

Universidade Federal do Amazonas - UFAM  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA  
Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais  
Programa de Mestrado em Genética Conservação e Biologia Evolutiva

Variação geográfica e genética de *Hemitriccus minor*  
(Aves: Tyrannidae) na Bacia do Rio Madeira

Carla Haisler Sardelli

MANAUS-AM  
07/2005

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**

Variação geográfica e genética de *Hemitriccus minor*  
(Aves: Tyrannidae) na bacia do rio Madeira

Carla Haisler Sardelli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS-AM  
2005

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**

Variação geográfica e genética de *Hemitriccus minor*

(Aves: Tyrannidae) na bacia do rio Madeira

Carla Haisler Sardelli

Orientador: Dr. Mario Cohn-Haft

Fontes Financiadoras: Projeto PROBIO (Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica) Inventário faunístico na área do médio rio Madeira. Financiador: MMA, Banco Mundial, CNPq

Projeto: Estudos avifaunístico da área do rio Madeira, no trecho Cachoeira de Santo Antônio (Porto Velho) e Jirau (Abunã)/ RO. Financiador: FURNAS

CAPES / PROAP

INPA/PPI (nº1-3740)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS-AM  
2005

SARDELLI, C. H.

Varição geográfica e genética de *Hemitriccus minor* (Aves: Tyrannidae) na bacia do rio Madeira

Carla Haisler Sardelli - Manaus, 2005.

p: 54 il.

Dissertação– INPA/UFAM.

1. Filogeografia, 2. Aves, 3. DNA mitocondrial, 4. Amazônia

CDD.ed. (\*)

**SINOPSE:**

A análise do gene mitocondrial citocromo b revelou um novo padrão de variação geográfica para *Hemitriccus minor* (Aves: Tyrannidae) na Bacia do rio Madeira. Todas as análises mostraram ao menos três populações estruturadas geneticamente na região. Esses dados indicaram a presença de duas espécies diferenciadas ao oeste do rio Madeira, onde era descrita apenas uma espécie, e também endemismo delimitado pelos pequenos rios do interflúvio Madeira e Tapajós.

**PALAVRAS-CHAVE:** Filogeografia, Aves, DNA mitocondrial, Amazônia

**ÀS PESSOAS QUERIDAS DE LONGE E AOS PASSARINHOS...**

## AGRADECIMENTOS

Várias pessoas me ajudaram: umas me mostrando a realidade (*Renata Schmitt*), outras me tirando dela (*Taciana Amorim*). Umag agindo de forma determinada (*Rafael Bernhard*), outras sendo loucas e apaixonadas (*Karl Mookros*). Umag me dando tranqüilidade, carinho por um momento e me ajudando a enxergar a mim mesma... (*Milton Carlos Bianchini*), outras me ensinando a pesquisar, a ter orgulho do meu trabalho, tendo paciência... e eu tão insegura... Que me disseram que tudo era pesquisa quando o que eu mais queria era vender coco na praia (*Mario Cohn-Haft*).

Umag pessoas me ouviram e ouviram e ouviram (*Renata Schmitt, Márcia Neiva, William Vasconcelos, Marcela Torres Deisi Balenseifer, Juliana Leoni, Lílian Figueiredo Rodrigues, Nislanha Anjos*), outras falaram, contaram histórias... (*Milton Carlos Bianchini, Whaldener Endo-Óleo, Lílian Figueiredo Rodrigues, Ana Raquel de Mesquita Garcia, Genimar Rebolças Julião, Romilda Paiva*). Algumas pessoas me ofereceram lugar para ficar quando eu não conhecia nada e ninguém (*MaryAllen*), outras me ensinaram mil e uma maneiras de se organizar um lugar, e me mostraram também como ser atenciosa e prestativa (*Carolina Castilho*).

Algumas pessoas me ajudaram muito com as análises dos resultados (*William Rangel Vasconcelos, Carlos David Santana, Tomas Hrbek, Renata Schmitt, Andréia Cantanhede, Mario Cohn-Haft*) e outras na obtenção deles (*Mario Cohn-Haft, Renata Schmitt, Tatiana Marão, Alexandra Bentes, Jaqueline Batista, Kyara Formiga, Fabíola Peres, Eudina Nogueira de Assunção*). Umag me ensinaram a observar e a ouvir as aves e eu adorei... (*Mario Cohn-Haft, Luciano Naka, Alexandre Fernandes, Álysson Melo, Marcela Torres*), outras me ajudaram na taxidermia das aves (*Mario Cohn-Haft, Ingrid Macedo, Alexandre Fernandes*). Tiveram também pessoas que me ajudaram com figuras (*Milton Carlos Bianchini, Karl Mookros, Catherine Bechtoldt, Julio Daniel, Renata Schmitt, Mario Cohn-Haft*) e que me auxiliaram com os computadores (*Milton Carlos Bianchini, Karl Mookros, Renata Schmitt e Rafael Bernhard, Carlos David Santana, André Dias Santana*).

Bem, umas e outras pessoas me ajudaram, mas, em todo momento quem sempre esteve pertinho, mesmo bem longe... foi minha família (*Carlos Donizete Sardelli, Vera Lúcia Haisler Sardelli, Cléber Haisler Sardelli e Cassiano Haisler Sardelli*) que lia minhas cartas imensas contando sobre os bichos que tinha visto e algumas das experiências que tinha vivido... tudo, com muita paciência e compreensão. Pessoas por quem eu senti saudades, muitas... que me dão segurança para ir a qualquer lugar, porque sei que tenho para onde voltar.

Agradeço também as pessoas que me ensinaram (*Mario Cohn-Haft, Izeni Farias e Tomas Hrbek, José Gomes, Eliana Feldberg e Jorge Porto, Hercília Ribeiro, Renato Cintra, Tânia Sanaiotti, Arnaldo Carneiro, Márcio Oliveira, Cabeça de papagaio-Adailton ...*), àquelas que leram as minhas primeiras, não inteiras e confusas versões (*Óleo, Luciano Naka, Angelita-Ângela Midori, Carlos David Santana, Renata Schmitt, Mario Cohn-Haft, Lílían Figueiredo, Marcela Torres*) e também não poderia me esquecer das pessoas que me ajudaram a me distrair (mais) um pouquinho (*Renata Schmitt e Rafael Bernard, Taciana Amorim, Willian Rangel Vasconcelos, Lílían Figueiredo Rodrigues, Carla Gomes Bantel, Thiago André, Paulo Estéfano, Deisi Balenseifer, Andréia Catanhede, Camila Ferrara*).

Agradeço as instituições (*INPA, UFAM, CAPES*), ao curso (*GCBEV*), aos projetos (*PPI, PROBIO, FURNAS, PROAP*) e à Ecologia (*CPEC*).

Agradeço aos meus amigos de longe que me incentivaram a chegar até aqui (*Davi Gutierrez, Débora Rother, Thaís Fernandes, Iracema Monteiro e Leonardo Gomes, Tatiana Souza, Lucilene Delazari, Simone Kaibara, Fernanda Bavaro, Thaís Marini, Bruna Ventura, Mariana Cortes*) e ao meu **Deus**, que para mim é a força que me guia (não sei para onde), mas, às vezes, eu não sinto, não ouço e então... fico perdida.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	XI
ABSTRACT .....	XII
INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	9
TÁXON DE ESTUDO .....	9
ÁREA DE ESTUDO .....	11
DESENHO AMOSTRAL .....	13
COLETA DOS INDIVÍDUOS .....	15
PROCEDIMENTOS PARA AS ANÁLISES MOLECULARES .....	16
EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE MTDNA .....	19
DISTÂNCIA GEOGRÁFICA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA .....	20
ANÁLISES POPULACIONAIS .....	22
ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	22
RESULTADOS .....	23
DISTÂNCIA GEOGRÁFICA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA .....	24
ANÁLISES POPULACIONAIS .....	26
ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	27
MÉTODO DA DISTÂNCIA .....	27
MÁXIMA PARCIMÔNIA .....	29
MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA .....	31
DISCUSSÃO .....	31
INFLUÊNCIA DOS “MINI-INTERFLÚVIOS” NA DISTRIBUIÇÃO DE <i>HEMITRICCUS MINOR</i> ...	36
<i>HEMITRICCUS MINOR PALLENS</i> .....	37
DESCRIÇÃO DO PADRÃO DE VARIAÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>HEMITRICCUS MINOR</i> .....	39
CONCLUSÃO .....	41
BIBLIOGRAFIA .....	43
ANEXOS .....	54



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Algumas das áreas de endemismos delimitadas pelos grandes rios da Amazônia propostas a partir da distribuição de aves (adaptado de Cracraft 1985).....3
- Figura 2. Padrão de distribuição de *Callicebus* e *Calitrix* (Roosmalen *et al.* 1998, 2000 descrito para a área de endemismo Rondônia (Sensu Cracraft 1985) delimitada pelos rios Madeira e Tapajós.....4
- Figura 3. Filogenia molecular obtida através da análise de Máxima verossimilhança para as seqüências de DNA mitocondrial (cytb) de *Hemitriccus minor* (Cohn-Haft 2000) e distribuição geográfica.....8
- Figura 4. Localização do Rio Madeira na Bacia Amazônica.....12
- Figura 5. Pontos de coleta de *Hemitriccus minor*.....14
- Figura 6. Local de anelamento dos *primers*.....18
- Figura 7. Árvore de haplótipos.....25
- Figura 8. Única árvore mais parcimoniosa com peso igual para transição e transversão.....30

Figura 9. <i>Bootstrap</i> da análise de Máxima parcimônia com 500 réplicas.....	32
Figura 10. Única árvore obtida pela análise de Máxima verossimilhança (modelo evolutivo = HKY85+G).....	33
Figura 11. Padrão de distribuição de <i>Hemitriccus minor</i> na bacia do rio Madeira e cladograma de área.....	40

#### LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de purificação com Polietileno Glicol (PEG) .....	57
Anexo 2. Lista com os nomes e números dos indivíduos coletados e também locais de coleta.....	58

## RESUMO

Estudos de biogeografia de aves amazônicas já revelaram distribuições geográficas delimitadas pelos grandes rios. Mas, até que ponto essa variação geográfica está bem descrita? Neste estudo, analisei, com base em dados moleculares, a variação geográfica de *Hemitriccus minor* na bacia do rio Madeira. Com os resultados das análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança, AMOVA e análise filogeográfica de clados inseridos, com 642 pares de bases de DNA mitocondrial citocromo b, confirmei um novo padrão na distribuição desse complexo de espécies. As análises indicaram que *H. minor* não é uma espécie monofilética; é parafilética, o clado completo inclui *H. spodiops*. Ao contrário da classificação atual, *H. minor* contém duas populações distintas a oeste do rio Madeira; uma, *H. m. pallens*, é a espécie irmã de *H. spodiops* e ocorre somente em floresta de igapó, principalmente a oeste dos rios Purus e Negro; a outra, ainda sem nome, ocorre no interior de floresta de terra firme e igapó em uma parte do interflúvio Madeira-Purus e é mais aparentada às populações de *H. minor* a leste do rio Madeira. Entre as populações a leste do rio Madeira a situação é menos clara, mas, as análises apontaram para a existência de dois clados que são mais aparentados entre si e diferenciados do restante de *H. minor* da margem direita do Madeira. Esses dois clados parecem estar delimitados geograficamente por pequenos rios, mostrando um padrão de variação geográfica conhecida somente em primatas amazônicos. Pela análise de clados inseridos um evento vicariante teria sido responsável pela divergência genética encontrada entre essas populações. Dados moleculares indicaram um novo padrão na variação geográfica de *H. minor* e apontaram para a importância de utilizar essas técnicas nos estudos de biogeografia da Amazônia.

## ABSTRACT

Studies of the biogeography of Amazonian birds have revealed geographic distributions delimited by large rivers. However, to what extent has this geographic variation been well described? In this study, I analyzed molecular genetic geographic variation in *Hemitriccus minor* in the Rio Madeira basin. Based on maximum parsimony, maximum-likelihood, AMOVA, and nested clade analyses of a 642 bp-section of the mitochondrial cytochrome b gene, I confirmed a new distributional pattern in this species complex. Results indicated that *H. minor* is not a monophyletic species; it is paraphyletic, the complete clade also including *H. spodiops*. In contrast to the current classification, *H. minor* contains two distinct populations west of the Rio Madeira; one, *H. m. pallens*, is sister to *H. spodiops* and occurs only in flooded forests, mostly west of the Purus and Negro rivers; the other, as yet unnamed, occurs in the interior of upland and flooded forests in part of the Madeira-Purus interfluvium and is most closely related to the populations of *H. minor* found east of the Madeira. The situation for the populations east of the Madeira is not as clear; however, results indicate the presence of two small sister clades differentiated from the remaining populations. These two appear to be delimited geographically by small rivers, showing a geographic pattern previously described only in Amazonian primates. Based on nested clade analysis, a vicariant event is probably responsible for the genetic divergence encountered between these populations. Molecular data, then, detected a new pattern of geographic variation in *H. minor* and reinforce the importance of modern methods in the study of Amazonian biogeography.

## INTRODUÇÃO

Estudos sobre a distribuição geográfica de aves têm tido um importante papel no conhecimento da história evolutiva da bacia amazônica. Desde os primeiros pesquisadores já era observada a diferença entre espécies em margens opostas dos grandes rios, não somente para aves, mas também para mamíferos e lagartos (Wallace 1853, Sick 1967, Vanzolini *et al.* 1970). Buscando entender esse padrão de variação geográfica e os processos que levaram a diversificação das espécies, várias hipóteses foram sendo formuladas, entre elas: hipótese dos refúgios pleistocênicos (Haffer 1969), gradientes ecológicos (Endler 1977, 1982), hipótese dos rios como barreiras (Wallace 1853, Sick 1967, Caparella 1988), arcos tectônicos (Silva & Patton 1993, 1998), ilhas (Nores 1999), estocasticidade demográfica (Cohn-Haft 2000). Entretanto, se os padrões de distribuição e variação geográfica ainda necessitarem de melhor descrição, pode estar cedo para tentar avaliar essas diferentes hipóteses.

Os padrões descritos para a avifauna, além de levar à formulação de hipóteses evolutivas, estimularam estudos biogeográficos com outros grupos de animais: mamíferos (Patton 1994, Silva & Oren 1996), anfíbios (Lougheed *et al.* 1999), borboletas (Brown 1982), comunidades de plantas (Colinvaux 1987, Colinvaux *et al.* 2000) e em outras áreas do conhecimento como na palinologia e paleoclima. Os resultados obtidos com a distribuição geográfica de aves também serviram como base para a definição de áreas de endemismo delimitadas pelos grandes rios (Cracraft 1985) que em geral são válidas até hoje.

As áreas de endemismo são regiões definidas pela presença de táxons que não ocorrem em nenhum outro lugar, geralmente são delimitadas por barreiras fisiogeográficas ou climáticas (Cracraft, 1985). Na Amazônia, os grandes rios são os limites de distribuição de diversos organismos e separam as áreas de endemismo, propondo um padrão de distribuição não visto em nenhum outro lugar do mundo (Figura 1).

O padrão de delimitação de áreas de endemismo por grandes rios amazônicos também foi descrito para primatas (Wallace 1853, Ayres 1992, Roosmalen *et al.* 1998, 2000) mas, além dos grandes rios, trabalhos apontaram para uma complexidade maior na diferenciação de primatas na região entre os rios Madeira e Tapajós. Por exemplo, o sagüi, *Callithrix humilis*, uma nova espécie descrita por Roosmalen *et al.* (1998) só ocorre na margem ocidental do Rio Aripuanã (Figura 2), assim como, *Callicebus bernhardi* (Roosmalen *et al.* 2000). As revisões realizadas para esses dois gêneros mostraram que rios mais estreitos como, Sucunduri, Aripuanã, Machado/Jiparaná, também podem delimitar a distribuição de táxons distintos, sugerindo a existência de várias áreas de endemismo dentro do que foi considerado por Cracraft (1985) como uma única área (Figura 2).

Casos de endemismos, possivelmente, delimitado por menores afluentes entre os rios Madeira e Tapajós, têm sido detectados em algumas espécies de aves, como *Rhegmatorhina hoffmannsi* e *R. berlepschi* (Willis 1989) e *Capito brunneipectus* (Haffer 1997). Entretanto, isso nunca foi examinado em detalhe ou como característica de um padrão geral. Trabalhos recentes (Bates 1999, Marks *et al.* 2002) e outros ainda não publicados (M. Cohn-Haft & B. M. Whitney com. pess.), no entanto, mostraram mais

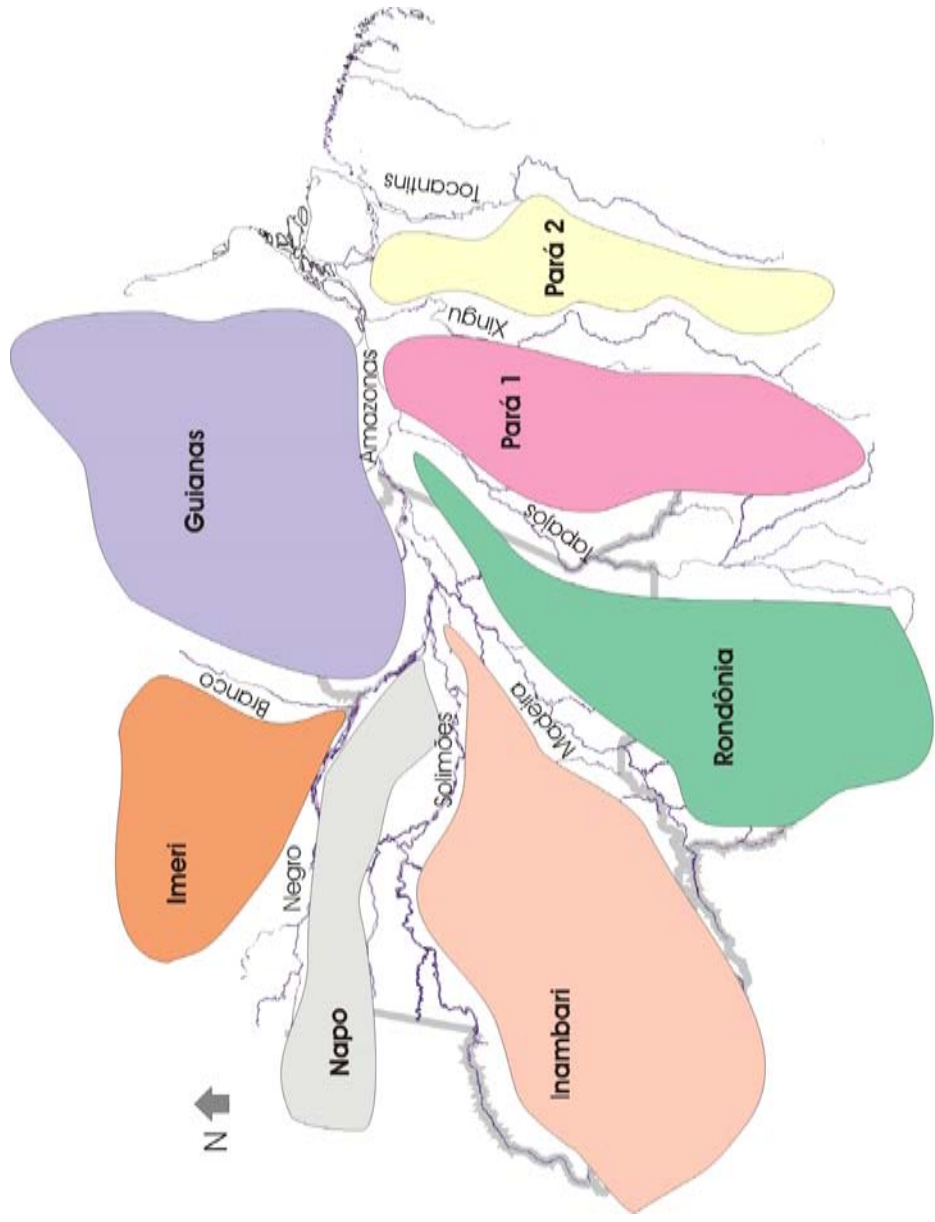


Figura 1 - Algumas das áreas de endemismo delimitadas pelos grandes rios da Amazônia baseadas na partir da distribuição de aves (adaptado de Cracraft 1985)

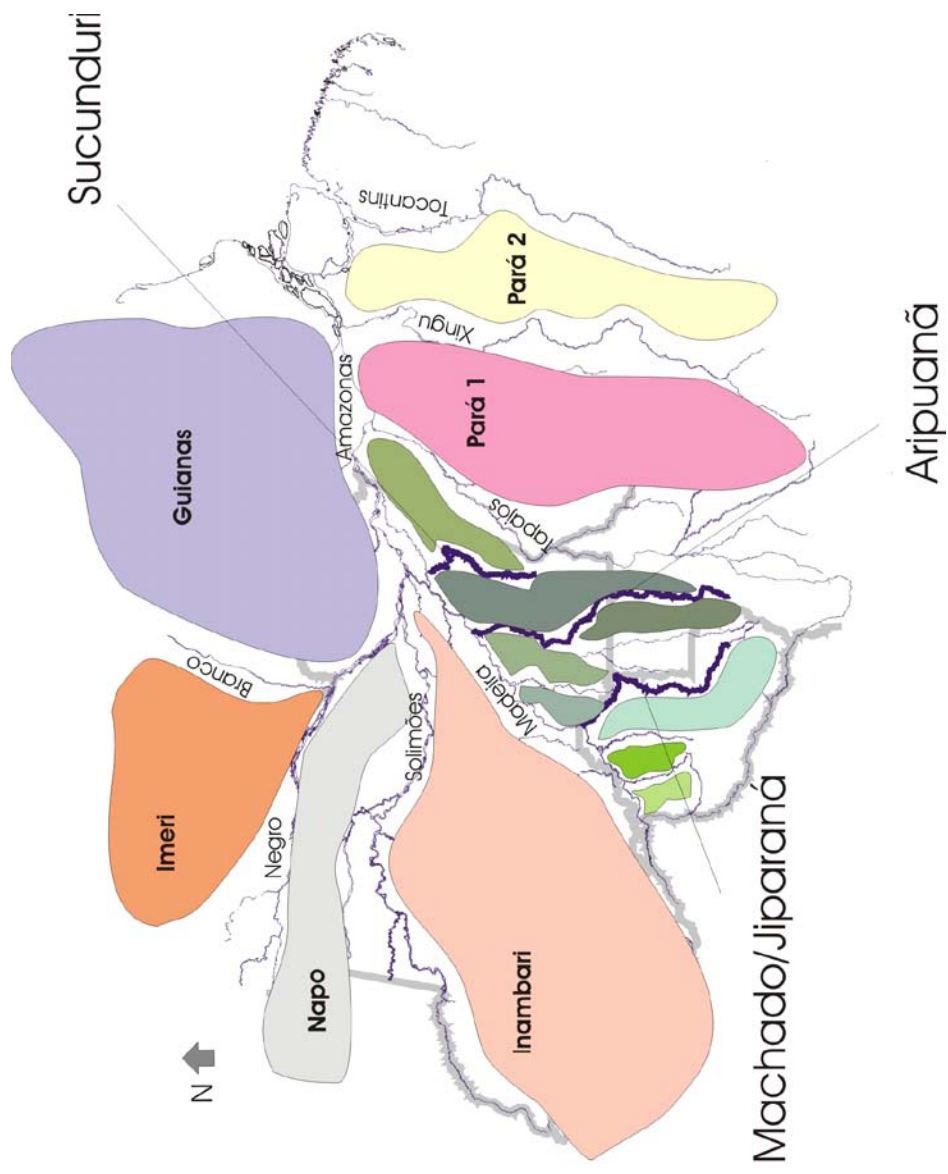


Figura 2. Padrão de distribui o de *Callicephus* e *Callithrix* (Roosmalen *et al.* 1998, 2000) descrito para a área de endemismo Rondônia (*sensu* Cracraft, 1985) delimitada pelos rios Madeira e Tapajós



casos de delimitação de espécies de aves por pequenos rios nessa região. Por exemplo, o pica-pau anão *Picumnus aurifrons* (Picidae) tem seu limite oriental de distribuição na margem esquerda do rio Aripuanã e *Picumnus borbae* tem seu limite ocidental na margem direita desse rio. Outros exemplos são o papa-formigas-cantador (*Hypocnemis cantator*: *Thamnophilidae*), que tem voz diferente em margens opostas do Aripuanã, fato que leva a acreditar que são táxons diferenciados, e também uma espécie nova de *Herpsilochmus* (*Thamnophilidae*) que aparentemente só ocorre entre o Rio Aripuanã e o rio Machado/Jiparaná (Cohn-Haft, com pess.).

A maioria dos trabalhos que descrevia padrões de distribuição, não necessariamente procurava por grupos monofiléticos (Wallace 1853; Sick 1967; Vanzolini *et al.* 1970; Haffer 1969, 1997; Cracraft 1985; Endler 1977, 1982; Caparella 1988; Nores 1999). Mais recentemente, algumas pesquisas têm utilizado a filogenia para tentar entender processos biogeográficos (Cracraft & Prum 1988, Prum 1988, Bates *et al.* 1998) e outras estão se baseando também em caracteres moleculares (Bates 1999; Cohn-Haft 2000; Aleixo 2002, 2004; Marks *et al.* 2002). A genética molecular tem revelado novos táxons e as relações filogenéticas propostas entre esses táxons têm auxiliado na compreensão de sua história evolutiva (Li & Graur 1991, Page & Holmes 1998). Através da variação encontrada entre seqüências de DNA, principalmente DNA mitocondrial, podem ser detectados padrões biogeográficos (Avice 1986, 1987, 1989, 2000; Silva 1993) e ocorrência de fluxo gênico entre populações. Essa técnica pode mostrar uma biodiversidade escondida, por exemplo, encontrando variação entre populações que morfologicamente são semelhantes

(“espécies crípticas” *sensu* Mayr 1977; Bates 1999, Cohn-Haft 2000, Aleixo 2002, 2004; Marks *et al.* 2002).

Apesar de Aves ser um dos grupos melhor estudado, ainda há poucos trabalhos que utilizam caracteres moleculares para revelar variação geográfica, e alguns desses trabalhos também sugerem padrões ainda mais complexos de endemismo no interflúvio Madeira-Tapajós. Por exemplo, Marks e colaboradores (2002) obtiveram uma filogenia para as populações de *Glyphorynchus spirurus* (Dendrocolaptidae) a partir de dados de seqüências de DNA mitocondrial (mtDNA). Os resultados mostraram que a área de endemismo delimitada pelos rios Madeira e Tapajós (Figura 1) estaria dividida em diferentes áreas e que os níveis de divergência genética entre as populações que ocorrem nas margens opostas do rio Machado/Jiparaná (Figura 2) que foram altos, poderia sugerir também, um longo período de influência desse pequeno rio na distribuição desses arapaçus.

O caso de *Hemitriccus minor* (Tyrannidae) também apontou para um padrão de distribuição, mais complexo do que aquele descrito na literatura para a região do Rio Madeira. Em um estudo de filogeografia de várias espécies de tiranídeos do gênero *Hemitriccus* em toda a bacia Amazônica, usando seqüências do gene mitocondrial citocromo b (Cohn-Haft 2000), houve uma sugestão de que os rios menores do interflúvio Madeira-Tapajós poderiam estar separando populações distintas. No entanto, esta sugestão teve como base apenas dois espécimes e, além disso, esse estudo não teve como objetivo identificar padrões biogeográficos entre pequenos rios. Um número amostral maior na

região, principalmente ao longo da margem direita do rio Madeira, seria necessário para detectar mais precisamente a variação geográfica dos pássaros nessa área.

A classificação mais recente do gênero *Hemitriccus* (Traylor 1979), baseada em dados morfológicos reconhece subespécies distintas em lados opostos do rio Madeira: a subespécie *H. minor pallens* em toda a Amazônia ocidental à esquerda do rio, e *H. m. snethlageae* à direita, no interflúvio Madeira-Tapajós. Cohn-Haft (2000) utilizando dados moleculares, além de apontar para complexidade populacional na margem direita, confirmou a diferenciação em lados opostos do Madeira (Figura 3). Nesse estudo também foram detectadas duas populações distintas na margem esquerda do rio (11 e 13-17, Figura 3), com diferenciação genética alta: uma em floresta de igapó (13-17) e a outra em terra firme (11) e aparentemente, sem sobreposição geográfica (Cohn-Haft 2000). A falta de diferenciação morfológica, típica do gênero (Cohn-Haft 1996, 2000; Cohn-Haft *et al.* 1997) mantinha escondida essa diversidade faltando ainda informações comportamentais, ecológicas ou genéticas. Sem coletas em Nova Olinda, que é a localidade do tipo de *H. m. pallens*, não estava certa a qual população da margem esquerda do rio Madeira se referia o nome *H. m. pallens* e nem poderia ser confirmada uma outra população nessa mesma margem que estava sem um nome.

Portanto, o objetivo do atual estudo foi descrever os padrões geográficos de variação genética de *H. minor* na bacia do rio Madeira. Usando seqüenciamento de DNA mitocondrial de exemplares coletados em localidades-chave, tentei também responder especificamente às seguintes perguntas:

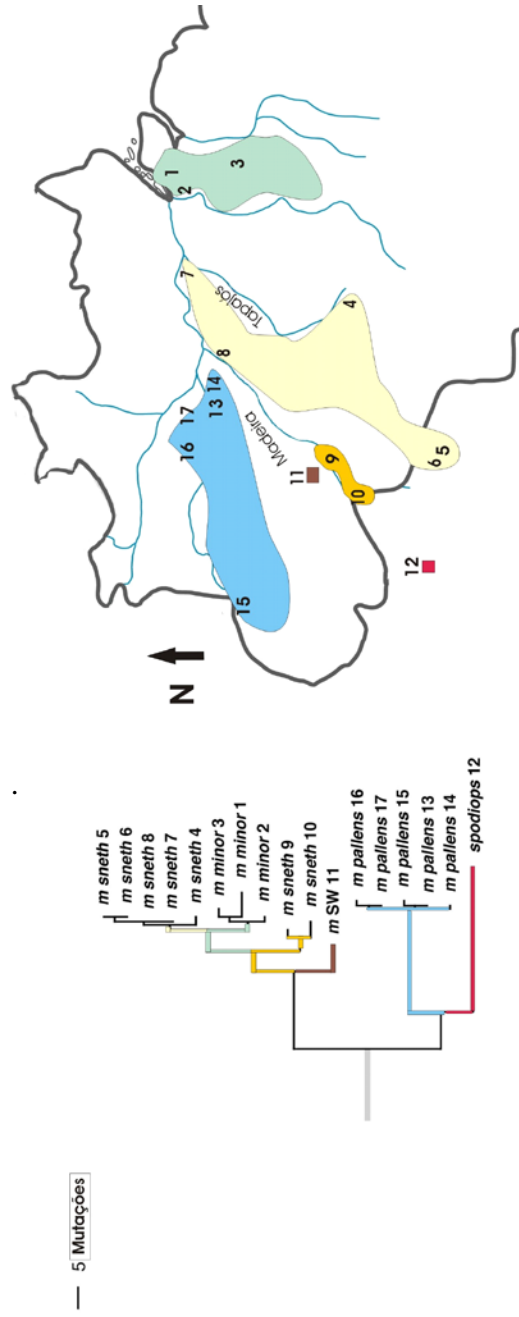


Figura 3. Filogenia molecular obtida através da análise de Máxima Verossimelhança para as seqüências de DNA mitocondrial (ctyb) de *Hemiriccus minor* (Cohn-Haft, 2000) e distribuição geográfica. Esses dados indicam a presença de uma possível população não identificada na margem esquerda do Rio Madeira (11) e sua separação do grupo monofilético composto pelos indivíduos 9 e 10 que levou a suspeitar da influência dos pequenos rios na distribuição desses pássaros. As cores indicam os grupos monofiléticos (a sua distribuição no mapa e como se agruparam na filogenia molecular obtida) os números são referentes aos indivíduos seqüenciados e a posição desses números no mapa está de acordo com o local de coleta

1. A distância geográfica corresponde à divergência genética encontrada nessas populações?

2. Existem populações diferenciadas nos pequenos rios dentro do interflúvio Madeira-Tapajós?

3. Qual das duas populações ao oeste do rio Madeira representa o táxon *H. m. pallens* e qual é novo?

Os resultados obtidos com esse estudo poderiam sugerir uma revisão taxonômica para o complexo *H. minor* e também confirmar um novo padrão variação geográfica, destacando a importância de pequenos interflúvios na distribuição de aves da Amazônia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### TÁXON DE ESTUDO

O gênero *Hemitriccus* (Passeriformes: Tyrannidae) contém aproximadamente vinte espécies, todas endêmicas da América do Sul (Traylor 1979) sendo a maioria delas encontrada nos Andes e no Brasil (Ridgely & Tudor 1994). Essas espécies são morfologicamente parecidas, principalmente quanto ao padrão de plumagem e ao formato do bico. Aparentemente, não possuem grande capacidade de dispersão, são territorialistas,

monogâmicas, não migratórias e limitadas, principalmente, ao interior de florestas primárias (Cohn-Haft 2000). O comportamento é uniforme, alimentam-se de artrópodes, forrageando em curtas distâncias durante o voo, e possuem canto parecido com os de sapos e insetos (série de notas curtas e agudas). Algumas espécies como *H. flammulatus*, *H. josephine*, *H. striaticollis* e *H. iohannis* possuem distribuição disjunta dentro da Amazônia e outras, como *H. minor* e *H. zosterops* têm ampla distribuição podendo ocorrer simpatricamente em diferentes micro-habitats (Cohn-Haft 2000).

As subespécies amazônicas do complexo *Hemitriccus minor* (*H. m. minor*/*H. m. snethlageae*/*H. m. pallens*) possuem diferenças morfológicas sutis entre si com caracteres diagnósticos pouco definidos, o que torna difícil a sua identificação (Cohn-Haft 1996). A comparação entre o formato do bico e a narina (com características presentes somente nesse grupo = sinapomorfias) e também as similaridades vocais e morfológicas unem todas as subespécies de *H. minor* com a espécie andina, *H. spodiops*, do mesmo sub-gênero *Snethlageae* (Cohn-Haft 1996). Um estudo recente (Cohn-Haft 2000) mostrou que *H. m. pallens* é tão diferenciado geneticamente das demais populações de *H. minor* quanto é a espécie *H. spodiops* do mesmo grupo, sugerindo que *H. minor* compõe um complexo de espécies.

Os limites de distribuição descritos para o complexo de espécies *H. minor* abrangem a maior parte da Amazônia (Figura 3), só faltam registros de *H. minor* no nordeste da Amazônia entre os rios Branco e Amazonas, e entre os rios Tapajós e Xingu, áreas de aparente ausência real e não de falta de amostragem. *H. m. pallens* tem sua

distribuição restrita ao oeste dos rios Madeira e Negro. No interflúvio Xingu-Tocantins está restrita a subespécie *H. m. minor* e no interflúvio Madeira-Tapajós a subespécie *H. m. snethlageae*. *H. spodiops*, espécie próxima a *H. minor*, ocorre nos Andes. Os primeiros dados moleculares disponíveis para o complexo “*minor*” mostraram a possível influência dos pequenos rios entre o interflúvio Madeira-Tapajós e também uma nova população ao oeste do Rio Madeira (Cohn-Haft 2000).

## ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo abrange, sobretudo, a bacia do rio Madeira que ocupa cerca de vinte por cento da bacia Amazônica (Figura 4). O rio Madeira é uma das mais importantes barreiras para a fauna e delimita duas grandes áreas de endemismo: uma no interflúvio Solimões-Madeira e outra no Madeira-Tapajós (Figura 1) (Cracraft 1985). Estudos recentes apontaram também para endemismos dentro de áreas delimitadas pelos pequenos rios do interflúvio Madeira\_Tapajós (Roosmalen *et al.* 1998, 2000) como o rio Aripuanã e Jiparaná (=Machado) (Ferrari *et al.* 1999, Marks *et al.* 2002). Os primeiros dados publicados sobre o Rio Madeira foram de Hellmayer (1910) e mostrava uma grande biodiversidade, provavelmente, uma das maiores biodiversidades, e esse fato ocorre porque há na região, exemplos de substituição geográfica de espécies em lados opostos do rio, e também uma complexidade de ambientes como: campinas, florestas de terra firme, buritizais, várzeas, tabocais e também pelo contato entre biomas como Amazônia e Cerrado (Cohn-Haft *et al.* 2004).

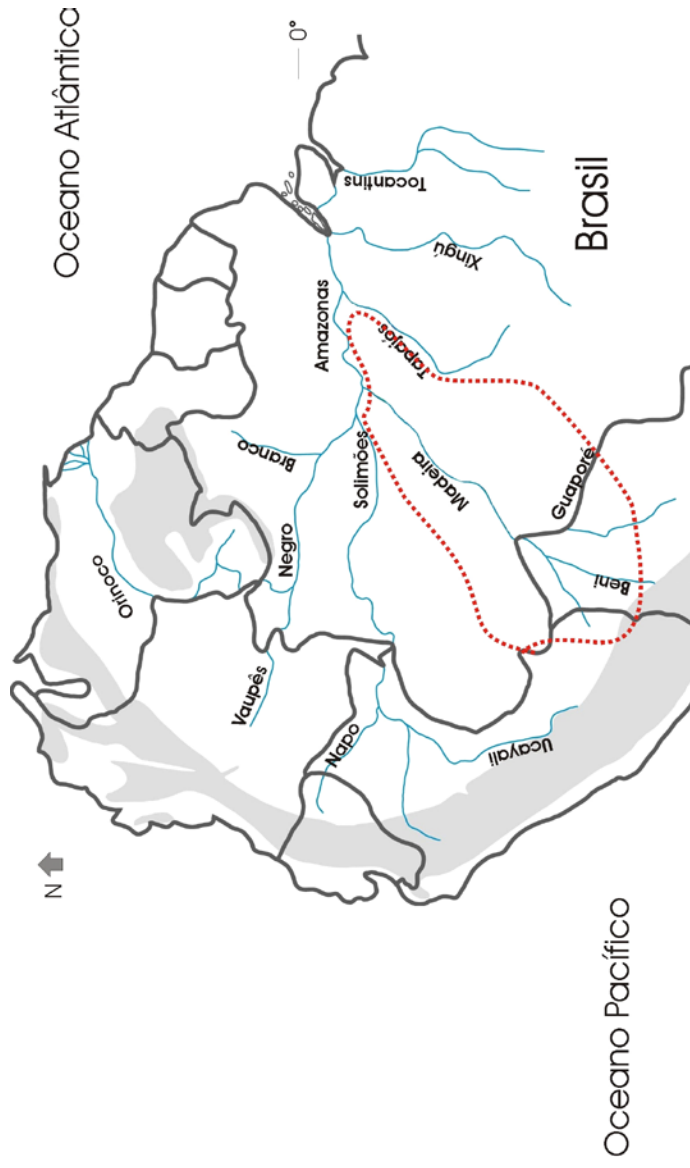


Figura 4. Localização do rio Madeira na bacia Amazônica (área demarcada). Nesse mapa estão representados os principais rios. A cor cinza representa as áreas de maior elevação (> 700 m.) (adaptado de Cohn-Haft 2000)



Algumas características do Rio Madeira estão relacionadas a sua complexidade de formação (tributários nos Andes e no Escudo Brasileiro) e sua grande extensão percorrendo cerca de três mil e trezentos quilômetros desde a nascente (em território boliviano) até a foz (no rio Amazonas) (Goulding *et al.* 2003, Py Daniel *et al.* 2005). É um rio de águas barrentas (brancas), mas, os tributários que tiveram origem no escudo Brasileiro apresentam águas claras, incluindo os maiores tributários (Aripuanã e Jiparaná), além de outros rios menores que têm águas negras (Goulding *et al.* 2003, Py Daniel *et al.* 2005).

## **DESENHO AMOSTRAL**

Os pontos de coleta foram, principalmente, em margens opostas do rio Madeira. Na margem esquerda do rio, foi apontada à presença de uma possível população (ainda “sem nome”) de *H. minor* descoberta no trabalho de Cohn-Haft (2000). Para saber que nome poderia ser dado a essa população, um dos pontos de coleta foi na localidade do tipo *H. m. pallens*, Nova Olinda (Figura 5). Somente com os resultados obtidos desses indivíduos de Nova Olinda, poderíamos “nomear” as populações ao oeste do rio Madeira. Além dessa coleta, outros indivíduos foram amostrados nessa mesma margem do rio (Figura 5).

Já na margem à direita do Madeira havia a suspeita que os pequenos interflúvios poderiam estar separando esses pássaros. Essa suspeita foi obtida pelo fato do grupo *H.m.snehlagea* não ser monofilético e por dois dos seus antigos integrantes (indivíduos 9 e 10, Figura 3) ficarem separados dos demais (indivíduos 4-8, Figura 3), provavelmente pela

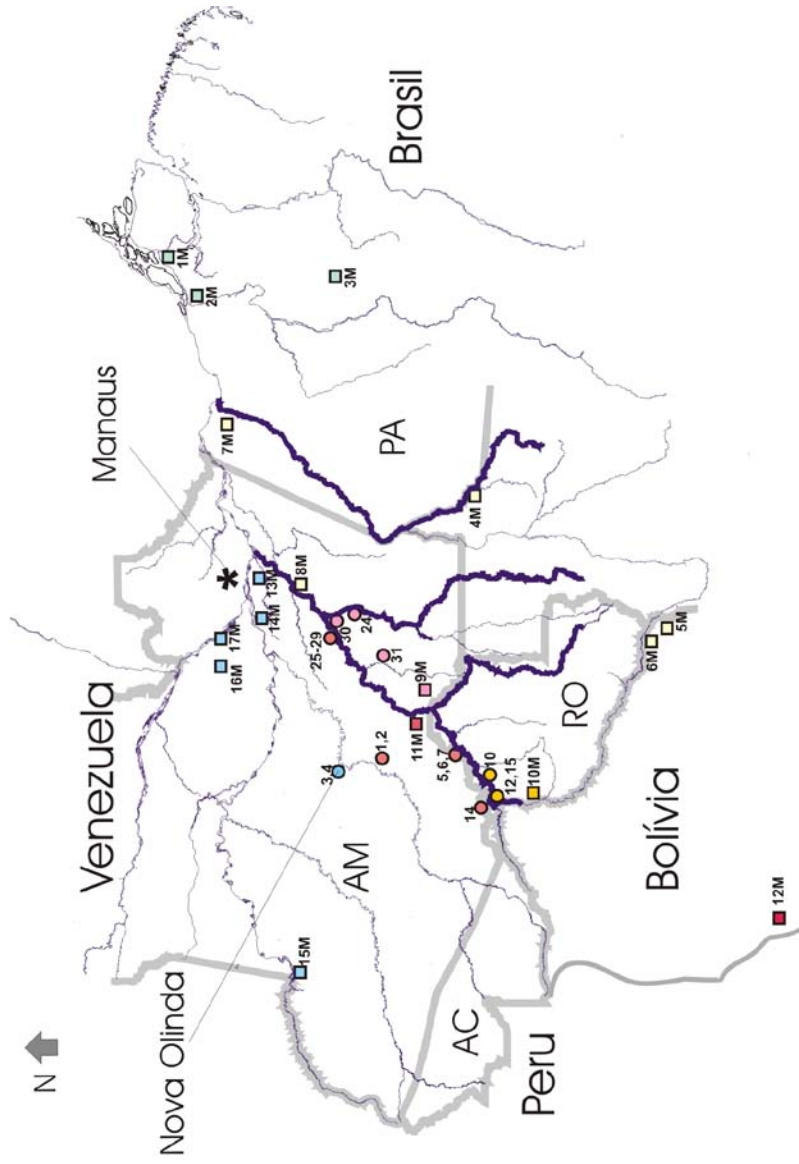


Figura 5. Pontos de coleta de *Hemitriccus minor*. No total foram incluídos 36 indivíduos sendo 19 coletados nesse estudo (círculos) e 17 no trabalho de Cohn-Haft (2000) (quadrados e números que estão com a letra M). As cores representam os grupos identificados nos resultados

influência dos pequenos rios. Esse dado nos levou a amostrar mais intensivamente os locais próximos às coletas dos indivíduos nove e dez (Figura 5).

No total, foram analisados geneticamente, trinta e seis indivíduos sendo dezenove coletados durante esse estudo e dezesseis já coletados e seqüenciados no trabalho anterior de Cohn-Haft (2000). Três desses últimos indivíduos foram coletados no interflúvio Xingu-Tocantins onde se situa a localidade do tipo *H. m. minor* (Figura 5) e um indivíduo corresponde a *H. spodiops* coletado na Bolívia. Foram utilizadas como grupo externo seqüências de *H. zosterops griseipectus* e *H. minimus* (Cohn-Haft 2000) por serem espécies mais próximas a *H. minor* e por terem seqüências de DNA mitocondrial já obtidas.

#### **COLETA DOS INDIVÍDUOS**

Os pássaros foram detectados por seu canto que foi gravado e utilizado para atrair os indivíduos. A gravação do som foi feita usando um gravador Sony TCM -5000 com microfone direcional Sennheiser ME-66 acoplado, gravando em fita cassete Maxell Studio Tape MS-60 min. Esses dados serão analisados em posteriores pesquisas de bioacústica. As coletas foram realizadas a tiro de espingarda por Cohn-Haft e apenas um indivíduo foi coletado em rede. As autorizações para o uso de arma de fogo e para as coletas foram concedidas pela Polícia Federal e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), respectivamente. Os indivíduos foram preparados como pele para a Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

sendo anotados alguns dados; por exemplo: a coloração das partes nuas, o peso, as características sexuais, presença e ausência de mudas; para possíveis pesquisas morfológicas.

O tecido (músculo, coração e fígado) foi retirado sendo mantido em nitrogênio líquido (-200°C). Os procedimentos moleculares foram feitos no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.

#### **PROCEDIMENTOS PARA AS ANÁLISES MOLECULARES**

A extração do DNA dos indivíduos de *H. minor* foi realizada a partir de tecido muscular (0,2g aproximadamente) seguindo dois protocolos: um utilizando sal, cloreto de sódio (NaCl) (Bruford *et. al.*1998) e outro via fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.* 2000). A extração via sal, usada nos primeiros sete indivíduos, apresentou degradação do DNA. Apesar de conseguir usar os produtos dessa extração, resolvi adotar o segundo método para as demais amostras, pois seus produtos foram mais facilmente amplificados e seqüenciados.

Após cada etapa (extração, amplificação e purificação, ver a seguir) foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,8% correndo por 40 minutos a 70W e 350mA. O gel foi corado com Brometo de Etídio para visualização do DNA em transluminador de luz UV (Eagle Eye). Foi usado um marcador de peso molecular conhecido (50ng; 500-1100pb) para que pudessem ser quantificados os produtos de cada reação.

O gene mitocondrial citocromo b (cyt b) foi utilizado para detectar a variação genética de *H. minor*. Há algumas vantagens no uso dos genes mitocondriais, como por exemplo, à alta taxa evolutiva da maioria dos genes que é de 5 a 10 vezes maior do que em genes nucleares (Futuyma 1997, Li 1997, Li & Graur, 1991), também são de fácil manipulação, de origem materna, são haplóides, não apresentam recombinação, há várias cópias do DNA mitocondrial por células (Wolstenholme 1992, Avise 2000). O gene cyt b tem sido muito utilizado em estudos com aves amazônicas e em tiranídeos (Cicero & Johnson 2001; Aleixo 2002; Marks *et al.* 2002; Bates *et al.* 1999, 2004), mas, o objetivo principal de usar esse marcador foi para possibilitar comparações com as seqüências obtidas no trabalho de Cohn-Haft (2000), aproveitando os iniciadores (*primers*) já desenvolvidos para o gênero.

A amplificação do DNA foi realizada através da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). O gene mitocondrial Citocromo b (cyt b) contém 1026 pares de bases (pb) e fica posicionado no genoma mitocondrial entre os genes ND5 (NADH desidrogenase de subunidade 5) e o tRNA<sup>THR</sup> (RNA transportador da treonina) encontrado na região final 3' do cyt b. Nesse estudo foram utilizados os *primers*: **L15383** 5' - CCA AAC ACT CGT AGA ATG - 3' (Cohn-Haft 2000), **H16064** 5' - AAG TGG TAA GTC TTC AGT CTT TGG TTT ACA AGA CC - 3' (Harshman 1996) levando a amplificação de uma parte do cyt b (Figura 6). Em todas as reações foi adicionado um controle negativo e as possíveis contaminações foram excluídas. A temperatura de anelamento foi de 53° C.

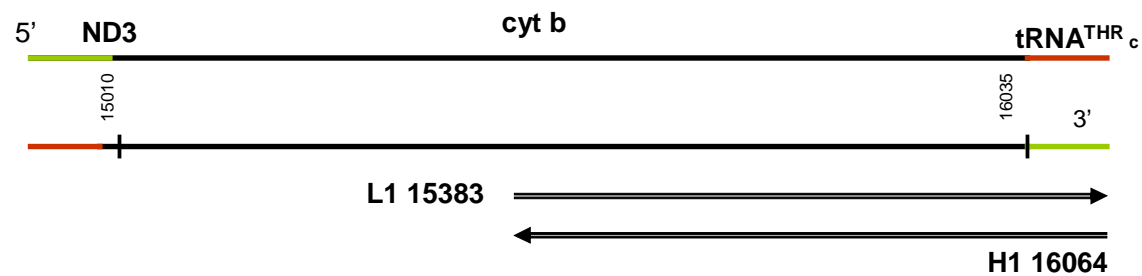


Figura 6. Local de anelamento dos *primers*. Os números dos *primers* L1 (fita leve) e H1 (fita pesada) indicam a posição dos nucleotídeos baseados no DNA mitocondrial de *Gallus gallus* (Desjardins & Morais 1990). As setas indicam o sentido da reação de amplificação.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados a partir de um protocolo que utiliza PEG 8000 (Polietileno Glicol) (Sambrook *et al*, 2000) (Anexo 1).

O seqüenciamento do gene *cty b* foi feito por meio do método da terminação de cadeia (Sanger *et al*. 1977) utilizando nucleotídeos terminadores marcados por fluorescência (DyEnamic ET Dye Termination – Amersham Biosciences). Os produtos da reação de seqüenciamento foram precipitados com acetato de amônio e álcool e ressuspendido em formamida (Loading buffer) para serem resolvidos e visualizados pela eletroforese de capilar no seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).

#### **EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE MTDNA**

As seqüências de *cyt b* foram visualizadas e editadas utilizando o programa Bioedit (Hall 1999). As pequenas seqüências iniciais e as regiões finais dos *primers* foram excluídas e o fragmento de DNA de todos os indivíduos tiveram o mesmo tamanho, com 642 pares de bases incluindo, no final do gene, o códon de parada. As duas fitas de DNA mitocondrial L (leve) e H (pesada) foram seqüenciadas. Primeiro foi feito o alinhamento de todos os fragmentos obtidos com o *primer* L1 e o mesmo procedimento foi realizado, separadamente, com as seqüências obtidas a partir do *primer* H1.

O alinhamento consiste na hipótese de homologia entre a posição de bases nitrogenadas de dois ou mais táxons (Schneider 2003). Esse procedimento foi realizado no programa Clustal X (Thompson 1994) inserido no programa Bioedit (Hall 1999). As

seqüências obtidas foram alinhadas e editadas sempre comparando com as seqüências do trabalho anterior de Cohn-Haft (2000). Para garantir a confiabilidade da leitura, às ambigüidades geradas pelo alinhamento entre as fitas de mtDNA L e o reverso complemento da fita H de um mesmo indivíduo, foram conferidas uma a uma verificando o eletroferograma visualizado no programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au>). Também foi observado se havia ocorrência de pseudogenes.

Os pseudogenes são cópias duplicadas de DNA que perderam a função (Page & Holmes 1998). Essas seqüências de DNA possuem taxa evolutiva diferente dos genes funcionais e se forem inseridos nas análises podem estimar erroneamente as divergências genéticas e distorcer a reconstrução da filogenia (Sorenson and Fleischer 1996, Quinn 1997). Desta forma, algumas características das seqüências foram analisadas como: a presença de códon de parada no meio ou início, inserções e deleções de bases nitrogenadas formando *gaps*, não sobreposição entre as seqüências L e H de um mesmo indivíduo, número de transversão maior que número de transição (Bates *et al.* 1999, Aleixo 2002). Nenhuma dessas características foi observada nas seqüências obtidas, o que indica que não houve o seqüenciamento de pseudogenes.

## **DISTÂNCIA GEOGRÁFICA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA**

A correlação entre distância genética e geográfica foi realizada pela análise de clados inseridos (Nested Clade) (Templeton & Sing 1993; Templeton 1998, 2001, 2004). Nessa análise não há uma hipótese *a priori* sobre a estrutura populacional.



Primeiro, foi construída uma árvore de haplótipos (seqüências de DNA diferenciadas por uma ou mais bases nitrogenadas) no programa TCS 1.18 (Clement *et al.* 2000) que se baseou no método da parcimônia (menor números mudanças evolutivas, Page & Holmes 1998). Os haplótipos foram agrupados em série de clados vizinhos (Templeton & Sing 1993) unindo em uma única árvore as três subespécies reconhecidas (Templeton *et al.* 1992) *H. m. snethlageae* (margem direita do rio Madeira), *H. m. pallens* e *H. minor* “sem nome” (margem esquerda do rio), usando cem passos para a parcimônia.

Após unir os clados vizinhos foi feita uma matriz correlacionando à distância (obtidas pelas coordenadas geográficas dos pontos de coleta) e os clados formados (Anexo 2). Somente os clados que possuíam variação geográfica foram analisados no programa GeoDis 2.2 (Posada *et al.* 2000) com dez mil permutações. Os valores de  $p < 0,05$  obtidos pela análise de contingência realizada pelo programa Geodis foram verificados pela chave de inferência de Templeton (2004) que examinou o padrão geográfico existente na variação genética. Para poder seguir a chave de inferência, mais três índices foram verificados: “Dc”, que é obtido pela distância de um clado em relação ao centro geográfico de todos os haplótipos inseridos nesse mesmo clado; “Dn”, que é calculado a partir da distância entre os clados vizinhos; “I-T” que correlaciona a posição dos haplótipos (se eles são internos ou externos na árvore haplotípica). A partir dos valores obtidos para esses índices foi verificada a possível origem da variação genética encontrada e determinado o evento que teria provocado essa diferenciação.

## ANÁLISES POPULACIONAIS

As análises populacionais foram realizadas no programa ARLEQUIN (Schneider *et al.* 2000) verificando o número de haplótipos, a diversidade haplótipica e a diversidade nucleotídica. Foi feita a análise da Variância Molecular (AMOVA) para verificar a subdivisão populacional. Essa análise permite o reconhecimento dos níveis de diferenciação genética dentro e entre populações a partir de uma hipótese já estabelecida (Exoffier *et al.* 1992). No meu estudo, a hipótese era que havia três populações diferenciadas (baseadas na filogenia e na análise filogeográfica de Nested Clade, ver resultados) em uma única área geográfica. Então, a matriz de dados foi organizada da seguinte forma: população de *H. minor* “sem nome” representada pelas seqüências dos indivíduos da margem esquerda do rio Madeira (11M, 1, 2, 5, 6, 7, 14, 25- 29; M = seqüências obtidas no trabalho de Cohn-Haft 2000); população de *H. m. snethlageae/minor* representada pelas seqüências dos indivíduos da margem da margem direita do rio (10, 12, 15, 24, 30, 31, 05M, 06M, 07M, 08M, 09M, 10M, 1M, 2M, 3M); população *H. m. pallens* representada pelas seqüências dos indivíduos típicos de igapó (13M, 14M, 15M, 16M, 17M, 03, 04) (Figura 5). O resultado da análise da AMOVA foi verificado pelo índice de fixação *F<sub>st</sub>* (Wright 1931) para 1023 permutações.

## ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os sítios informativos das seqüências de DNA foram analisados no PAUP\* 4.0 (Swofford 1998). Foram realizadas três análises: 1- distância “p” não corrida (se baseia nas similaridades entre as bases nitrogenadas). 2- Máxima parcimônia (com o mesmo peso para

transição e transversão). 3- Máxima verossimilhança. Tanto na Máxima Parcimônia quanto na Máxima Verossimilhança foram feitas buscas heurísticas com 100 réplicas aleatórias. A corroboração para os ramos da árvore de Parcimônia foi inferida pelo índice de *bootstrap* com 500 réplicas em cada nó (Swofford *et al.* 1996).

Para a análise de Máxima Verossimilhança foi utilizando o modelo de parâmetros determinado pelo programa de computador Modeltest (Posada & Crandall 1998). O modelo evolutivo mais apropriado com os meus dados foi o “HKY85+G” (Hasegawa *et al.* 1985) com os seguintes parâmetros: Ti/tv ratio= 12.2607; frequências nucleotídicas A=0.2694, C=0.3648, G=0.1001, T=0.2657; distribuição do parâmetro gama = 0.1345). Esse modelo é escolhido de acordo com a heterogeneidade das diferentes taxas de substituição nucleotídica ao longo dos sítios (Schneider 2003).

## RESULTADOS

Foram analisados 642 pares de base de cada um dos 36 indivíduos de *H. minor* e de mais dois indivíduos *H. zosterops griseipectus* e *H. minimus*, que foram incluídos como grupo externo. Desses 642 caracteres analisados, 505 foram constantes, 59 sítios não foram informativos e 78 sítios foram informativos para a Parcimônia. Não houve transversões e nem saturação de bases indicando um sinal filogenético apropriado para as análises. As seqüências completas serão depositadas no GenBank.

## DISTÂNCIA GEOGRÁFICA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA

A distância geográfica não interferiu diretamente na divergência genética dessas populações. Pela árvore de haplótipos obtida com 95% de parcimônia sem definir o número de passos, as populações ficaram separadas formando três grupos distintos: população da margem esquerda do rio Madeira (ME), população da margem direita (MD) e *H. m. pallens* (Figura 7). Esses grupos foram unidos de forma hierárquica para realizar a análise filogeográfica de clados inseridos (Nested clade). O clado que agrupou a todos os haplótipos da população da margem esquerda do rio Madeira (população “sem nome”) mais os haplótipos de margem direita (Clado 4, ver Figura 7) não foi significativo pela análise de contigência ( $p=0,22$ ). O resultado significativo para esse teste ( $\chi^2=59.53$  e  $p=0,011$ ) foi obtido no clado que agrupou as três populações (Clado 5, Figura 7). Analisando a chave de Templeton (2004) para esse clado, o padrão geográfico detectado na variação genética dos haplótipos foi consistente com a fragmentação alopátrica, ou seja, um evento vicariante teria impedido o fluxo gênico entre *H. m. pallens*, *H. m. spp* “sem nome” e *H. minor* da margem direita (Templeton 1998). Esse dado foi obtido seguindo a série de inferência (2-3-4-9-NO) da chave de Templeton verificando os índices de  $D_c$ ,  $D_n$  e I-T (Templeton 2004). Esse resultado foi consistente com a hipótese do rio Madeira delimitar a distribuição dos pássaros entre as margens direita e esquerda.

Em relação à localidade do tipo *H. m. pallens*, Nova Olinda (Figura 5), na margem esquerda ocorre *H. m. pallens* (indivíduos 3 e 4) e na margem direita ocorre à população de

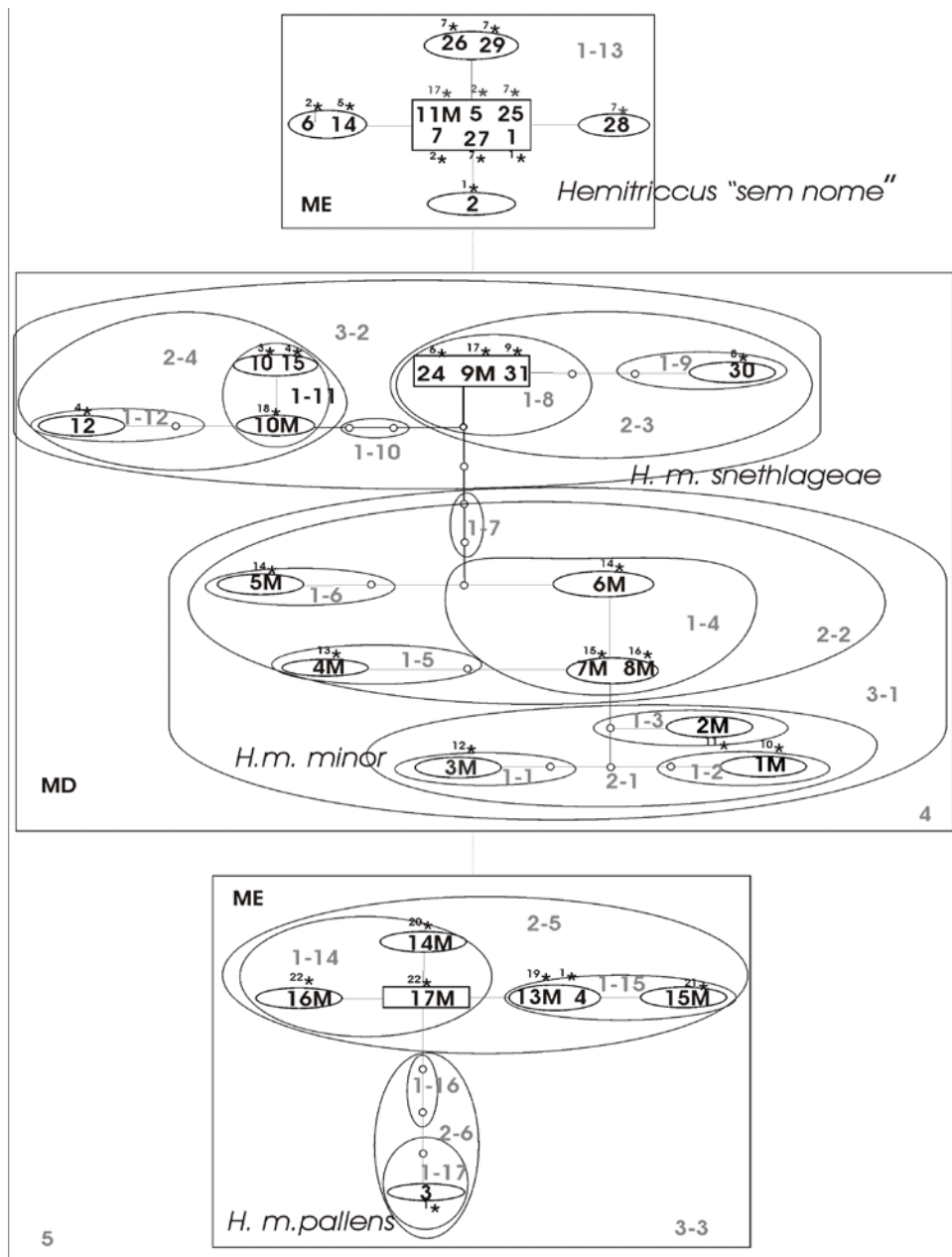


Figura 7. Árvore de haplótipos. Os números sem asterisco(\*) representam os haplótipos distribuídos nas populações (ver figura 5). Os números com asterisco representam as localidades (Anexo 2). Os níveis hierárquicos estão representados por círculos. Os círculos menores são os haplótipos que ainda não foram amostrados, ou foram extintos da população

*H. minor* spp “sem nome” (indivíduos 1, 2). No entanto, *H. m. pallens* vai mais além, ultrapassando o Purus, afluente da margem direita do rio Solimões e seu limite de distribuição ainda deve ser analisado (Figura 5).

## ANÁLISES POPULACIONAIS

Nenhum haplótipo foi compartilhado entre as três possíveis populações (margem esquerda do rio Madeira, margem direita do rio e *H. m. pallens*), como observado também pela árvore haplotípica (ver Figura 7). O haplótipo que teve maior frequência (0,5) pertence à população da margem esquerda do rio Madeira (haplótipo 11M), que é a população “sem nome”. Foram encontrados cinco haplótipos dentro de um total de amostragem de doze indivíduos na região. A diversidade haplotípica foi de 0,77 e a diversidade nucleodídica foi baixa de 0,0012 dentro dessa população da margem esquerda. Já na margem direita do rio foram encontrados dezesseis haplótipos com frequência que variou de 0,0625-0,188 ocorrendo, praticamente um haplótipo em cada ponto de coleta, num número total de dezesseis indivíduos amostrados. A diversidade genética foi 1 e a diversidade nucleotídica foi de 0,0064.

Para a população referente a *H. m. pallens*, foram amostrados sete indivíduos e foram encontrados seis haplótipos diferenciados com frequência de 0,143 e 0,286. Essa população apresentou diversidade genética praticamente igual a 1 e diversidade nucleotídica 0,037. A baixa diversidade nucleotídica encontrada nas três populações pode estar relacionada ao gene de estudo (cyt b) devido à taxa evolutiva.

Portanto, a população da margem esquerda do rio Madeira (população “sem nome”) apresentou a menor frequência haplotípica, menor frequência nucleotídica e menor diversidade genética, desta forma, pode ser considerado que essa população tem pouca variabilidade genética.

Os resultados da AMOVA indicaram que dentro de cada população a porcentagem de variação molecular foi de 15,36% e entre as populações essa porcentagem foi de 86,64%. O valor do índice de fixação  $F_{st}$  foi de 0,85 e o valor de  $p =$  zero, foi altamente significativo confirmando a hipótese de três grupos bem estruturados geneticamente ocorrendo em uma mesma área geográfica.

## **ANÁLISES FILOGENÉTICAS**

### **MÉTODO DA DISTÂNCIA**

Pela análise da distância genética (distância “p” não corrigida), pode ser observada uma alta divergência genética entre *H. m. pallens* e *H. spodiops* em relação aos outros *Hemitriccus minor*. Essa divergência variou de 5,76 a 7,48% entre *H. m. pallens* e *H. m. snethlageae* (incluindo todas as formas do interflúvio Madeira-Tapajós); de 9,66 a 10,3% entre *H. m. pallens* e *H. m. minor*; de 6,23 a 7,0% entre *H. m. pallens* e população “sem nome” e de 6,54 a 6,85% entre *H.m. pallens* e *H. spodiops* (Tabela I). Os indivíduos do grupo coletado no alto Madeira apresentaram menor divergência entre si (0,0-0,16). A

Tabela I. Distância p não corrigida (x100). Os números indicam a porcentagem de divergência genética comparada dentro e entre cada grupo constituído na análise de parcimônia (Figura 8) (os índices são os menores e maiores valores encontrados entre os indivíduos de cada subpopulação. Ver Figura 5).

	ME1*	<i>pallens</i> *	MD1*	MD2*	MD3*	MD4*	<i>spodiops</i>	<i>zost. gris.</i>	<i>minimus</i>
ME1*	0,0-0,31								
<i>pallens</i> *	6,23-7,0	0,16-0,93							
MD1*	1,87-2,03	6,36-7,32	0,0-0,16						
MD2*	1,7-2,34	6,24-7,48	0,47-1,25	0,0-0,47					
MD3*	1,71-2,34	5,76-6,39	1,25-2,03	1,09-2,02	0,16-1,09				
MD4*	1,87-2,34	9,66-10,3	1,4-2,18	1,4-2,18	0,47-1,87	0,62			
<i>spodiops</i>	6,85-7,01	6,54-6,85	7,32-7,48	6,71-7,01	6,7-6,85	6,70			
<i>zost. gris.</i>	9,66-9,87	10,28-10,44	10,28-10,44	10,12-10,59	9,81-10,12	9,66-9,97	11,62		
<i>minimus</i>	10,44-10,75	9,5-10,3	10,28-10,59	10,9-10,46	10,28-10,44	10,44-10,75	9,81	11,21	

Obs: as cores dos asteriscos representam a localização geográfica (ver Figura 5). ME1 (margem esquerda do Madeira, população não nomeada); MD1 (margem direita, população do alto rio Madeira); MD2 (margem direita, população do médio Rio Madeira); MD3 (margem direita, população amplamente distribuída); MD4 (*H. m. minor* do interflúvio Xingu-Tocantins); *H. spodiops* do Andes e o grupo externo: *H. zosterops griseipectus* e *H. minimus*.



população que inclui indivíduos da Bolívia até o Pará (Figura 5) foi à população que teve maior variação de divergência genética entre si (0,16-1,09%). Em geral, *H. m. snethlageae*/*H. m. minor* e a população “sem nome” apresentaram divergência que variou de 1,04% a 2,34% e o menor índice encontrado foi entre os pássaros do médio e o alto Madeira, na margem direita. O grupo externo apresentou uma divergência de 9,5 a 10,75% em relação ao complexo *Hemitriccus minor* /*H. m. pallens* e 11,21% entre si.

### MÁXIMA PARCIMÔNIA

A análise de Máxima Parcimônia resultou em uma única árvore mais parcimoniosa com comprimento L=197, índice de consistência CI=0,731 (representa a quantidade de homoplasias relativas ao número de passos da árvore filogenética, Schneider 2003) e índice de consistência deslocado RC=0,648 (ajusta o índice de consistência que pode ser superestimado devido as autapomorfias) (Figura 8).

*Hemitriccus minor* não formou um grupo monofilético. *H. m. pallens* é o grupo irmão de *H. spodiops*, e os dois táxons juntos formam o grupo irmão de todas as outras formas de *H. minor*. Dentre esses outros táxons o grupo de *H. m. senetageae*/*H. m. minor* (margem direita do rio Madeira) ficou sendo grupo irmão de todas as formas de *H. minor* da margem esquerda (população “sem nome”). Já os indivíduos de margem direita, por sua vez, ficaram sub-divididos: *H. minor* do alto Madeira formou um grupo monofilético irmão de *H. minor* do médio Madeira, juntos esses dois grupos formaram grupo irmão de *H. minor* da Bolívia, Mato Grosso, Borba (Amazonas) e Pará, ou seja, indivíduos amplamente

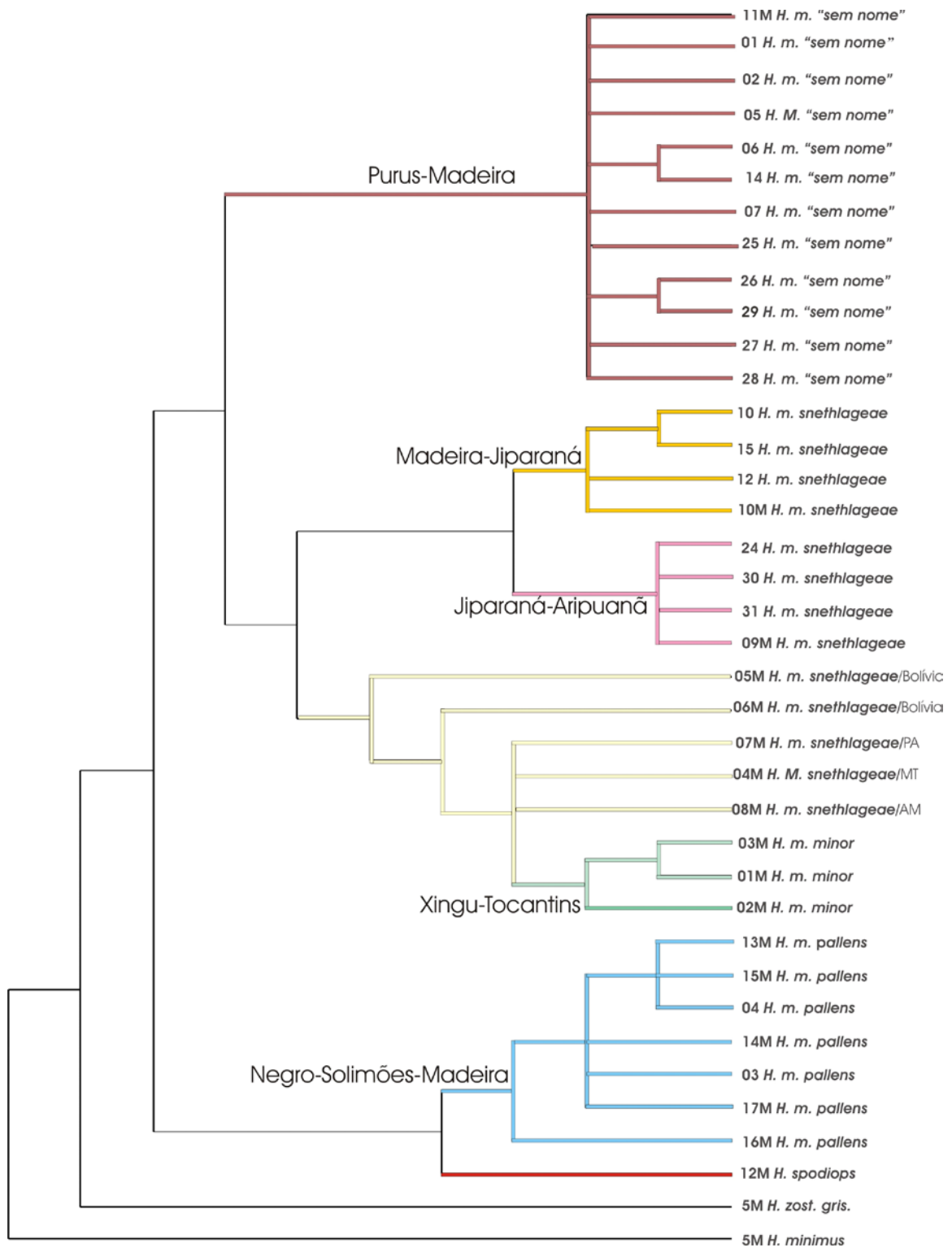


Figura 8. Única árvore mais parcimoniosa com peso igual para transição e transversão. Busca heurística com 100 réplicas. (L=197), (CI=0,731) e (RC=0,648). Os números são referentes às localidades onde foram coletados os indivíduos e as cores são referentes à distribuição (ver Figura 5).

distribuídos. Dentro desse grupo de ampla distribuição, também houve a formação de um grupo monofilético formado pelos *H. m. minor* do interflúvio Xingu-Tocantins.

O monofiletismo dos três grandes clados no complexo *H. minor* (*H. m pallens*, *H. spodiops* e os outros) receberam 100% de suporte na análise de *bootstrap*, e o clado formado pela população sem nome, à esquerda do Madeira, recebeu 99% de suporte (Figura 9).

#### **MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA**

Pela análise de Máxima Verossimilhança apenas uma árvore foi retida. A topologia encontrada com a análise de máxima verossimilhança foi praticamente idêntica à topologia obtida pela Máxima Parcimônia. A diferença foi relacionada à posição do indivíduo 5M (*H. m. snethlageae*) localizado na Bolívia saiu como irmão dos *H. minor* (sem *H. m. pallens*) e ficou mais distante filogeneticamente do indivíduo 6M, também coletado na Bolívia (Figura 10). Isso difere também dos resultados de Cohn-Haft (2000) desses mesmos indivíduos e sugere necessidade de mais trabalho neste grupo.

#### **DISCUSSÃO**

Como os meus objetivos foram correlacionar distância geográfica e divergência genética, observar se há populações diferenciadas nos pequenos rios dentro do interflúvio Madeira-Tapajós e verificar qual das duas populações ao oeste do rio Madeira representa o

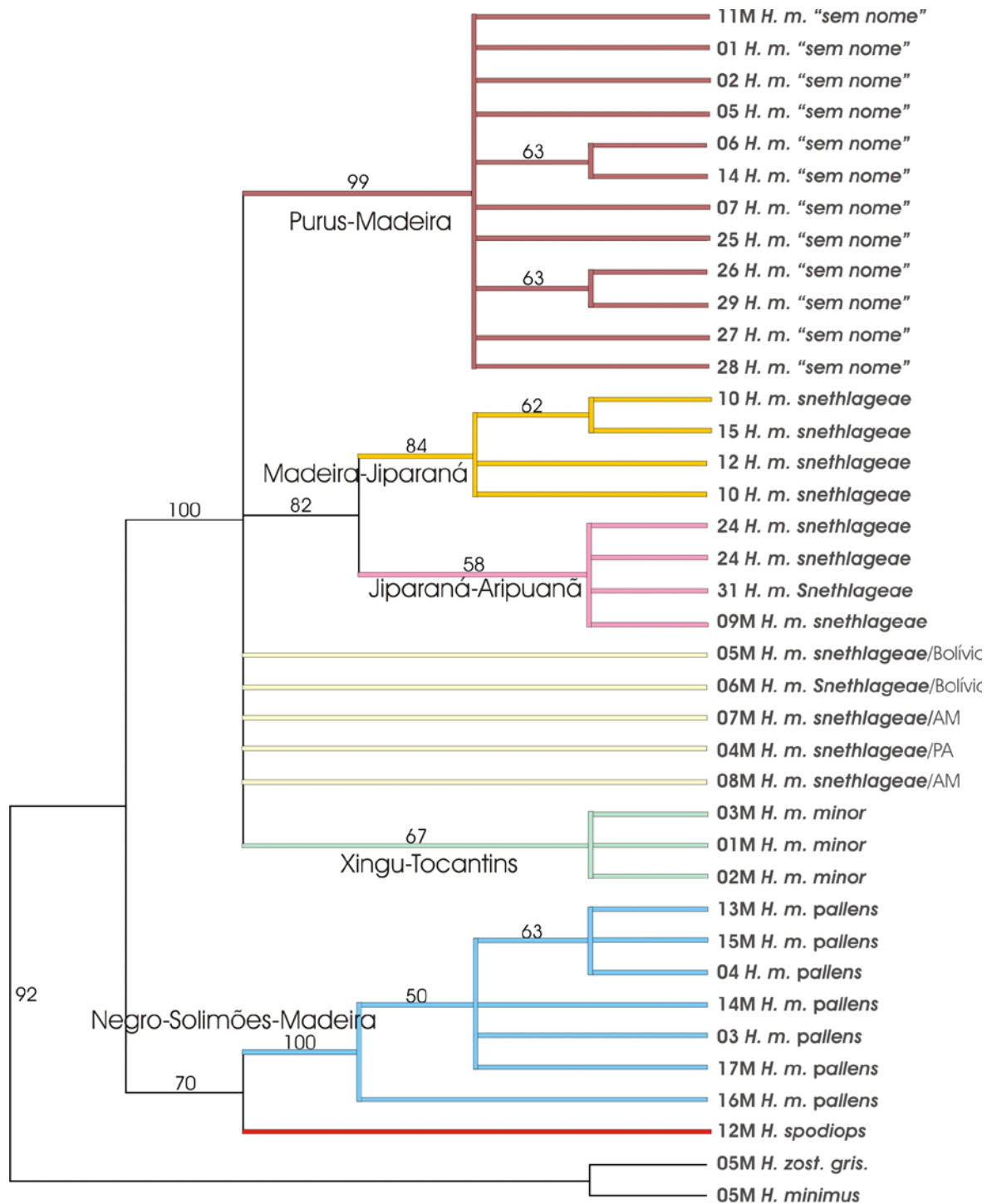


Figura 9. *Bootstrap* da máxima parcimônia com 500 réplicas. Os números à frente do nome de cada espécie representam as localidades dos indivíduos coletados e as cores representam a distribuição (ver figura 5).

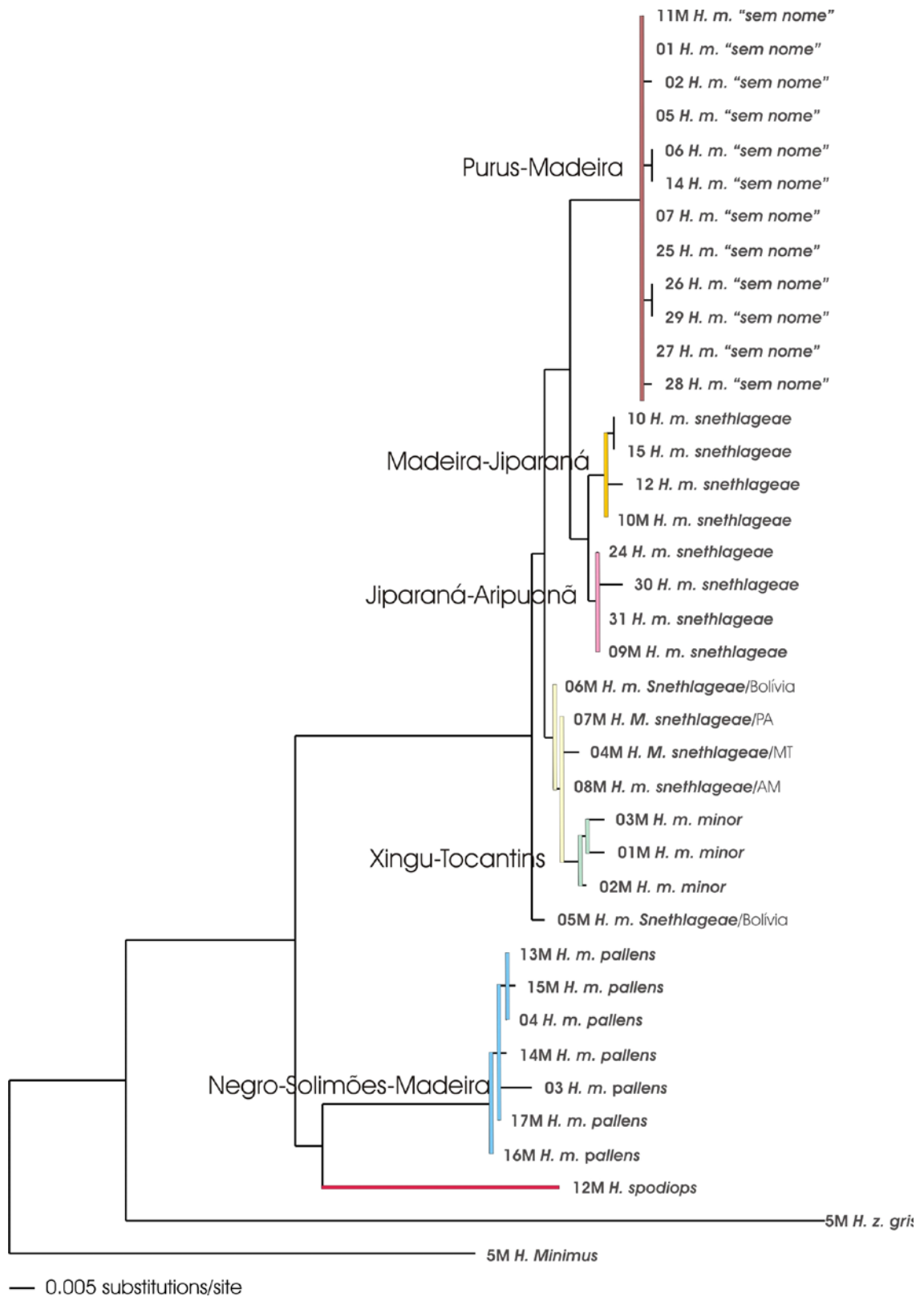


Figura 10. Única árvore obtida pela análise de máxima verossimilhança (modelo evolutivo=HKY85+G). Os Números e as cores são referentes aos locais de coleta (ver Figura 5).

táxon *H. m. pallens*, dividi minha discussão nesses três tópicos, respectivamente. Na parte final da discussão será descrito o padrão de distribuição geográfica encontrado para *H. minor* na Bacia do rio Madeira.

### **CORRELAÇÃO ENTRE DIVERGÊNCIA GENÉTICA E DISTÂNCIA GEOGRÁFICA**

A distância geográfica não esteve diretamente correlacionada com a divergência genética. Em todas as análises, a diferença entre populações de margens opostas do rio Madeira para o complexo de espécies *Hemitriccus minor* foi confirmada (ver Figuras 5, 6 e 7). Esse dado corresponde à fragmentação alopátrica obtida pela análise filogeográfica de clados inseridos (Nested Clade), sugerindo que um evento de vicariância teria sido responsável pela divergência genética encontrada no meu trabalho (Templeton 1998).

Diferenciação em *H. minor* no Madeira já havia sido caracterizada por Traylor (1979) que reconheceu duas subespécies em margens opostas: *H. m. snethlageae* e *H. m. pallens*. Cohn-Haft (2000) também encontrou essa diferenciação em margens opostas, mas descobriu uma nova população de *H. minor* ainda “sem nome” na margem esquerda do rio (ver o terceiro item da discussão). O fato é que realmente ocorrem táxons diferenciados em margens opostas do Madeira, em locais onde a distância entre as margens é de aproximadamente um quilômetro (observações em campo medidas com GPS). Indivíduos separados pelo rio foram mais divergentes geneticamente do que indivíduos de uma mesma margem (Figura 5, 10 ver também Tabela I). Assim, a distância geográfica não foi responsável pela diferenciação genética encontrada nesses pássaros. Marks e colaboradores (2002), por exemplo, verificaram que a diferença genética entre arapaçus

(*Glyphorynchus spirurus*) em quinhentos quilômetros de floresta de terra firme era de 0,7% e, ao cruzar o rio, a essa diferenciação aumentou para 6%.

A diferença entre margens opostas dos grandes rios da Amazônia já havia sido descrita desde os primeiros naturalistas com base na morfologia das espécies (Wallace 1853, Sick 1967, Willis 1969) e foi critério para a delimitação de áreas de endemismo (Cracraft 1985). Em um primeiro momento, o rio parecia ser o mecanismo responsável pela a separação dos táxons, como Wallace (1853) havia documentado com primatas. Para aves, que têm capacidade de voar, parecia pouco provável um rio delimitar fluxo gênico, mas táxons de aves também se diferenciavam em margens opostas dos grandes rios (Sick 1967; Haffer 1969, Cracraft 1985; Capparella 1988, 1991).

Dados genéticos também confirmaram a delimitação por rios na distribuição de Aves. Um exemplo foi o trabalho de Capparella (1988) que encontrou diferenças, pela análise de isozimas, entre táxons que eram semelhantes morfologicamente. A biodiversidade não revelada pelos dados morfológicos continuava sendo descoberta com as técnicas moleculares utilizando principalmente, seqüenciamento de DNA mitocondrial (Bates 1999; Cohn-Haft 2000; Marks *et al.* 2002; Aleixo 2002, 2004). Alguns desses trabalhos não necessariamente buscavam testar hipóteses evolutivas e já havia vários cenários propostos para a evolução da Amazônia (refúgios pleistocênicos [Haffer 1969], gradientes ecológicos [Endler 1977,1982], arcs tectônicos [Silva e Patton 1993, 1998]; ilhas [Nores 1999]; estocasticidade demográfica [Cohn-Haft 2000]).

Meus resultados puderam comprovar o padrão de distribuição encontrado por Cohn-Haft (2000) para *H. minor*, indicando que um evento vicariante teria provocado a diferença genética encontrada aqui e também apontou para a influência de rios menores na distribuição desses pássaros.

#### **INFLUÊNCIA DOS “MINI-INTERFLÚVIOS” NA DISTRIBUIÇÃO DE *HEMITRICCUS MINOR***

Os dados obtidos com as seqüências de mtDNA de *H. m. snethlageae* parecem indicar um possível padrão de variação geográfica delimitado pelos pequenos rios do interflúvio Madeira-Tapajós. Na margem direita do rio Madeira há pelo menos dois grupos monofiléticos: um grupo foi constituído por indivíduos do alto Rio Madeira, outro por indivíduos do médio rio Madeira e em terceiro grupo, possivelmente monofilético, incluiu os outros indivíduos amplamente distribuídos desde a Bolívia, Mato Grosso, Borba (Amazonas) até o Pará.

A amostragem atual não permitiu a localização exata de distribuição dessas formas diferenciadas. No mínimo, amostras do lado direito do Aripuanã e do lado esquerdo do rio Jiparaná/Machado serão necessárias para comprovar a importância desses rios, como no caso de *H. minor* (Figuras 2 e 5). Entretanto, a presença de pequenas populações diferenciadas no interflúvio Madeira-Tapajós parece clara. A delimitação na distribuição feita dos rios Aripuanã e Jiparaná para primatas (Rosmalen *et al.* 1998, 2002) e para alguns casos de aves (M. Cohn-Haft & B. M. Whitney, com. pess) apontam esses rios como



provável barreira para o fluxo gênico em *H. minor*. Tais dados sugerem a importância dos “mini-interflúvios” para aves e primatas na bacia do rio Madeira.

Um estudo de levantamento faunístico, Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica (PROBIO), tem sido realizado na região obtendo mais informações sobre o possível padrão de distribuição geográfica delimitado por pequenos rios, principalmente no Médio Madeira. Nesse estudo, estão sendo analisados diferentes organismos: insetos, anfíbios, peixes, aves, mamíferos terrestres e aquáticos e também de quelônios e répteis em margens opostas tanto do rio Madeira como do rio Aripuanã. Esses dados serão importantes para confirmar áreas de endemismo menores do que a estabelecida por Cracraft (1985) e assim, assegurar prioridade a essas áreas em programas de conservação.

#### ***HEMITRICCUS MINOR PALLENS***

Como não havia outros indivíduos coletados na localidade-tipo e como foi encontrada uma população de *H. minor*, na mesma margem (esquerda do rio Madeira), não documentada previamente, não poderia ser definido a qual das duas populações se referia o nome *H. m. pallens*. Com os dados genéticos dos indivíduos coletados na localidade do tipo *H. m. pallens* (Nova Olinda) foi verificado que esse nome se refere à população de *Hemitriccus* distribuída ao oeste dos rios Purus e Rio Negro (Figura 5). A população que ocorre entre os rios Madeira e Purus é distinta geneticamente e encontra-se sem um nome. Aparentemente, não há sobreposição geográfica (simpatria) entre essa população e *H. m.*

*pallens*. Além disso, essas duas populações possuem entre si mais de 6% de divergência genética e não possuem nenhum haplótipo em comum.

O alto grau de diferenciação genética de *H. m. pallens* sugere que esse táxon seja considerado espécie plena. Por exemplo, a divergência genética entre as duas pipiras amazônicas, *Ramphocelus carbo* e *R. nigrogularis* foi de 3,4% entre as seqüências de DNA mitocondrial (Hackett 1996). Mas, ao contrário de *H. minor*, essas duas espécies são distintas morfologicamente e além disso, possuem canto e ecologia diferenciados (Hackett 1996).

Aqui, somente os dados moleculares e a distribuição geográfica de *H. m. pallens* foram analisados. Outras características são típicas de *H. m. pallens* por exemplo: eles ocorrem em igapó e possuem canto distinto de *H. minor* (Cohn-Haft 2000). Se for considerar a influência do canto na seleção sexual, esse dado, também é concordante como conceito biológico de espécie (Mayr 1969). Com base nisso, também sugiro que o nível taxonômico de *H. m. pallens* seja elevado para espécie *Hemitriccus pallens*.

Além de *H. m. pallens*, os dados genéticos confirmaram a presença de uma população de *H. minor* “sem nome” na margem esquerda do rio Madeira. Essa população formou um grupo monofilético separado das demais subespécies com variação genética entre si de 0,0 a 0,31%. O maior número de haplótipos semelhantes (6) foi encontrado também dentro dessa população e, segundo Templeton (1993), esse dado determina o haplótipo ancestral. As análises populacionais mostraram uma baixa diversidade genética

dentro dessa população, que é característica de populações com origem mais recente ou que sofreram o efeito de “gargalo de garrafa”. A análise da AMOVA indicou que essas populações estão estruturadas geneticamente. Em todas as análises moleculares *H. m* “sem nome” constituiu um grupo monofilético que sugere seu *status* de espécie, mas acredito que outros caracteres devem ser avaliados para determinar o seu nível taxonômico. Esse táxon é do interior de terra firme e foi encontrado em igapó (três indivíduos foram coletados nesse ambiente durante o estudo: 5, 6, e 7 ver na Figura 5). Aparentemente, a distribuição desses pássaros é no interflúvio Purus-Madeira, no entanto, o limite de distribuição deve ser investigado. O fato de não ocorrer *H. m. pallens* pode ser a causa de encontrar *Hemitriccus* “sem nome” em igapó. Trabalhos de campo de levantamento audiovisual indicaram que a distribuição desse táxon segue até a margem sul do Rio Castanho, afluente do Amazonas (Figura 2) (M. Cohn-Haft com pess).

#### **DESCRIÇÃO DO PADRÃO DE VARIAÇÃO GEOGRÁFICA DE *HEMITRICCUS MINOR***

Um novo padrão de variação geográfica foi confirmado na Bacia do Rio Madeira para o complexo de espécies *H. minor*. Para analisar esse padrão estabeleci um cladograma substituindo a posição dos táxons (na filogenia) pelas áreas onde eles ocorrem (Figura 11). Por esse cladograma na divisão mais antiga do complexo de espécies *minor* ficaram separadas as populações mais ocidentais (áreas 3 a 6) das mais orientais (áreas 1 e 2). Nesse primeiro clado ocorreu a subsequente separação de uma espécie andina (*H. spodiops*) e de uma amazônica (*H. m. pallens*) limitada à floresta de igapó na Amazônia Ocidental.

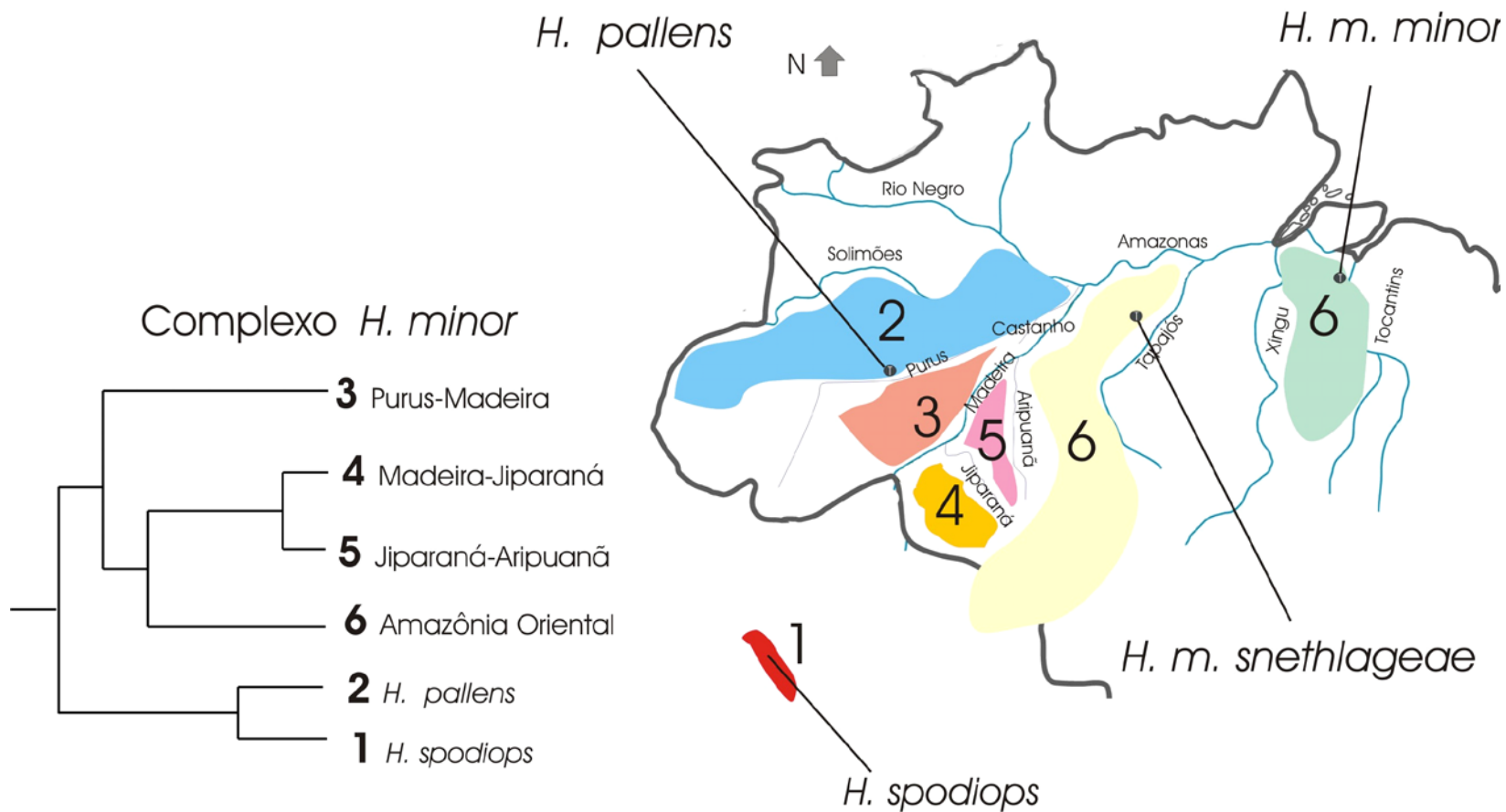


Figura 11. Padrão de distribuição de *Hemitriccus minor* na bacia do rio Madeira e cladograma de área. A filogenia obtida pela árvore de Máxima parcimônia foi substituída pela área onde os táxons estavam distribuídos (ver Figura 8). Os números representam essas áreas. As cores (comparar com Figura 3) representam os padrões de distribuição. T é a localidade tipo.

Então, houve uma segunda disjunção que separou as formas de *H. minor* nas margens direita e esquerda do Madeira (área 3 separada das áreas 4, 5, 6). A próxima disjunção foi entre margens opostas, provavelmente do rio Aripuanã (áreas 4 e 5 separadas da área 6) e a última quebra ocorreu, entre os rios Madeira e Aripuanã, talvez em margens opostas do rio Jiparaná (área 5 separada da área 4) (Figura 11). Marks e colaboradores (2002) encontraram uma disjunção na distribuição de *Glyphorhynchus spirurus* entre nordeste e sudeste da área Rondônia (*sensu* Cracraft 1998) enquanto Bates (1999) encontrou disjunção para *Hypocnemis cantator* entre o leste e oeste dessa mesma área. Esses padrões mostram a complexidade de endemismo para a área delimitada pelos rios Madeira-Tapajós. Estudos com outros táxons serão necessários para avaliar se uma mesma história evolutiva afeta a todos os grupos de forma similar (ver Cohn-Haft 2000).

## CONCLUSÃO

Os mesmos resultados foram obtidos em todas as análises, mostrando pelo menos três populações diferenciadas para *H. minor* na Bacia do rio Madeira. O padrão de variação geográfica é mais complexo do que previamente conhecido e apontou para a influência dos pequenos rios na distribuição desses pássaros, no interflúvio Madeira-Tapajós.

A distância geográfica não determina a diferenciação genética encontrada entre as formas de *H. minor*. A correlação entre divergência genética e geográfica indicou que ocorreu fragmentação alopátrica; o ancestral dos táxons atuais, possivelmente, estava distribuído em uma área maior, sendo dividido por barreiras fisiogeográficas ou climáticas.

Na margem direita do rio Madeira, “mini-interflúvios” delimitaram formas filogeneticamente distintas de *H. m. snethlageae*. Os rios Aripuanã e Jiparaná parecem delimitar a distribuição de três populações de *H. m. snethlageae*. No entanto, para descobrir os limites exatos de distribuição, deve ser feita uma amostragem em margens opostas desses e outros pequenos rios na região, verificando até que ponto eles estão atuando na distribuição dos pássaros. Também, esse padrão deve ser examinado em outras espécies de aves e em outros organismos.

O nome *H. m. pallens* refere-se às formas a oeste dos rios Purus e Negro e pode ser considerado uma espécie plena. Além de *H. pallens*, há uma população de *H. minor* sem nome na margem esquerda do rio Madeira, no interflúvio Madeira-Purus. Então, deve ser feita uma revisão taxonômica para nomear as formas de *H. minor*, estabelecendo também os níveis taxonômicos desses pequenos tiranídeos.

Os estudos genéticos com as aves da Amazônia podem ainda revelar novos padrões de distribuição e devem ser enfatizados em grande escala, assim como análises de bioacústica. Se Aves, que é o grupo melhor estudado, contém táxons *crípticos* e até novos sendo descobertos, imaginem o quanto de biodiversidade, em outros grupos, ainda falta ser reconhecido.

## BIBLIOGRAFIA

- Aleixo, A. 2002. Molecular systematics and the role of the “Varzea” – “Terra-Firme” ecotone in the diversification of *Xiphorynchus* Woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *The Auk*, 119 (3): 621-640.
- Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a “Terra firme” forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 58 (6): 1303-1317.
- Avise, J. C. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9 (3): 686-690.
- Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Birmingham, E.; Lamb, T.; Neigel, I. E.; Reeb, C.A. Saunders; N.C. 1997. Intra-specific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review on Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. Massachusetts. Londres. Inglaterra, 477 p.
- Ayres, J. C.; Clutton-Brock, T. H. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist*, 140: 531-537.

Bates, J. M.; Hackett, S.J.; Cracraft, J. 1998. Area-relationships in the neotropical lowlands: hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *Journal of Biogeography*, 25: 783-793.

Bates, J. M.; Hackett, S. J.; Goerck, J. M. 1999. High levels of mitochondrial DNA differentiation in two lineages of Antbirds (*Drymophila* and *Hypocnemis*). *The Auk*, 116: 1039-1106.

Bates, J. M.; Haffer J.; Grismer, E. 2004. Avian mitochondrial DNA sequence divergence across a headwater stream of the rio Tapajós, a major Amazonian river. *Journal of Ornithology*, 145: 199-205.

Brown, K. S. Jr. 1982. Historical and ecological factors in the biogeography of aposematic neotropical butterflies. *Amer. Zool*, 22: 453-471.

Capparella, A. P. 1988. Genetic variation in neotropical birds: Implications for the speciation process. *Acta Congress International the Ornithology*, 19: 1658-1664.

Capparella, A. P. 1991. Neotropical avian diversity and riverine barriers. *Acta Congress International the Ornithology*, 20: 307-316.



- Cicero, C.; Johnson, N.K. 2001. Higher level phylogeny of new world Vireos (Aves: Vironidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (20) 6: 27-40.
- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1659.
- Cohn-Haft, M. 1996. Why the Yungas Tody-Tyrant (*Hemitriccus spodiops*) is a *Snethlaga*, and why it matters. *The Auk*, 133 (3): 709-714.
- Cohn-Haft, M.; Whittaker, A.; Stouffer, P.C. 1997. A new look at the “*species-poor*” central Amazon: the avifauna north of Manaus, Brazil. *Ornithological Monographs*, 48: 205-235.
- Cohn-Haft, M. 2000. *A case study Amazonian biogeography: vocal and DNA-sequence variation in Hemitriccus flycatchers*. Tese de doutorado, Louisiana State University, Baton Rouge, EUA, 136p.
- Cohn-Haft, M.; Fernandes, A.; Melo, A. V.; Pacheco, A. M.; Sardelli, C.H.; Bechtoldt, C.; Macedo, I.; Naka, L.; Torres, M. 2004. *Diagnóstico temático de avifauna UHEs Salto do Jirau e Santo Antônio. Relatório final de estudos avifaunístico da área do rio Madeira, no trecho Cachoeira de Santo Antônio (Porto Velho) e Jirau (Abunã)*. Manaus, 98p.

- Colinvaux, P. A. 1987. Amazon diversity in light of the paleoecological record. *Quaternary Science Review*, 6: 93-114.
- Colinvaux, P.A.; Oliveira, P.E.; Bush, M.B. 2000. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews*, 19: 141-169.
- Cracraft, J. 1985. Historical biogeography and patterns of differentiation within the south american avifauna: areas of endemism. *Ornithological Monographs*, 36: 49-84.
- Cracraft, J.; Prum, R. O. 1998. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. *Evolution*, 42 (3): 603-620.
- Desjardins, P.; Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology*, 212: 599-634.
- Endler J. A. 1977. *Geographic variation, speciation, and clines*. Columbia University Press. Princeton, New York.
- Endler J. A. 1982. *Pleistocene refuge: fact or fancy? Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press. New York, 641-657.

- Excoffier, L.; Smouse, P.; Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Ferrari S. F.; Iwanaga, S.; Coutinho, P. E. G.; Messias, M. R.; Cruz Neto E. H.; Ramos E. M.; Ramos, P. C. S. 1999. Zoogeography of *Chiropotes albinasus* (Platyrrhini, Aclidae) in southwestern Amazonia. *International Journal of Primatology*, 20 (6): 996-1004.
- Futuyma, D. J. 1997. *Biologia evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto – SP. 2º ed, 631p.
- Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. *The Smithsonian: Atlas of the Amazon*. Smithsonian Institution in association with Oakwood Arts. Hong Kong, 253p.
- Hackett, S. J. 1996. Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 368-382.
- Hall, T. A. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and Analysis program for Windows 95/98/Nt. *Nucleic Acids. Symp Set*, 41: 95-98.
- Hellmayer, E. C. 1910. The birds of the Rio Madeira. *Novitates Zool*, 17: 257-428
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science*, 165 (3889): 131-137.

- Haffer, J. 1997. Alternative Models of Vertebrate Speciation in Amazonia: An Overview. *Biodiversity and Conservation*, 6: 451-476.
- Harshman, J.; Fitzpatrick, W. 1996. *Phylogeny, evolutionary rates, and ducks*. Ph.D. Dissertation, University of Chicago, Chicago.
- Li, W. H. 1987. *Molecular evolution*. Sinaur Associates. Sunderland Massachusetts, 487p.
- Li, W. H.; Grawr. D. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinaur Association Sunderland. Massachusetts, 284 p.
- Lougheed, S. C.; Gascon, C.; Jones, D. A.; Bogart, J. P.; Boag, P. T. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poising frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society of London B*, 266: 1829-1835.
- Marks, B. D.; Hackett, S.J.; Capparella, A. P. 2002. Historical relationship among neotropical lowland forest areas of endemism as determined by mitochondrial DNA sequence variation within the wedge-billed woodcreeper (Aves: Dendrocolaptidae: *Glyphorynchus spirurus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24: 153-167.
- Mayr, E. 1969. *Principles of systematic zoology*. MacGraw-Hill, New York.

Mayr, E. 1977. *Populações, espécies e evolução*. Companhia Editora Nacional, São Paulo SP, 485p.

Nores, M. 1999. An alternative hypothesis of the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*, 26: 275-485.

Page, R. D. M.; Holmes, E. C. 1998. *Molecular evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd, 346p.

Patton, J. L.; Silva, M. N. F.; Malcom, J. R. 1994. Gene genealogy and differentiation among Arboreal Spiny Rats (Rodentia: Echymidae) of the Amazon Basin: a Test of the Reverie Barrier Hypothesis. *Evolution*, 48: 1314-1323.

Posada, D.; Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA Substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

Posada, D.; Crandall, K. A and Templeton, A. R. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haploypes. *Molecular Ecology*, 9: 487-488.

Prum, R. O. 1988. Historical relationships among avian forest areas of endemism in the neotropics. *Acta of the XIX Congresso International Ornithological*, 19: 2562-2572.

Py-Daniel, L. R. 2005. *Inventário faunístico do Médio Madeira*. 1º Relatório Parcial, Manaus, 126p.

Quim, T. W. 1997. *Molecular evolution of the genome Avian molecular evolution and systematics*. Academic Press. San Diego. California, 3-28p.

Ridgely, R. S.; Tudor, G. *The birds of South America*. Vol. 2. University of Texas Press, Austin.

Roosmalen, M. G. V.; Roosmalen, T.V.; Mittermeier, R.A.; Fonseca, G. A. B. 1998. A new and distinctive species of Marmoset (Callitrichidae, Primates) from the lower rio Aripuanã, state of Amazonas, central brasilian Amazonia. *Goeldiana Zoologia*, 22: 1-27.

Roosmalen, M. G. V.; Roosmalen, T.V.; Mittermeier, R.A.; Fonseca, G. A. B. 2000. A taxonomic review of the Titi Monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the description of two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from brasilian Amazonia. 2002. *Neotropical Primates*, 10: 1-52.

Sambrook, J.; MacCallum, P.; Russell, D. 2000. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3 ed. University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas. U.S.A.

- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. 2000. *Arlequin Version 2.000: A software for population genetic data analysis*. Laboratório de Genética e Biometria. Universidade de Geneva, Suíça. <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>.
- Schneider, H. 2003. *Métodos de análise filogenética: um guia prático*. 2 ed. Editora Holos. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto-SP, 114p.
- Sick, H 1967. Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna. *Atas do simpósio sobre a biota amazônica*, 5: 495-520.
- Silva, J. M. C.; Oren, D. C. 1996. Application of the parsimony analysis of endemism in Amazonian biogeography: an example with primates. *Biol. J. Linn. Soc.*, 59: 427-437.
- Silva, M. N. F.; Patton, J. L. 1993. Amazon phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal *Echimyid* rodents (Caviomorpha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2: 243-255.
- Silva, M. N. F.; Patton, J. L. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of mammals. *Molecular Ecology*, 7: 475-486.

- Sorenson, M. D.; Fleischer, R. C. 1996. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93: 15239-15243.
- Swofford, D.L.; Olsen, P.J.; Waddell, P.J.; Hillis D.M. 1996. *Phylogenetic inference. molecular systematic*, 2 ed (D. M. Hillis, C. Moritz and B. K. Mable, Eds.). *Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts*, 407-425p.
- Swofford, D. L.; Olsen, P.J. 1998. PAUP\* Phylogenetic Analyses Using Parsimony Version 4.0. *Sinauer Associates*.
- Templeton, A.R.; Crandall, K. A.; Sing, C. F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic association endonuclease mapping and DNA sequence data. III. *Cladogram estimation. Genetics*, 140: 767-782.
- Templeton, A.R.; Sing, C. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease Mapping. IV. nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics Society of America*, 134: 659-669.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.



- Templeton, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene tree to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10: 779-791.
- Templeton, A. R. 2004. Statistic phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789-809.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. 1994. CLUSTAW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence wait, position – specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Rev*, 22 (22):4673-4680.
- Traylor, M. A., Jr. 1979. *Check-list of birds the word*. Volume 8. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts.
- Vanzolini, P. E.; Williams, E. E. 1970. South American Anoles, the geographic differentiation and evolution of the *Anoles chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae) *Arq. Zool*, 19: 1-124.
- Wallace, A. R. 1853. *A narrative of on the Amazon and Rio Negro*. Reeve, London.
- Willis, E. O. 1969. On the behavior of five species of *Rhegmatorhina*, ant-following antbirds of the Amazon basin. *Wilson Bulletin*, 81: 363-395.

Wolstenholme, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution.

*International Review of Cytology*, 141: 173-216.

Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159.

## ANEXOS

### 1. PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO (PEG-POLIETILENO GLICOL)

Foi adicionado, ao produto de PCR , 25 µl de PEG 8000 (10 g de PEG 20% em 7,3g de NaCl (2,5M) para um volume final de 50 ml) sendo incubado por 30 minutos a 37°

C.

O próximo passo foi uma centrifugação na velocidade máxima durante 20 minutos.

Todo o sobrenadante foi, delicadamente descartado.

125 µl de etanol 80% gelado foi adicionado esperando 1 minuto antes de realizar uma nova centrifugação por 2 minutos.

Mais 125 µl de Etanol 80% gelado foi colocado pela parede do tubo e retirado logo em seguida.

Para evaporar o etanol, os tubos foram colocados na estufa a 70° C durante 10 minutos, aproximadamente.

Foi adicionado, em seguida 10 µl de água miliq e deixado em temperatura ambiente durante à noite. Depois esses produtos foram armazenados no freezer.

Para a reação de seqüência foi adicionado 3,5 µl dessa purificação.

Anexo 2- Lista com os nomes e números dos indivíduos coletados e também locais de coleta. Os números na frente dos nomes dos indivíduos são os mesmos plotados nos mapas e os números na frente das localidades estão com asteriscos na árvore de haplótipos (ver Figura 7)

ESPÉCIE	DNA	TECIDO	COORDENADAS	LOCAL	PREPARADOR
<i>H. minor</i> 1	1	A 97	7° 13' 3,6" S, 64° 10' W	Br: Margem D. Rio Purus, Rio Mucuí, TF *1	Sérgio Borges
<i>H. minor</i> 2	2	A 104	7° 13' 3,6" S, 64° 10' W	Br: Margem D. Rio Purus, Rio Mucuí, TF *1	Sérgio Borges
<i>H. minor pallens</i> 3	3	A 111	7° 13' 3,6" S, 64° 10' W	Br: Margem E. Rio Purus, Nova Olinda, Igapó *1	Sérgio Borges
<i>H. minor pallens</i> 4	4	A 112	7° 13' 3,6" S, 64° 10' W	Br: Margem E. Rio Purus, Nova Olinda, Igapó *1	Sérgio Borges
<i>H. minor</i> 5	5	A 119	8° 49' S, 64° 01' W	Br: Rondônia; Margem E. Madeira; Porto Velho *2	Mario Cohn-Haft
<i>H. minor</i> 6	6	A 120	8° 49' S, 64° 01' W	Br: Rondônia; Margem E. Madeira; Porto Velho *2	Mario Cohn-Haft
<i>H. minor pallens</i> 7	7	A 121	8° 49' S, 64° 01' W	Br: Rondônia; Margem E. Madeira; Porto Velho *2	Mario Cohn-Haft
<i>H. minor pallens</i> 10	10	A 129	9° 36' 35,8"S, 64° 55' 25,4"W	Br: Rondônia; Margem D. Madeira, Mutum Paraná *3	Mario Cohn-Haft
<i>H. minor</i> 12	12	A 184	9° 32' S, 65° 19' W	Br: Rondônia; Margem D. Madeira, Abunã *4	Mario Cohn-Haft
<i>H. minor</i> 14	14	A 196	9° 36' S, 65° 25' W	Br: Rondônia; Margem E. Madeira, Abunã *5	Mario Cohn-Haft
<i>H. minor</i> 15	15	A 206	9° 32' S, 65° 20' W	Br: Rondônia; Margem D. Madeira, Abunã *4	Carla H. Sardelli
<i>H. minor</i> 24	24	A 277	5° 45' S, 60° 15' W	Br: Amazonas; Margem E. Aripuanã, Tucunaré *6	Alexandre Fernandes
<i>H. minor</i> 25	25	A 284	5° 29' S, 60° 49' W	Br: Amazonas; Margem E. Madeira, Cachoeirinha *7	Carla H. Sardelli
<i>H. minor</i> 26	26	A 285	5° 29' S, 60° 49' W	Br: Amazonas; Margem E. Madeira, Cachoeirinha *7	Carla H. Sardelli
<i>H. minor</i> 27	27	A 286	5° 29' S, 60° 49' W	Br: Amazonas; Margem E. Madeira, Cachoeirinha *7	Carla H. Sardelli
<i>H. minor</i> 28	28	A 287	5° 29' S, 60° 49' W	Br: Amazonas; Margem E. Madeira, Cachoeirinha *7	Carla H. Sardelli
<i>H. minor</i> 29	29	A 288	5° 29' S, 60° 49' W	Br: Amazonas; Margem E. Madeira, Cachoeirinha *7	Carla H. Sardelli
<i>H. minor</i> 30	30	A 299	5° 25' S, 60° 42' W	Br: Amazonas; Margem D. Madeira, Itapenima *8	Carla H. Sardelli
<i>H. minor</i> 31	31	A 594	6° S, 60° 42' W	Br: Amazonas; Margem E. Aripuanã, Rio Marmelos*9	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. minor</i> 1M		B-25557	1° 37' S, 50° 22' W	Br: Pará; Ilha do Marajó, Breves *10	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. minor</i> 2M		B-25555	1° 00' S, 52° 00' W	Br: Pará; Caxiuanã *11	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. minor</i> 3M		B-25522	7° 29' S, 52° 30' W	Br: Pará; Carajas *12	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. snethlageae</i> 4M		B-35492	9° 52' S, 56° 07' W	Br: Mato Grosso, Alta Floresta *13	Jason D. Weckstein
<i>H. m. snethlageae</i> 5M		B-14588	17° 00' S 62 00' W	BO: Santa Cruz; Catarata Arco Íris *14	Curtis A. Weckstein
<i>H. m. snethlageae</i> 6M		B-15068	17° 00' S 62 00' W	BO: Santa Cruz; Piso Firme *14	John Bates
<i>H. m. snethlageae</i> 7M		B-25494	2° 15' S 55° 02' W	Br: Pará; Margem D. Tapajós, Maripá *15	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. snethlageae</i> 8M		USNM B03856	4° 22' S, 59° 37' W	Br: Amazonas; Borba *16	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. snethlageae</i> 9M		B-25582	7° 37' S, 63° 07' W	Br: Amazonas; Humaitá *17	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. snethlageae</i> 10M		B-36780	10° 52' S 65° 22' W	Br: Rondônia; Gajará Mirim *18	A. Aleixo
<i>H. m. SW</i> 11M		B-25580	7° 37' S, 63° 07' W	Br: Amazonas; Humaitá *17	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. pallens</i> 13M		B-25520	3° 37' S 59° 07' W	Br: Amazonas; Autazes *19	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. pallens</i> 14M		USNM B03844	3° 26' S 60° 17' W	Br: Amazonas; L. Ljanauacá *20	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. pallens</i> 15M		B-25507	4° 15' S 70° 07' W	Br: Amazonas; Benjamin Contant *21	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. pallens</i> 16M		B-24403	2° 37' S 60° 52' W	Br: Amazonas; Jaú *22	Mario Cohn-Haft
<i>H. m. pallens</i> 17M		B-220248	2° 37' S 60° 52' W	Br: Amazonas; Anavilhanas *22	Mario Cohn-Haft
<i>H. spodiops</i> M		B-22787		BO: La Paz; Cerro Assuta Pata	Mario Cohn-Haft
<i>H. zosterops</i> M		B-25519	3° 37' S 59° 07' W	Br: Amazonas; Autazes	Mario Cohn-Haft
<i>H. mininus</i> M		B-35349	9° 52' S, 56° 07' W	Br: Mato Grosso, Alta Floresta	Jason D. Weckstein