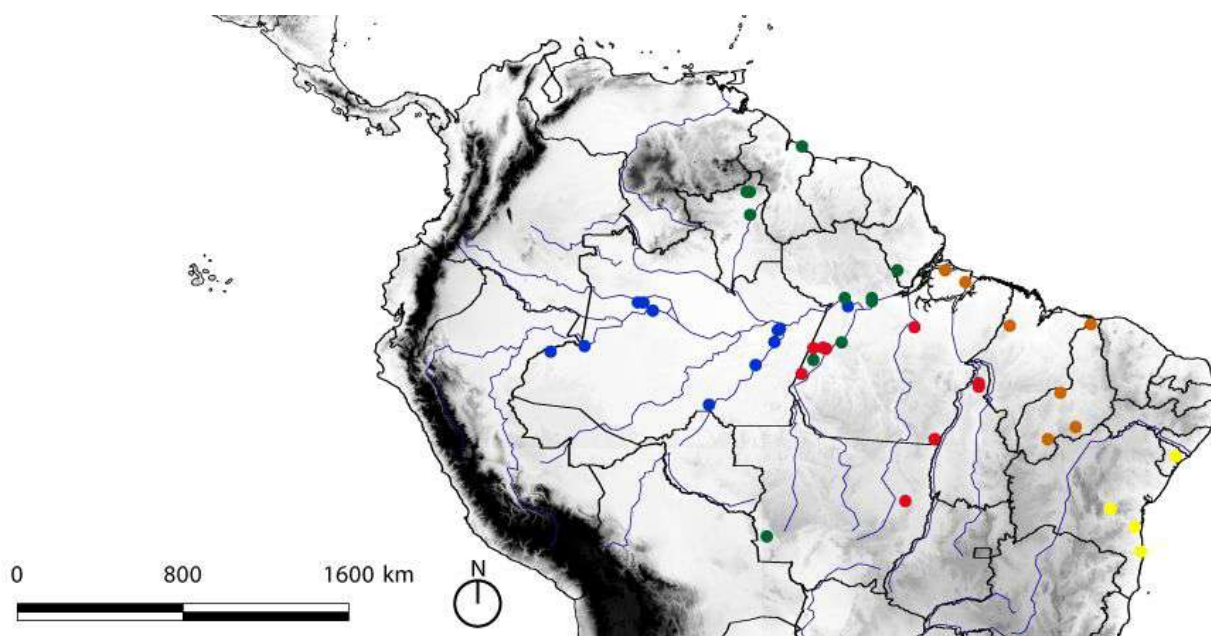


Figura 4 - Distribuição geográfica e localização das amostras, destacando os filogrupos aos quais pertencem. (Filogrupo A - Azul; Filogrupo B - Verde; Filogrupo C - Amarelo; Filogrupo D - Laranja; Filogrupo E - Vermelho).



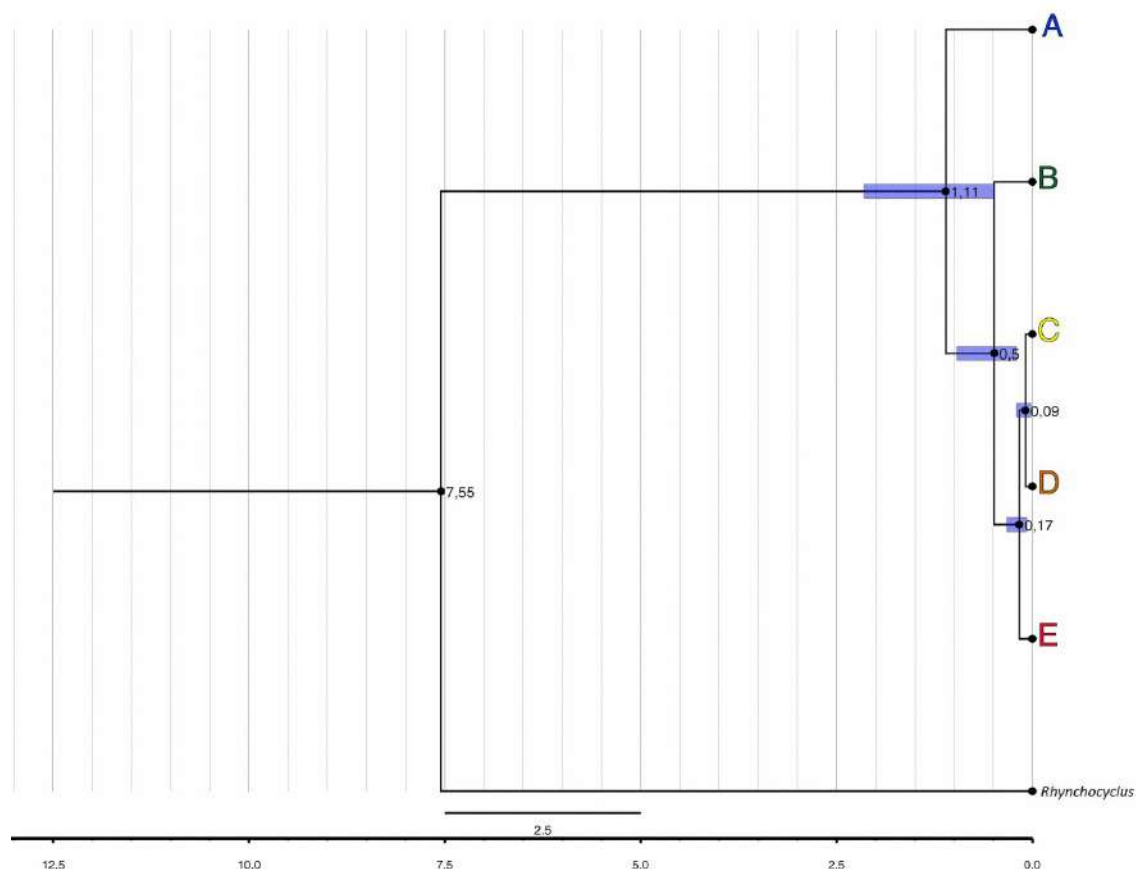
As estimativas de tempo de diversificação geradas na Árvore de Espécies sugerem que os filogrupos separaram-se cerca de 7,55 milhões de anos do grupo externo (Figura 5), porém esta estimativa pode estar enviesada por conta da distância entre os clados analisados e o grupo externo (*Rhynchoyclus*), estando em um intervalo de confiança entre 1,96 a 19,48 milhões de anos.

O filogrupo A foi o primeiro a divergir, há cerca de 1,11 milhões de anos (intervalo de 0,49 a 2,15 m.a.), mantendo maior distância do restante dos outros grupos, o que também pode ser corroborado nas análises de rede de haplótipos e distância genética (Figura 6 e Tabela 7, respectivamente). O táxon se distribui pelo oeste Amazônico, havendo ocorrência de indivíduos a partir da região de Santarém, estendendo-se pela região oeste da Amazônia, limitando-se ao norte pelo Rio Negro. Esta configuração é congruente com a hipótese levantada por alguns autores de que *T. flaviventris* deveria ser na verdade dividida em duas espécies: *Tolmomyias flaviventris* e *Tolmomyias viridiceps*, sendo a última representada pelas subespécies que habitam o oeste amazônico (*T. f. viridiceps*, *T. f. zimmeri* e *T. f. subsimilis*). Esta divisão foi baseada principalmente em diferenças morfológicas com relação a plumagem e diferenças vocais (Bates et al, 1992; Stotz, 1996; Ridgely & Tudor, 2009; Hilty, 2002; Ridgely & Greenfield, 2001), sendo agora corroborada pelos dados moleculares aqui apresentados neste estudo.

O Filogrupo B foi o segundo a divergir-se, há cerca de 0,5 milhão de anos (intervalo de 0,2 a 0,96 m.a.) sendo grupo-irmão do clado formado por C, D e E. Distribui-se pelo escudo das Guianas, atravessando o Amazonas até a região central do Brasil, no Sul do Mato Grosso. Por conta desta distribuição geográfica incomum, este clado merece ser melhor investigado, embora seja possível sugerir que este grupo diversificou-se no escudo das Guianas e secundariamente colonizou regiões mais ao sul, atravessando o Rio Amazonas.

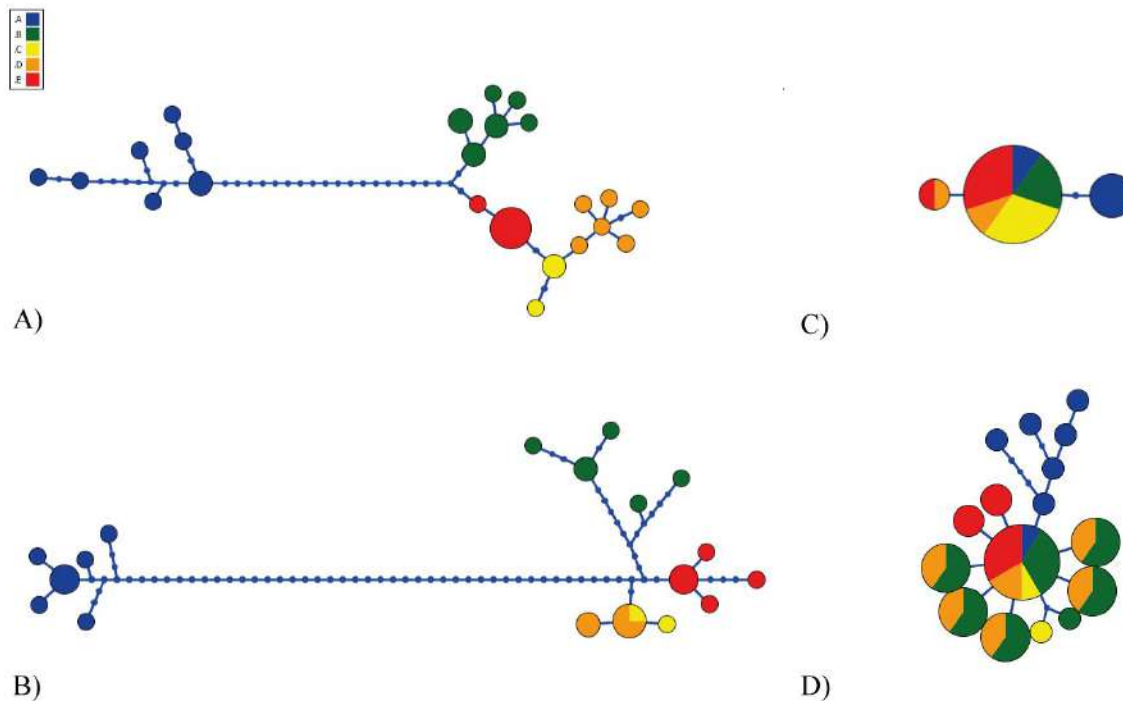
O próximo a divergir-se foi o Filogrupo E, há cerca de 0,17 milhão de anos (intervalo de 0,07 a 0,33 m.a.). Este clado aparentemente possui distribuição delimitada a leste pelo Rio Tocantins, a oeste pelo Rio Madeira e ao norte pelo Rio Amazonas. Posteriormente houve o último evento de diversificação, entre os Filogrupos D e C, há cerca de 0,09 milhão de anos atrás. O Filogrupo C distribui-se na porção leste do Brasil abaixo do Rio São Francisco, enquanto que o Filogrupo D parece estar presente a partir da Ilha do Marajó, no Pará, estendendo-se até os limites do Filogrupo C. Uma observação importante sobre a distribuição geográfica dos grupos encontrados é uma sobreposição que ocorre no interflúvio Madeira-Tapajós, onde podem ser encontrados indivíduos dos filogrupos A, B e E.

Figura 5 - Árvore filogenética *multilocus* baseada nos genes CYTB, ND2, MUSK e G3PDH inferida através do método de Árvore de Espécies (AE). Os nós representam os tempos de divergência de cada clado (em milhões de anos). As barras indicam o intervalo de confiança de 95% dos tempos de divergência entre os filogrupos.



Na análise de redes de haplótipos , para os genes CYTB e ND2 (Figura 6 - A e B) houve grande estruturação populacional em todos os filogrupos, com a pouca frequência de haplótipos compartilhados entre as populações. É possível evidenciar a divergência acentuada do Filogrupo A em relação aos demais grupos (19 mutações para CYTB e 41 para ND2), que representam a separação entre o grupo “*flaviventris*” e “*viridiceps*” mencionada anteriormente. Para os genes nucleares MUSK e G3PDH também houve estruturação populacional entre o Filogrupo A e os demais grupos, que em contrapartida não apresentaram o mesmo grau de estruturação dos genes mitocondriais, sendo caracterizados por um substancial compartilhamento de haplótipos entre os diferentes grupos de *flaviventris*.

Figura 6 - Redes de haplótipos geradas para os genes CYTB (a), ND2 (b), MUSK (c) e G3PDH (d). As cores representam os filogrupos encontrados na árvore filogenética.



Na análise de distância genética (Distância-*p*, Tabela 7), houve uma variação entre os filogrupos de 0,2 a 4,5%, apresentando um valor médio de 2,35%, valores estes superiores àqueles encontrados na distância genética dentro dos grupos, que variou entre 0 e 0,98%, demonstrando um padrão onde há maior divergência entre populações do que dentro das mesmas. Mais uma vez nota-se a separação entre o Filogrupos A, com 3,4 % de distância em relação a E, 3,1% em relação a B, 4,5% em relação a C e 4,3 em relação a D.

Tabela 7 - Divergência genética (distância-*p*, em %) entre e dentro das populações encontradas a partir de 2,030 pares de bases dos genes mitocondriais CYTB e ND2. *DP = distância dentro de cada população.

	1	2	3	4	5	6	7	8	DP*
1. E									0
2. B	0,4								0,09
3. A	3,4	3,1							0,98
4. C	0,9	1,3	4,5						0,36
5. D	0,7	1,1	4,3	0,2					0
6. <i>T. poliocephalus</i>	5,8	6,3	7,1	6,3	6,3				
7. <i>T. assimilis</i>	7,5	8	6,5	8,6	8,4	9,8			
8. <i>R. olivaceus</i>	15,9	15,4	14,4	16,7	17	16,8	15,6		

3.2. MORFOLÓGICOS E VOCAIS

Sobre os aspectos morfológicos, foram feitas comparações diretas e as diferenças mais marcantes foram observadas entre indivíduos de dois grupos - o grupo *viridiceps*, do oeste Amazônico (Figura 7, direita) e o grupo *flaviventris*, representado pelas subespécies de *T. flaviventris* restantes (*T. f. flaviventris*, *T. f. aurulentus*, e *T. f. dissors*; Figura 7, esquerda), que serão daqui por diante citados desta maneira. Dentro de *flaviventris* não foram encontradas diferenças significativas e congruentes com os filogrupos obtidos neste estudo, portanto, as análises morfológicas executadas servem apenas para distinguir “*T. viridiceps*” de *T. flaviventris*.

Na comparação entre os caracteres selecionados, primeiramente foi observada a diferença marcante no bico das duas espécies (I). Em *viridiceps*, a mandíbula é escura, com coloração mais clara, esbranquiçada na base (Figura 8), enquanto que em *flaviventris* é inteiramente clara, cor de pele. No caractere II, é possível evidenciar a diferença acentuada na coloração da garganta entre

os dois grupos. Em *viridiceps*, a plumagem desta região é mais esverdeada, olivácea, com tons amarelos mais apagados, enquanto que em *flaviventris* é observada uma coloração amarela bem viva. Os outros dois caracteres, peito (III) e barriga (IV) seguem a mesma tendência da garganta, sendo a plumagem particularmente mais olivácea em *viridiceps*, enquanto que em *flaviventris* toda a porção ventral é de coloração amarelada bastante acentuada, que dá nome à espécie.

Figura 7 - visão lateral dos indivíduos selecionados para análise morfológica (direita - grupo “*viridiceps*” e esquerda - grupo “*flaviventris*”). Os números indicados pelas setas representam os caracteres comparados. I - Bico; II - Garganta; III - Peito e IV - Barriga.

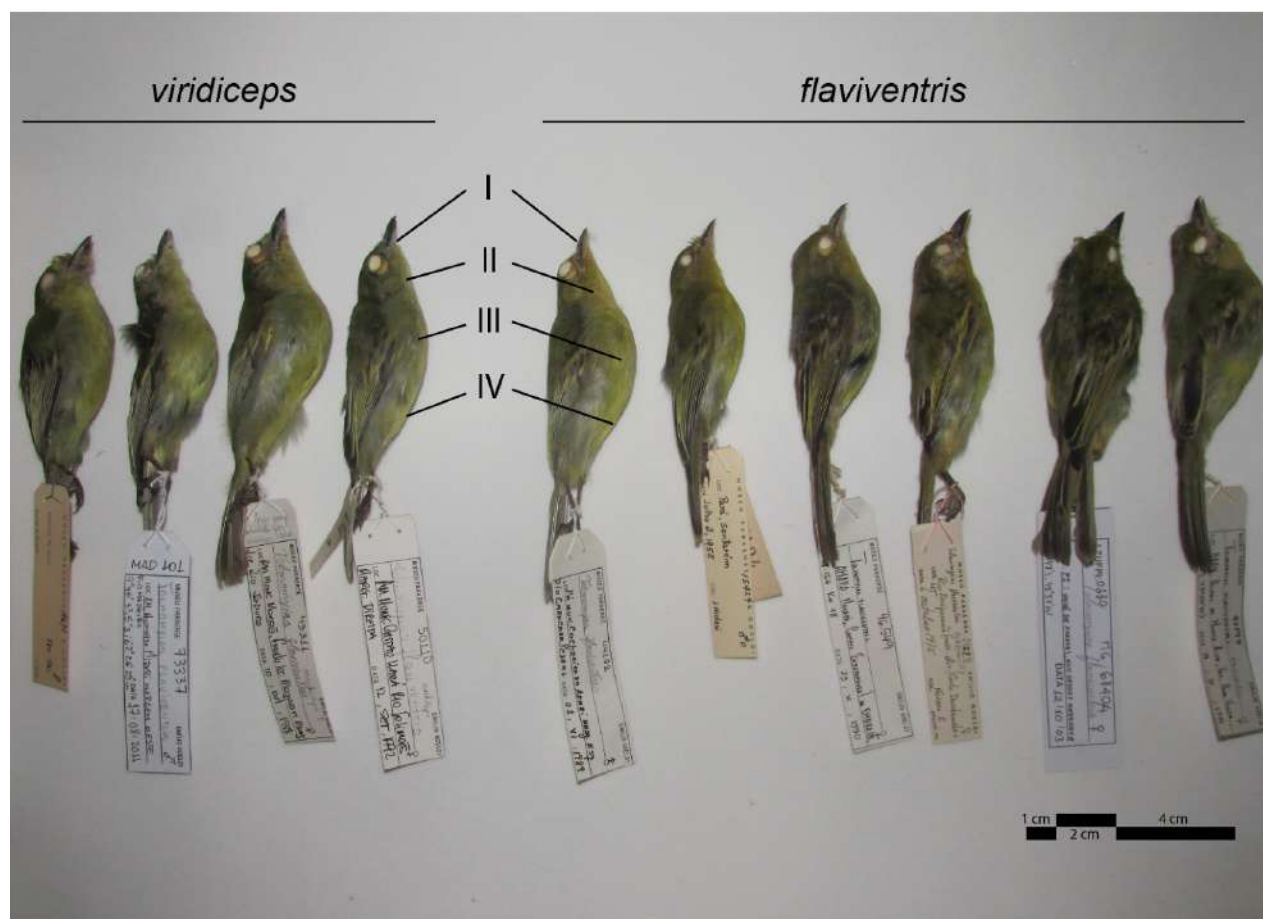
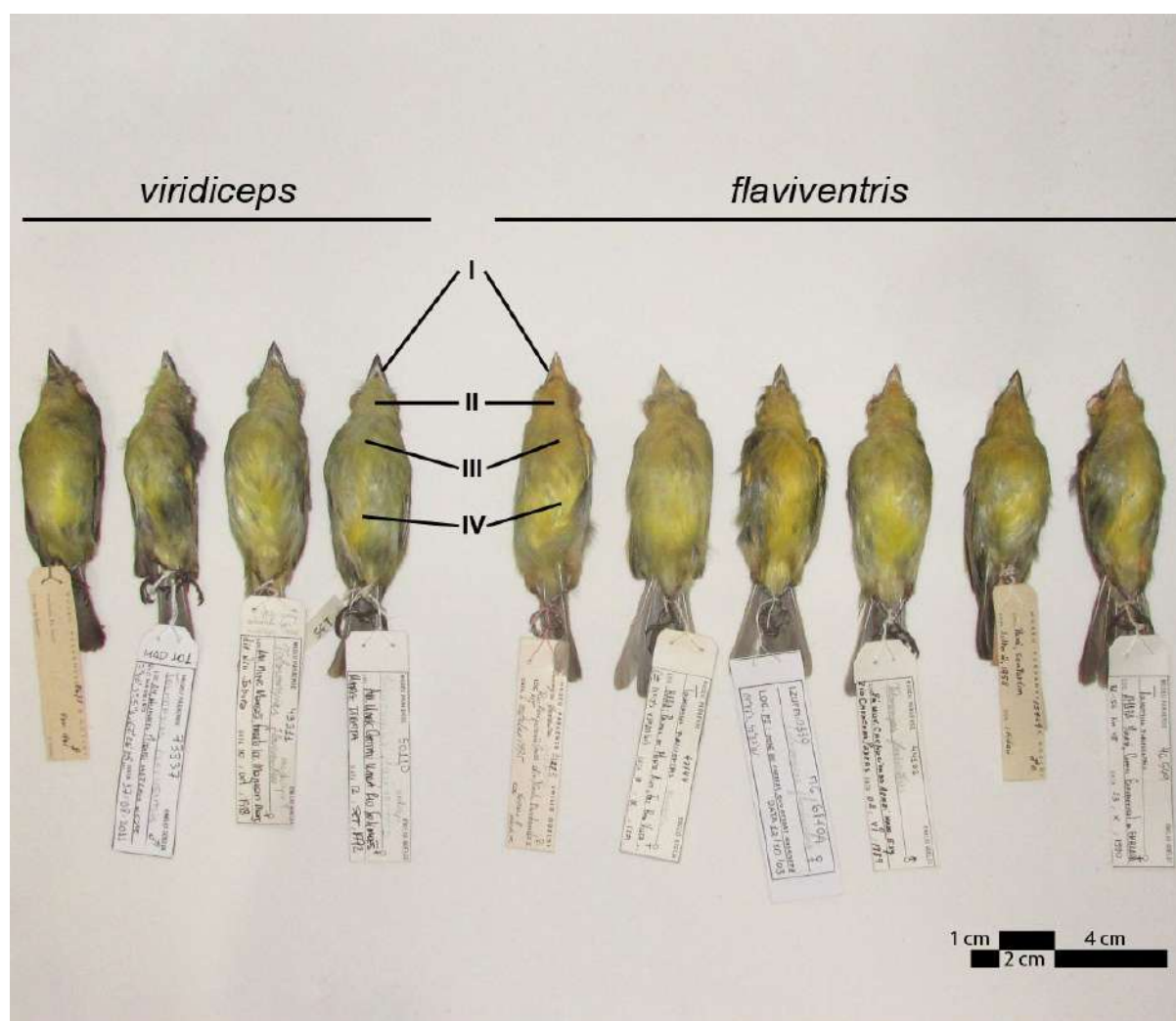


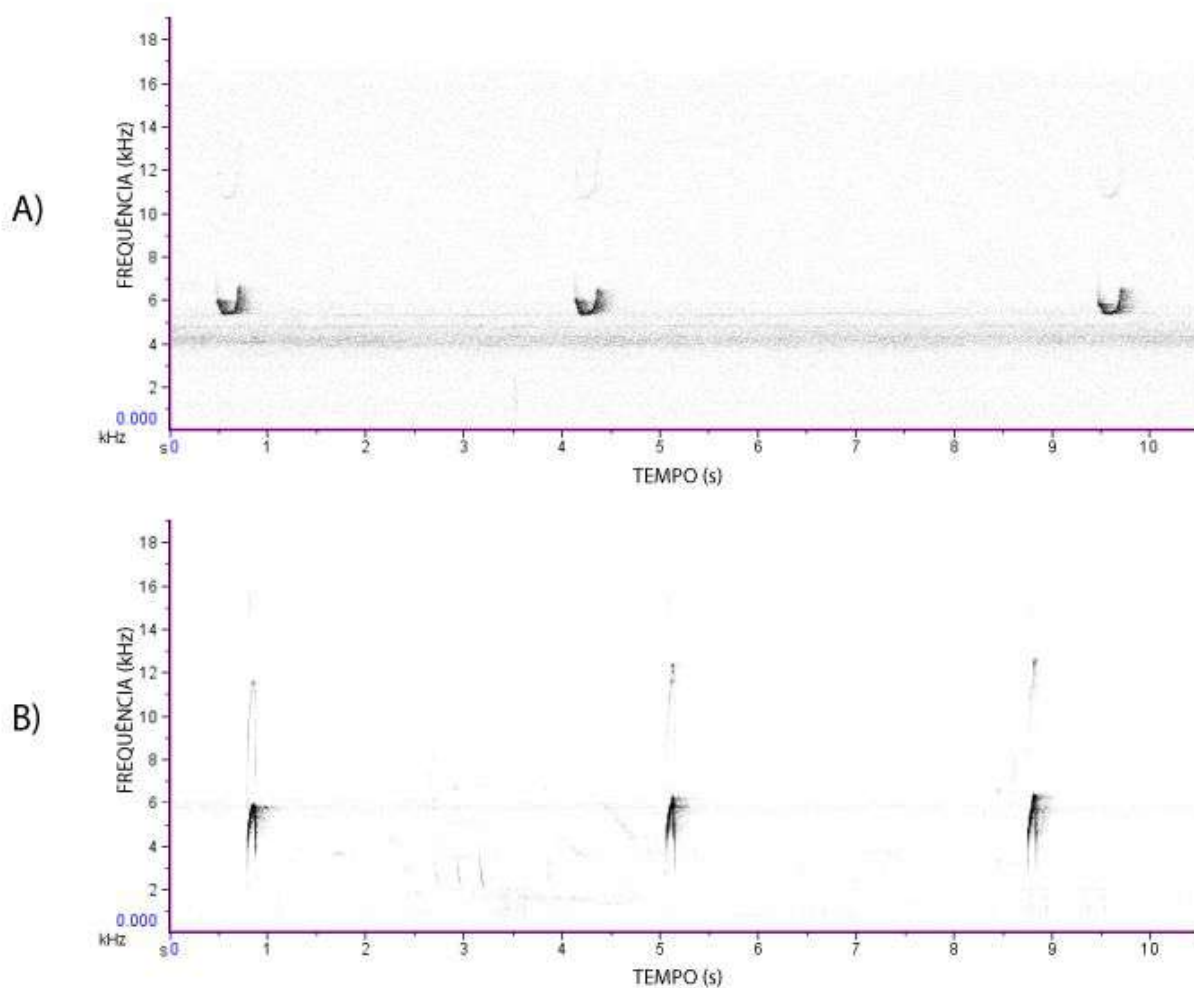
Figura 8 - visão ventral dos indivíduos selecionados para análise morfológica (direita - grupo “*viridiceps*” e esquerda - grupo “*flaviventris*”). Os números indicados pelas setas representam os caracteres comparados. I - Bico; II - Garganta; III - Peito e IV - Barriga.



Sobre os aspectos vocais, foi possível observar uma diferença bastante significativa entre as vocalizações do grupo *flaviventris* e *viridiceps* (Figura 9). É possível observar que o aspecto geral das notas difere drasticamente. Em *flaviventris* são observadas notas relativamente mais longas (cerca de 0,4 segundos) que iniciam com uma frequência de 6 kHz, apresentam uma modulação descendente de frequência e em seguida uma modulação ascendente de frequência para acima de 6 kHz, com a nota apresentando um formato de “U”. Por outro lado, os *calls* do grupo *viridiceps* possuem uma duração mais curta (cerca de 0,15 segundos), iniciando em uma frequência de cerca de 3 kHz, seguida de uma modulação ascendente de frequência com pico máximo de aproximadamente 6 kHz e seguida de uma modulação descendente de frequência,

apresentando um formato de “U” invertido. Além disso, os *calls* também diferem em aspectos qualitativos, sendo aqueles emitidos por *flaviventris* compostos por notas agudas isoladas com intervalos de tempo entre notas não sendo constante, enquanto que em *viridiceps* os *calls* consistem em uma série 3 a 4 assobios curtos com intervalos de tempo regulares.

Figura 9 - Comparação de sonogramas de *calls* dos grupos *flaviventris* (A) e *viridiceps* (B).



4. DISCUSSÃO

4.1. ASPECTOS TAXONÔMICOS

Os dados moleculares apresentados neste projeto representam talvez a última peça de evidência necessária para elevar o clado formado pelas subespécies de *T. flaviventris* do oeste Amazônico ao nível de espécie. Primeiramente, os dados moleculares mostraram que o grupo *viridiceps* e *flaviventris* formam um clado monofilético altamente apoiado, tanto nas análises de Inferência Bayesiana quanto na Árvore de Espécies, sendo *viridiceps* o primeiro grupo a separar-se, divergindo de *flaviventris* há cerca de 1,11 milhão de anos, o mais antigo dentro do clado. Tal separação é também evidenciada pelas análises de redes de haplótipo. Para os genes mitocondriais CYTB e ND2 houve grande estruturação populacional por parte de *viridiceps* com numerosos passos mutacionais que separam-no do grupo *flaviventris* e, embora não houvesse estruturação populacional substancial em *flaviventris* para todos os filogrupos nas redes dos genes nucleares MUSK e G3PDH, em *viridiceps* ela pôde ser observada nestes marcadores.

Adicionalmente, a análise de distância genética realizada entre os grupos mostra uma divergência significativa entre os dois cladogramas (entre 3,1 a 4,5 % de distância genética), podendo ser comparado, por exemplo, com a distância encontrada entre a espécie do grupo externo *T. poliocephalus* e o Filogrupo E (5,8% de distância genética).

Embora a análise filogenéticas de Árvore de Espécies tenha resgatado cladogramas monofiléticos bem apoiados dentro de *flaviventris*, ainda é cedo para inferir algum tipo de elevação taxonômica específica dentro deste grupo. Entretanto, as distribuições geográficas dos filogrupos deixam claro que a divisão taxonômica e a distribuição das diferentes subespécies de *T. flaviventris* estão equivocadas, havendo pelo menos a necessidade de se designar quatro subespécies (representadas pelos filogrupos B, C, D e E) ao invés das três atualmente descritas (*T. f. aurulentus*, *T. f. dissors* e *T. f. flaviventris*) para o grupo *flaviventris* condicionalmente à elevação de *T. viridiceps* ao nível de espécie. Caso isto ocorra, há necessidade de um estudo mais detalhado sobre a filogeografia de *T. viridiceps*, uma vez que este estudo não incluiu amostras de toda sua área de distribuição e das outras duas subespécies que tradicionalmente compõem o grupo, *T. f. zimmeri* e *T. f. subssimilis*, não sendo possível afirmar se esta divisão intraespecífica é realmente válida.

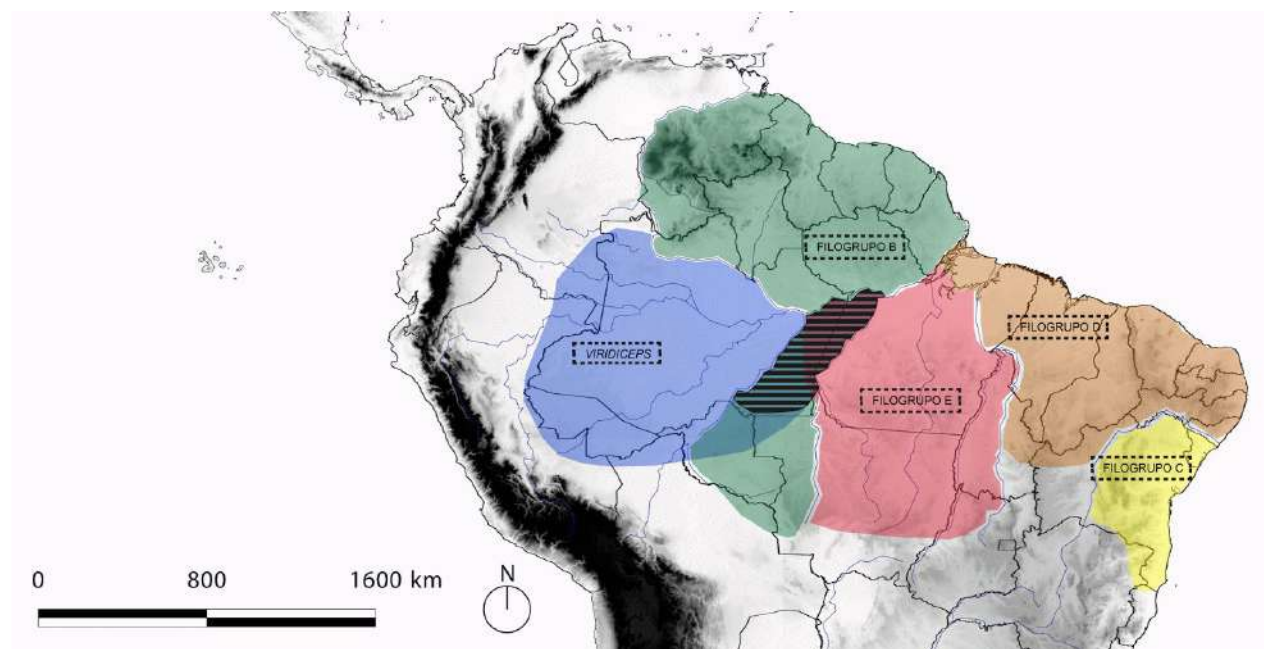
Análises morfológicas e vocais foram incluídas neste estudo com o objetivo de diagnosticar visualmente os dois grupos. Foi mostrado que há diferenças morfológicas e vocais que são congruentes com a separação do táxon, como proposto acima, tendo os caracteres aqui apresentados como propostas para diagnose.

4.2. ASPECTOS FILOGEOGRÁFICOS

Apesar do grande número de hipóteses que procuram explicar a diversificação da biota neotropical, principalmente em relação à Amazônia (ver, por exemplo, a Hipótese dos refúgios de Haffer, 1969; Hipótese das incursões marinhas de Bates, 2001; Hipótese dos rios como barreiras de Wallace, 1852; Ayres & Clutton-Brock, 1992), é um consenso formado por estudos mais recentes (Ribas et al., 2012; Aleixo & Rossetti, 2007; Aleixo, 2004; Aleixo, et al., 2014; Fernandes et al., 2013; Thom & Aleixo, 2015) de que a complexidade da formação e manutenção da biodiversidade Amazônica não pode ser resumida a apenas uma hipótese de diversificação.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a diversificação dos grupos *flaviventris* e *viridiceps* se deu em um intervalo entre 0,49 e 2,15 milhões de anos (média de 1,11 milhões de anos), em meados do Pleistoceno, que resultou na diversificação de cinco linhagens principais até o presente. O tempo de diversificação encontrado é congruente com a datação da formação da bacia amazônica no Plioceno, proposta por Campbell et al., 2006 (aproximadamente 2,5 milhões de anos atrás), embora outras datações sejam propostas (ver Hoorn et al., 2010; Latrubesse et al., 2010). A disposição geográfica estimada (Figura 10) das amostras de cada filogruppo sugere que sua distribuição é delimitada por rios, que poderiam estar servindo de barreira para diversificação das linhagens, causando um processo de especiação alopátrica. É importante ressaltar que na região do interflúvio Madeira-Tapajós há uma sobreposição de áreas de ocorrência entre o Filogruppo B, E e *viridiceps*, que pode ter sido causado por expansões populacionais mais recentes.

Figura 10 - Distribuição geográfica estimada para os grupos *viridiceps* e *flaviventris* (representado aqui pelos filogrupos B, C, D e E), indicados no mapa. A área destacada com os traços horizontais representa a área de sobreposição da distribuição geográfica dos Filogrupos B, E e *viridiceps*.



A hipótese de diversificação inicial mais simples a ser levantada é a de que o ancestral do clado *viridiceps* e *flaviventris* distribuía-se pelo menos ao longo do escudo das guianas e oeste amazônico. Com o surgimento do rio Amazonas houve o evento de separação mais antigo, o que proporcionou isolamento genético o suficiente para que hoje os dois grupos sejam considerados espécies distintas, como defendido aqui. A diversificação do grupo *flaviventris* iniciou-se com a separação do Filogrupo B há cerca de 0,5 milhão de anos (intervalo de 0,2 a 0,96 m.a.), o que pode estar relacionado também ao surgimento da bacia amazônica com os rios como barreira.

O próximo evento de diversificação envolve a separação do Filogrupo E dos Filogrupos D e C, ocorrido há aproximadamente 0,17 milhão de anos (intervalo de 0,07 a 0,33 m.a.). A pouca diferenciação genética dos Filogrupos C e D pode estar relacionada a eventos de dispersão mais recentes vindos da Amazônia (colonização da Caatinga e Mata Atlântica) ou através de eventos de isolamento causado por flutuações climáticas que poderiam ter causado a disrupção dos corredores de floresta que ligavam a Amazônia à Mata Atlântica, durante o quaternário superior (Batalha-Filho et al., 2013), e ainda uma terceira hipótese pode atribuir esta separação ao estabelecimento do Rio Tocantins como barreira.

Por fim, embora seja uma diversificação mais recente (aproximadamente 0,09 m.a.), a separação dos clados C e D parece estar sendo delimitada pelo Rio São Francisco, embora este

seja um rio mais antigo e estável (Lundberg et al., 1998; Potter, 1997; Ribeiro, 2006), portanto seu papel como barreira deve ser visto com cautela (Cabanne et al., 2008).

5. CONCLUSÃO

A espécie politípica *Tolmomyias flaviventris* tem sido alvo de diversas revisões taxonômicas ao longo dos anos. Embora seja relativamente abundante em toda a sua área de distribuição (cobrindo grande parte da América do Sul), ainda não havia sido realizado nenhum estudo que focasse na resolução das configurações taxonômicas de suas diferentes subespécies. Com este intuito, foram utilizadas análises genéticas *multilocus* e complementarmente análises comparativas morfológicas e vocais no presente estudo.

Os dados moleculares mostraram claramente a monofilia do grupo, com uma extensa separação genética entre indivíduos do oeste amazônico e as demais regiões amostradas, sendo esta configuração congruente com a proposta de diversos autores de que as populações desta região sejam na verdade elevadas ao nível de espécie. Embora as reconstruções filogenéticas tenham resgatado pelo menos cinco clados bem apoiados dentro do complexo *T. flaviventris*, é apenas possível afirmar com clareza o status taxonômico de *T. viridiceps* como espécie, deixando os outros filogrupos encontrados para serem analisados por um estudo mais detalhado. Adicionalmente, as comparações morfológicas e vocais fornecem uma diagnose bastante clara das duas espécies, com *T. viridiceps* possuindo uma mandíbula mais escura, com a base mais clara, enquanto que em *T. flaviventris* ela é inteiramente cor de pele, assim como a coloração geral da porção ventral, que é certamente mais olivácea, com tons amarelos mais opacos em *T. viridiceps* e de coloração amarelo bem vivo em *T. f. flaviventris*, característica esta que dá nome à espécie.

As datações moleculares resgatadas através da análise de árvore de espécies mostrou uma diversificação entre *T. flaviventris* e *T. viridiceps* ocorrida em meados do Pleistoceno, o que é congruente com a formação da do Rio Amazonas em período semelhante, o que pode ter causado um evento de especiação alopátrica através do estabelecimento de uma barreira que bloqueou o fluxo gênico. As diversificações dentro de *T. flaviventris* também parecem ter sido causadas pelos rios como barreiras geográficas, embora seja possível que algumas diversificações tenham sido causadas por eventos de retração e expansão florestal, como postula a teoria dos refúgios.

6. REFERÊNCIAS

ALEIXO, A. et al. The drivers of tropical speciation. **Nature**, [s.l.], v. 515, n. 7527, p.406-409, 10 set. 2014.

ALEIXO, Alexandre; ROSSETTI, Dilce de Fátima. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography?. **Journal Of Ornithology**, [s.l.], v. 148, n. 2, p.443-453, 21 ago. 2007.

ALEIXO, Alexandre. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia*, [s.i.], v. 2, n. 15, p.297-310, jun. 2007.

AMARAL, Fabio Raposo do et al. The “Atlantis Forest hypothesis” does not explain Atlantic Forest phylogeography. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 15, p.2097-2098, 16 mar. 2016.

ARBOGAST, Brian S.; KENAGY, G. J. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. **Journal Of Biogeography**, [s.l.], v. 28, n. 7, p.819-825, 7 jul. 2008.

AVISE, J C et al. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.489-522, nov. 1987.

AVISE, John C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. London: Harvard University Press, 2000. 447 p.

AVISE, John C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.371-379, abr. 1998.

AVISE, John C.. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal Of Biogeography**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.3-15, jan. 2009.

BATALHA-FILHO, Henrique et al. Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. **Journal Of Ornithology**, [s.l.], v. 154, n. 1, p.41-50, 16 jun. 2013.

BATES, J M et al. OBSERVATIONS ON THE CAMPO CERRADO AND FOREST AVIFAUNAS OF EASTERN DPTO. SANTA CRUZ BOLIVIA INCLUDING 21 SPECIES NEW TO THE COUNTRY. **Bulletin Of The British Ornithologists' Club**, [s.i.], v. 2, n. 112, p.86-98, jan. 1992.

BATES, J. M., 2001. Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic pattern of diversification, in: Viera, I., D'Incao, M. A., Silva, J. M. C., Oren, D. (Eds.), *Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia*, Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, Brasil, pp. 119-138.

BICKFORD, David et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.148-155, mar. 2007.

Bioacoustics Research Program. (2014). Raven Pro: Interactive Sound Analysis Software (Version 1.5) [Windows]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. Available from <http://www.birds.cornell.edu/raven>.

CABALLERO, I. (2016). Yellow-breasted Flycatcher (*Tolmomyias flaviventris*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). **Handbook of the Birds of the World Alive**. Lynx Edicions, Barcelona.

CAMPBELL, Kenneth E.; FRAILEY, Carl David; ROMERO-PITTMAN, Lidia. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, [s.l.], v. 239, n. 1-2, p.166-219, set. 2006.

CARNEIRO, Lincoln Silva et al. Systematic revision of the Spotted Antpitta (Grallariidae: *Hylopezus macularius*), with description of a cryptic new species from Brazilian Amazonia. **The Auk**, [s.l.], v. 129, n. 2, p.338-351, abr. 2012.

CBRO. (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). Lista das aves do Brasil, 2015. Disponível em: <www.cbro.org.br>.

CONDON, M. A. et al. Hidden Neotropical Diversity: Greater Than the Sum of Its Parts. **Science**, [s.l.], v. 320, n. 5878, p.928-931, 16 maio 2008.

CUTTER, Asher D. Integrating phylogenetics, phylogeography and population genetics through genomes and evolutionary theory. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.1172-1185, dez. 2013.

DEGNAN, James H. et al. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.332-340, jun. 2009.

DRUMMOND, A. J. Ho, S. Y. W. Rawlence, N. Rambaut, A. (2007). A Rough Guide to BEAST 1.4.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. e Xie, W. (2009) BEAST Version v1.5.3. Disponível online no site: <http://code.google.com/p/beast-mcmc>.

EDWARDS, S. V. et al. Speciation in birds: Genes, geography, and sexual selection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.6550-6557, 3 maio 2005.

FERNANDES, Alexandre M. et al. Multilocus phylogeography of the Wedge-billed Woodcreeper *Glyphorynchus spirurus* (Aves, Furnariidae) in lowland Amazonia: Widespread cryptic diversity and paraphyly reveal a complex diversification pattern. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.270-282, jan. 2013.

HAFFER, J.. Speciation in Amazonian Forest Birds. **Science**, [s.l.], v. 165, n. 3889, p.131-137, 11 jul. 1969.

HARE, Matthew P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 16, n. 12, p.700-706, dez. 2001.

HICKERSON, M. J. et al. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.291-301, jan. 2010.

HILTY SL, TUDOR, G. **Birds of Venezuela**. 2. ed. New Jersey: Princeton University Press, 2002.

HOORN, Carina; WESSELINGH, Frank. **Amazonia: Landscape species and evolution**. West Sussex: Blackwell Publishing Ltd, 2010. 447 p.

IRESTEDT, Martin; FJELDSÅ, Jon; ERICSON, Per G. P..Phylogenetic relationships of woodcreepers (Aves: Dendrocolaptinae) - incongruence between molecular and morphological data.**Journal Of Avian Biology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.280-288, maio 2004.

KUBATKO, Laura Salter; DEGNAN, James H.. Inconsistency of Phylogenetic Estimates from Concatenated Data under Coalescence. **Systematic Biology**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.17-24, fev. 2007.

LATRUBESSE, Edgardo M. et al. The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. **Earth-science Reviews**, [s.l.], v. 99, n. 3-4, p.99-124, maio 2010.

LIU, L. BEST: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 24, n. 21, p.2542-2543, 17 set. 2008.

LUNDBERG, J.g. et al. The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L.R. **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: Pucrs, 1998. p. 13-48.

MATA, Helena et al. Molecular phylogeny and biogeography of the eastern Tapaculos (Aves: Rhinocryptidae. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.450-462, nov. 2009.

OHLSON, Jan I. et al. Phylogeny and classification of the New World suboscines (Aves, Passeriformes). **Zootaxa**, [s.l.], v. 3613, n. 1, p.1-35, 7 fev. 2013.

OLSON, David M. et al. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. **Bioscience**, [s.l.], v. 51, n. 11, p.933-938, nov. 2001. Oxford University Press (OUP).

PERES, Monica Brick; VERCILLO, Ugo Eichler; DIAS, Bráulio Ferreira de Souza. Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a lista de Espécies Ameaçadas: O que significa, qual sua importância, como fazer?. **Biodiversidade Brasileira: Número temático: Avaliação do Estado de Conservação das Tartarugas Marinhas**, [s.i.], v. 1, n. 1, p.45-48, nov. 2011.

RAMBAUT A. e DRUMMOND, A. (2009) TRACER, Version 1.5. Disponível online no sitio: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

REMSEN, J. V., Jr., J. I. Areta, C. D. Cadena, S. Claramunt, A. Jaramillo, J. F. Pacheco, J. Pérez-Emán, M. B. Robbins, F. G. Stiles, D. F. Stotz, and K. J. Zimmer. Version 8 [2017]. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.htm>

RHEINDT, Frank E.; NORMAN, Janette A.; CHRISTIDIS, Les. Phylogenetic relationships of tyrant-flycatchers (Aves: Tyrannidae), with an emphasis on the elaeniine assemblage. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.88-101, jan. 2008.

RIBAS, C. C. et al. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 279, n. 1729, p.681-689, 27 jul. 2011.

RIDGELY, Robert S; GREENFIELD, Paul J.. **The Birds of Ecuador: Field Guide**. Ithaca: Cornell University Press, 2001.

RIDGELY, Robert S; TUDOR, Guy. **Field Guide to the Songbirds of South America: The Passerines**. Austin: University Of Texas Press, 2009.

RONQUIST, F. e HUELSENBECK, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574

SALZBURGER, W., EWING, G. B. & VON HAESLER, A. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. **Molecular Ecology** 20: 1952–63. 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 4a ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

KUMAR, S., STECHER, G; TAMURA K. (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)

TELLO, Jose G. et al. Phylogeny and phylogenetic classification of the tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannides). **Cladistics**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.429-467, out. 2009.

TELLO, Jose G.; BATES, John M.. MOLECULAR PHYLOGENETICS OF THE TODAY-TYRANT AND FLATBILL ASSEMBLAGE OF TYRANT FLYCATCHERS (TYRANNIDAE). **The Auk**, [s.l.], v. 124, n. 1, p.134-154, 2007.

THOM, Gregory; ALEIXO, Alexandre. Cryptic speciation in the white-shouldered antshrike (*Thamnophilus aethiops*, Aves – Thamnophilidae): The tale of a transcontinental radiation across rivers in lowland Amazonia and the northeastern Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 82, p.95-110, jan. 2015.

TUNDISI, JG.; MATSUMURA-TUNDISI, T.. Biodiversity in the neotropics: ecological, economic and social values. **Braz. J. Biol.**, São Carlos , v. 68, n. 4, supl. p. 913-915, Nov. 2008
WEIR, J. T.; SCHLUTER, D.. Calibrating the avian molecular clock. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 17, n. 10, p.2321-2328, 16 abr. 2008.

ZIMMER J. T. Study of Peruvian Birds. no. XXXIII: The Genera *Tolmomyias* and *Rhynchocyclus* With Further Notes on *Ramphotrigon*. **American Museum Novitates**, New York, v. 1, n. 1045, p.1-23, 11 out. 1939.

ZIMMER, Kevin J.; WHITTAKER, Andrew; OREN, David C.. A Cryptic New Species of Flycatcher (Tyrannidae: Suiriri) from the Cerrado Region of Central South America. **The Auk**, [s.l.], v. 118, n. 1, p.56-78, jan. 2001.

ZINK, Robert M.; BARROWCLOUGH, George F.. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.2107-2121, 4 abr. 2008.