

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS – ZOOLOGIA

**História evolutiva das espécies não-andinas de
Scytalopus inferida através da variabilidade no
DNA mitocondrial**

Autor: Helena Mata

Orientador: Prof. Dr. Sandro Bonatto

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2005

"In the end we will conserve only what we love, we will love only what we understand, we will understand only what we are taught."

Baba Dioum, Senegal

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial às espécies de *Scytalopus* brasileiras, personagens principais deste estudo, por me ensinarem tanto...

Entre as pessoas que contribuíram para a execução deste trabalho, gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Sandro Luís Bonatto, pela competente e paciente orientação; à Dr. Carla Suertegaray Fontana e a toda equipe do Laboratório de Ornitologia do Museu de Ciências e Tecnologia (MCT-PUCRS), especialmente à Márcio Repenning, Cristian Marcelo Joenck, Luciana L. Altafini e André Mendonça-Lima pelo apoio, principalmente nas saídas a campo. Aos colegas do GENOMA, em especial Felipe Grazziotin, Fernanda Brito da Silva, Nelson Fagundes e Cladinara Roberts Sarturi pela ajuda nos trabalhos de bancada e nas análises. À Dra Cristina Miyaki e à Gustavo Cabanne, da USP pelas alíquotas de primers. Aos ornitólogos Marcos Bornschein, Marcelo Ferreira de Vasconcelos e, especialmente à Giovanni Nachtigall Maurício pelas amostras de *Scytalopus* e os ensinamentos de ornitologia. Gostaria de agradecer também a equipe da programação visual do MCT-PUCRS em especial à Wander Eduardo Pereira Costa pela ajuda na confecção do mapa e das *networks*.

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Amostras.....	11
3.2. Extração, amplificação e seqüenciamento de DNA.....	15
3.3. Análises.....	15
3.4. Variabilidade Molecular.....	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Análises Filogenéticas.....	18
4.1.1. ND2.....	18
4.1.2. Região controle, cyt b e segmentos concatenados.....	19
4.2. Relações intraespecíficas nas filogenias.....	29
4.3. Divergência e diversidade nucleotídica.....	29
4.4. Networks.....	34
4.5. <i>Mismatch distributions</i>	38
5. DISCUSSÃO.....	40
5.1. Relações filogenéticas.....	40
5.2. Unidades taxonômicas (delimitação das espécies).....	41
5.3. Diversidade intraespecífica.....	42
5.4. Morfologia e ecologia.....	43
5.5. Diferenciação.....	44
5.6. Implicações para conservação das espécies de <i>Scytalopus</i> brasileiras.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
7. APÊNDICES.....	52

RESUMO

Em decorrência da grande semelhança morfológica e da condição críptica de algumas de suas espécies o gênero *Scytalopus* representa um dos grupos de aves de taxonomia mais difícil. Até o presente, a identificação das espécies vinha sendo obtida basicamente através de sua distribuição geográfica e bioacústica, o que se mostrou pouco efetivo para o conhecimento mais detalhado das espécies e suas relações. Com este estudo pretende-se conhecer as relações filogenéticas das espécies brasileiras de *Scytalopus*, até então indefinidas, e colaborar para o reconhecimento de novas espécies. Foram estudadas as cinco espécies descritas atualmente: *S iraiensis*, *S. novacapitalis*, *S. speluncae*, *S. indigoticus* e *S. psychopompus* e duas espécies novas sendo descritas: *S. sp. nov. 1* da Serra do Espinhaço e *S. sp. nov. 2* do sul do Brasil. Foram analisados os segmentos dos genes mitocondrial ND2, citocromo *b* e da região controle utilizando-se métodos de Distância, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, resultando em uma hipótese filogenética consistente. As espécies de *Scytalopus* brasileiras apresentam-se divididas em dois grandes grupos: (1) *S. indigoticus/psychopompus*; (2) *S. speluncae lato sensu*, compreendendo as espécies *S. speluncae*, *S. iraiensis*, *S. novacapitalis* e as duas espécies novas. *Scytalopus speluncae stricto sensu* mostrou-se subdividida em três clados geograficamente estruturados: (1) ao norte, (2) ao sul da distribuição e (3) um indivíduo amostrado na Serra da Ouricana (BA). Estes clados muito provavelmente representam três diferentes espécies, sendo duas novas (sul e da Serra de Ouricana). Corroborou-se a validade do status específico de *S. psychopompus*, que apresentou divergência genética de 8,4% (ND2) de sua espécie irmã (*S. indigoticus*). A espécie *S. sp. nov. 2*, apresentou-se subdividida em três populações genética e geograficamente diferenciadas, constituindo assim unidades evolutivas distintas. A filogenia e as delimitações de espécies novas propostas neste estudo, são corroboradas por evidências morfológicas e bioacústicas obtidas em campo por especialistas. Além da contribuição para sistemática, os resultados poderão auxiliar diretamente na conservação destas espécies, pois existe um consenso na literatura que uma incorreta taxonomia pode levar a decisões errôneas na conservação. Um exemplo claro disto é o indivíduo de *S. speluncae* da Serra da Ouricana (espécie nova a ser descrita), que pertence a uma população isolada, de local problemático para conservação, com várias outras espécies endêmicas ameaçadas, necessitando de medidas imediatas de conservação.

ABSTRACT

Scytalopus is a taxonomically difficult bird genus due to the low morphological differentiation among the species. Identification and species delimitation have been done basically by geographic distribution and bioacoustic data, but these approaches are not enough to solve these issues as well as have not produced a consistent picture of their phylogeny. Besides, some species of the group are endemic and present conservation issues. This study intended to study the evolution of the Brazilian *Scytalopus*, including phylogeny and species delimitation. We studied all five known Brazilian species (*S iraiensis*, *S. novacapitalis*, *S. speluncae*, *S. indigoticus* and *S. psychopompus*) and two new species: *S. sp. nov. 1* from Serra do Espinhaço and *S. sp. nov. 2* from southern Brazil (both are being described elsewhere). Fragments of the genes ND2 and cytochrome b, and control region of the mitochondrial DNA obtained (approximately 1300 base pairs) were analysed using methods as distance, maximum likelihood, maximum parsimony. Brazilian *Scytalopus* were divided into two clades: (1) *S. indigoticus/S psychopompus*, (2) *S. speluncae*, *S. iraiensis*, *S. novacapitalis* and the two new species. *S. speluncae* was subdivided into three very divergent (about 10% in ND2) clades: (1) *S. speluncae* northern group, (2) *S. speluncae* southern group and (3) the specimen from Serra da Ouricana Mountain, in Bahia State. These latter two clades likely represent two different new species. The taxonomic status of *S. psychopompus* as a valid species was corroborated as it represents a clade of haplotypes with 8.4% (ND2) sequence divergence of *S. indigoticus* (its sister species). The genetic diversity of *Scytalopus sp. nov. 2* from southern Brazil is structured in three geographic groups, consisting of distinct evolutionary units. The status of the new species suggested in this study (from Serra da Ouricana and southern *S. speluncae*) is consistent with morphology and bioacoustic data. The results presented here, mainly the discovery of new species and corroboration of the specific status of others would help the design of conservation strategies for this neglected group.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Scytalopus* compreende Passeriformes de pequeno porte (11-43g) pertencentes à família Rhinocryptidae, considerada como uma das mais ancestrais da ordem (Krabbe & Schulenberg, 1997, Sick, 1997). *Scytalopus* spp. distribui-se da Costa Rica ao Panamá, atravessando os Andes da Colômbia e Venezuela até o Cabo Horn, no extremo sul da América do Sul. Está presente também nas montanhas costeiras da Venezuela e nas regiões sul e sudeste do Brasil até Misiones, Argentina (Krabbe & Schulenberg, 1997).

A semelhança externa, comportamental e da voz de alguns representantes do gênero *Scytalopus* é mencionada na literatura. Krabbe & Schulenberg (1997) argumentaram que as espécies do gênero *Scytalopus* mostram variação de plumagem intraespecífica (relacionadas com a idade) maior que interespecífica. Arctander & Fjedså (1994) relataram que a plumagem parece ser um caráter mais conservativo que a voz; enquanto diferenças vocais podem estar mais relacionadas à diferenciação recente.

As espécies brasileiras do gênero, em sua maioria silvícola, habitam locais sombrios e densamente vegetados, mostrando-se altamente fotófobas (Sick, 1997). São pássaros pequenos, de coloração cinza escura, que se caracterizam por voarem pouco e a curtas distâncias. Mesmo a espécie de área aberta é extremamente sedentária e inconspícua. Acredita-se que as espécies do gênero estejam altamente sujeitas à especiação, devido a sua baixa capacidade de dispersão e fotofobia, somada à sua distribuição em montanhas fragmentadas (Krabbe & Schulenberg, 1997). Com base na distribuição compartimentada dos *Scytalopus* brasileiros, autores como Sick (1997) sugerem que paisagens serranas brasileiras, hoje ilhadas, teriam sido unidas no passado, ou fornecem indícios de que aves típicas de montanhas isoladas e frias do sudeste do Brasil, como os tapaculos, sejam derivadas de ancestrais Andino–Patagônicos.

Até o presente momento existem cinco espécies descritas de *Scytalopus* no Brasil, sendo que duas destas espécies (*S. iraiensis* e *S. psychopompus*) são consideradas globalmente ameaçadas de extinção e uma terceira (*S. novacapitallis*), recebe o status de *near threatened* (Bird Life International, 2001). Além disso, *S. indigoticus*, endêmica de floresta Atlântica, é considerada “Em Perigo” no Rio Grande do Sul (Bencke *et al* 2003). *Scytalopus speluncae*, a espécie mais amplamente distribuída do gênero e única sem problema aparente de conservação, é parcamente conhecida e necessita de atenção dada a grande semelhança morfológica com espécies congêneres, ainda não descritas pela ciência (vide Maurício, 2003). Além de problemas ligados à conservação das espécies, a validade de *Scytalopus*

psychopompus já foi questionada por Gonzaga *et al.* (1995) e Krabbe & Schulemberg (1997), indicando a necessidade premente de estudos genético-evolutivos envolvendo as espécies do grupo.

O estudo de Arctander & Fjedså (1994) constituiu a primeira tentativa de compreender as relações filogenéticas e história evolutiva dos *Scytalopus* sul-americanos. Aquele estudo, entretanto, embora englobando 14 espécies, considerou apenas as espécies distribuídas na porção norte dos Andes. Naquele trabalho os autores sugeriram que a especiação foi alopatrica e que o modelo atual de distribuição das mesmas em diferentes altitudes foi um evento secundário.

Em relação à filogenia dos *Scytalopus* do sudeste da América do Sul, existiam apenas sugestões em Vielliard (1990), o qual incluiu *S. speluncae* e *S. novacapitalis* em uma superespécie devido à estrutura semelhante de voz. Recentemente, Mauricio (2005) com base em um estudo taxonômico detalhado do grupo, propôs que as espécies de *Scytalopus* brasileiras são compostas por dois grupos: um formado por *S. indigoticus* e *S. psychopompus* e o outro, denominado grupo *S. speluncae*, constituído por *S. speluncae*, *S. iraiensis*, *S. novacapitalis* e duas espécies novas que ainda estão sendo descritas, denominadas *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2* neste estudo. Até o presente, sabe-se que das espécies de *Scytalopus* existentes no Brasil, o grupo formado por *S. indigoticus* e *S. psychopompus* compartilha a coloração branca nas partes ventrais, cinza-escuro na partes superiores e laterais, bem como canto similar (Del Hoyo, 2003, Mauricio, 2005, Bornschein *et al.*, 2005). Além disso, Mauricio (2005) menciona que o grupo *S. speluncae* compartilha um canto típico com repetições longas e monótonas de uma simples nota. Ele também indica a existência de um subgrupo dentro do grupo *S. speluncae* reunindo *S. novacapitalis*, *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2*, em decorrência de uma característica do canto apresentada igualmente por estas espécies.

A seguir, são fornecidas breves descrições das espécies brasileiras do gênero *Scytalopus*.

Scytalopus indigoticus – (macuquinho perereca). Distribuição: sul da Bahia, região serrana do Espírito Santo e do leste de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul (Sick, 1997). *Scytalopus indigoticus* é encontrada em altitude até 1000m e, em alguns lugares na Serra do Mar, em Santa Catarina e em São Paulo, ocorre ao nível do mar (Sick, 1997); entretanto, ocorre em altitudes inferiores a *S. speluncae*. Habita sub-bosque de floresta Ombrófila Densa e florestas secundárias, preferindo as florestas de planícies alagadas no leste do Rio Grande do Sul (Bencke *et al.*, 2003). O canto desta espécie pode ser confundido com o de um anfíbio, *Proceratophrys boiei* (sapo-de-chifre). O grito de contato é muito elaborado, sendo muitas

vezes confundido com o próprio canto. É parcialmente simpátrico, mas não sintópico, com o *S. speluncae*. Vielliard (1990) propõe que o padrão considerado mais “derivado” desta espécie pode ter-se originado de um ancestral andino, como o *Scytalopus lateobricola*, ou até mesmo ter evoluído por deslocamento eto-ecológico em simpatria com a forma considerada ancestral padrão do *S. speluncae*.

Scytalopus psychopompus – (macuquinho baiano). Distribuição: Litoral da Bahia (Sick, 1997). *Scytalopus psychopompus* foi descrita no final da década de 1980, com base em três exemplares procedentes da costa leste da Bahia. Sua diagnose em relação à *S. indigoticus*, espécie que lhe é bastante similar, e com distribuição relativamente ampla no leste do Brasil, baseou-se na ausência de barramento nos flancos e coloração cinza-azulada das penas da tíbia. Recentemente, a sua validade foi questionada em trabalhos de referência sobre a taxonomia do gênero *Scytalopus* (Gonzaga *et. al.*, 1995 e Krabbe & Schulemberg, 1997). Considerada criticamente ameaçada no âmbito global, a tomada de decisões visando à conservação da espécie, no âmbito nacional, provavelmente esbarrou na incerteza acerca de sua validade, gerando a necessidade imediata de uma avaliação de seu real *status* taxonômico.

Scytalopus iraiensis - (macuquinho da várzea). Distribuição: São José dos Pinhais e Quatro Barras, no Paraná (Bornschein *et al.*, 1998); Campo Belo do Sul, no sudeste de Santa Catarina (C. S. Fontana, com. pess.); Cambará do Sul (G.N. Maurício, com. pess.), Viamão (Accordi, 2003) e Rio Grande (G.N. Mauricio, com. pessoal), no Rio Grande do Sul. Esta espécie não havia sido assumida para o Rio Grande do Sul até o presente, embora Bencke (2001) já atribuísse um *Scytalopus sp.* à espécie *S. iraiensis*, com base em um exemplar tombado na coleção ornitológica do Museu da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCP 0957). Habita campos úmidos situados em planícies de inundação de alguns rios (várzeas) (Bornschein *et al.*, 1998). No Rio Grande do Sul está restrita a banhados bem eutroficados e com nenhum ou mínimo impacto proporcionado pelo pastejo de gado. Segundo Bornschein *et al.* (1998), esta espécie difere da *S. speluncae*, entre outros aspectos, por possuir dorso negro e superfície ventral cinza em vez de um colorido cinza-ardósia uniforme. O canto da *S. iraiensis* segue o padrão da *S. speluncae*, mas dela difere por apresentar no canto modulado o fundamental da nota em frequências mais baixas. A morfologia da siringe também aproxima *S. iraiensis* da *S. speluncae*.

Scytalopus novacapitalis – (tapaculo de Brasília). Distribuição: Distrito Federal, Formosa (Goiás), sudoeste de Minas Gerais (Sick, 1997). Habita o sub-bosque de florestas de galeria e, ocasionalmente, áreas de florestas secundárias, próximas a cursos de água (Collar *et al.*, 1992). Este tapaculo, descoberto na época da construção de Brasília, mostra em seu canto

parâmetros semelhantes ao canto de *S. speluncae* sendo, porém mais lento. Mauricio (2003) encontrou correlação positiva no tipo de canto com aceleração final (trinado) entre *S. novacapitalis* e *Scytalopus* sp. nov. 2, supondo ser uma característica comum a ambas.

Scytalopus speluncae- (tapaculo preto). Distribuição: Minas Gerais, sul da Bahia até o Rio Grande do Sul. Habita as florestas Ombrófila Densa e Ombrófila Mista. Em razão de uma nota repetida em séries monótonas do canto, Vielliard (1990) sugeriu que esta espécie esteja perto do que parece ser o padrão ancestral do canto na família Rhinocryptidae, encontrado em outras espécies e gêneros. Sick (1997) sugere que este padrão deve-se à ausência de pressão evolutiva. Mauricio (2003) propõe, pela análise da plumagem e vocalização, que populações de *Scytalopus* tradicionalmente identificadas como *S. speluncae* compreendem um grupo parafilético composto de duas ou mais espécies.

***Scytalopus* sp. nov. 1.** (esta espécie está sendo estudada por Marcelo F. de Vasconcelos, Luis Fábio da Silveira, Bret M. Whitney e Fernando Pacheco). Distribuição: Complexo do Espinhaço e Mantiqueira em Minas Gerais. Habita áreas montanhosas (altitude entre 1.300 e 2.000 m) e rochosas, entretanto, alguns indivíduos já foram encontrados em áreas de floresta em altitudes menos elevadas (até cerca de 800 m) (M. F. de Vasconcelos, com. pessoal). Assemelha-se à *S. sp. nov. 2* (descrita a seguir) em plumagem e vocalização, no entanto, possui plumagem mais clara no peito e diferenças no repertório final do canto (Mauricio, 2005). Foi anteriormente assumida como *S. novacapitalis*.

***Scytalopus* sp. nov. 2** (*sensu* Mauricio 2003 e Maurício, 2005). Esta espécie apresenta-se distribuída em três populações alopátricas: uma população ocorre na Serra de Tapes (localização mais meridional da Serra do Sudeste) no sul do Rio Grande do Sul, outra está localizada no noroeste do Rio Grande do Sul, alcançando a Província de Misiones, Argentina (esta população provavelmente estende-se para oeste do Paraná e Santa Catarina) e uma terceira população é encontrada na Serra Geral, a nordeste do Rio Grande Sul, e porção adjacente de Santa Catarina (Maurício, 2003). Habitam sub-bosques das florestas Ombrófila Densa, Ombrófila Mista e Estacional Decidual. Segundo Maurício (2003) *Scytalopus* sp. nov. 2 difere da *S. speluncae* porque possui coloração da plumagem com flancos listrados de preto em todas as idades, partes inferiores cinza mais claro, canto de andamento mais lento e por grito de contato peculiar. Em seu repertório vocal possui um tipo de canto quase único, cuja parte final é notavelmente acelerada até se tornar um trinado. Maurício (2003) descreve como relevantes as seguintes variações inter e intrapopulacionais desta espécie: comprimento de retrizes, coloração das partes inferiores, com variação de tonalidades de cinza e barrado sobre o flanco. Estas diferenças de coloração são encontradas de forma mais consistente entre

subadultos e imaturos, o que é bastante comum no gênero. Jovens e subadultos apresentam variações interpopulacionais no caráter cor (barra das terciárias, coberteiras das asas e da cauda), sendo que os indivíduos da Serra de Tapes apresentam maior quantidade de áreas marrons nas asas e cauda, em comparação com as populações do nordeste e noroeste do Rio Grande do Sul, que tão somente apresentam menor quantidade desta cor na barra das terciárias (Maurício, 2003). Contudo, pássaros julgados como adultos (cinza mais acentuado e menos marrom) nas três populações são muito similares, considerando-se a coloração. Além disto, estas populações têm o mesmo repertório vocal, embora os pássaros do nordeste do Estado tendam a emitir sons mais rápidos que os das populações do noroeste e da Serra de Tapes. Esta espécie será nominada *S. pachecoi* (Maurício, 2005)

2. OBJETIVOS

No presente trabalho, tendo em vista, entre outros aspectos, a necessidade de ampliação do conhecimento sobre o gênero *Scytalopus* pretendeu-se entender os processos evolutivos que geraram o padrão de diversidade atualmente encontrado nas espécies não-andinas (orientais) do gênero, relacionando-as filogeneticamente e procurando responder especificamente:

- (1) Como se caracterizam geneticamente as espécies de *Scytalopus* brasileiras?
- (2) Há evidências de que *Scytalopus psychopompus* seja realmente uma espécie válida?
- (3) Há divergência genética compatível que suporte a separação taxonômica de *S. speluncae* em três espécies?
- (4) Qual a relação filogenética entre as espécies?
- (5) Há evidências genéticas da existência de dois grupos distintos de *Scytalopus* brasileiros (grupo *S. indigoticus* e *S. psychopompus* e grupo *S. speluncae*, englobando as demais espécies) como postulado por Maurício (2003)?
- (6) Há evidências genéticas que corroboram a existência de um subgrupo de espécies dentro de *Scytalopus speluncae sensu* Maurício 2003?

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram utilizados tecidos (conservados em álcool) das cinco espécies brasileiras de *Scytalopus* já descritas: *Scytalopus speluncae* ($n = 16$), *S. iraiensis* ($n = 2$), *S. novacapitalis* ($n = 1$), *S. indigoticus* ($n = 3$), *S. psychopompus* ($n = 1$) e de duas espécies novas: *S. sp. nov.* 1 (n

= 11), *S. sp. nov. 2* ($n = 20$) (FIG 1). Estas amostras são provenientes de tecidos depositados no Museu de Ciências e Tecnologia (MCP) da PUCRS e de coletas específicas, conforme licenças IBAMA n. 133/2004-CGFAU/LIC, para G. N. Maurício e 197/2001 e 192/2002, 207/2003 para Marcelo Ferreira de Vasconcelos. Os espécimes-testemunho e indivíduos coletados, com número de museu, ou número de campo, assim como as localidades de coleta encontram-se relacionados na tabela 1.

Como grupo externo para o segmento de ND2 utilizaram-se as seqüências disponíveis no GenBank de *Formicarius colma amazonicus* (AY612459), *Xiphorhynchus flavigaster* (AY089849) e *Basileuterus fulvicauda* (AY327396), e para o segmento de citocromo b foram usadas as seqüências de *Scytalopus latebricola spilmani* (U06173), *S. unicolor latrans* (U06170) e *Myornis senilis* (U35087). Para a região controle não foi possível utilizar grupo externo, devido à ausência de seqüências próximas.

Tabela 1. Lista dos espécimes analisados, seus respectivos locais de coleta e números de coleção, bem como dos segmentos mitocondriais estudados.

Espécie	N° estudo	N° MCP ou N° de campo	Local de coleta	Segmentos		
				ND2	CYT	RC
<i>S. sp. nov. 2</i>	01	01174	Nonoai, RS	+	+	-
<i>S. speluncae</i>	02	01169	São Francisco de Paula, RS	+	+	+
<i>S. iraiensis</i>	03	0957	Banhado do Maçarico, RS	+	-	+
<i>S. speluncae</i>	04	01177	Pico dos Marins, Piquete, SP	+	-	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	05	01189	Bom Jardim da Serra, RS	+	-	-
<i>S. speluncae</i>	06	01106	General Carneiro, PR	+	-	-
<i>S. sp. nov. 2</i>	07	0994	Derrubadas, RS	+	+	-
<i>S. speluncae</i>	09	0987	Maquiné, RS	+	+	+
<i>S. iraiensis</i>	10	0958	Banhado do Maçarico, Rio Grande, RS	+	-	-
<i>S. sp. nov. 2</i>	11	0976	Morro Redondo, RS	+	+	+
<i>S. speluncae</i>	12	0988	Maquiné, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	13	0961	Canguçu, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	15	01023	Canguçu, RS	+	-	+
<i>S. speluncae</i>	17	0983	São Francisco de Paula, RS	+	+	+
<i>S. speluncae</i>	18	0984	São Francisco de Paula, RS	+	+	-
<i>S. speluncae</i>	19	0985	São Francisco de Paula, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	20	0959	Morro Redondo, RS	+	-	-
<i>S. sp. nov. 2</i>	21	0962	Pelotas, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	22	0949	Capão do Leão, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	23	0952	Capão do Leão, RS	+	-	-
<i>S. speluncae</i>	25	01175	Campina Grande do Sul, PR	+	-	-
<i>S. speluncae</i>	26	01176	Campina Grande do sul, PR	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2*</i>	27	01179	Capão do Leão, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	28	01183	Bom Jardim da Serra, SC	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	29	01188	Bom Jardim da Serra, SC	+	-	+
<i>S. speluncae</i>	31	01170	São Francisco de Paula, RS	+	+	+
<i>S. speluncae</i>	32	01172	Delfim Moreira, MG	+	+	+
<i>S. speluncae</i>	33	01173	Delfim Moreira, MG	+	+	-
<i>S. speluncae</i>	34	01076	São Francisco de Paula, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	35	01075	Cambará do Sul, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	37	01082	Capão do Leão, RS	+	-	+

Espécie	N° estudo	N° MCP ou N° de campo	Local de coleta	Segmentos		
				ND2	CYT	RC
<i>S. sp. nov. 2</i>	39	01039	S. José dos Ausentes, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	40	01040	S. José dos Ausentes, RS	+	+	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	41	01043	Cambará do Sul, RS	+	-	+
<i>S. sp. nov. 2</i>	42	01015	S. José dos Ausentes, RS	+	-	-
<i>S. sp. nov. 2</i>	43	01016	S. José dos Ausentes, RS	-	+	+
<i>S. sp. nov. 2.</i>	44	01190	Bom Jardim da Serra, SC	+	-	-
<i>S. novacapitalis</i>	45	01481	Brasília, DF	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	47	NT_MV06	Lavras, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	48	NT_MV01	Serra do Caraça, MG	+	+	-
<i>S. sp. nov. 1</i>	50	NT_MV03	Serra do Caraça, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	51	NT_MV04	Serra do Caraça, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	52	NT_MV05	Serra do Caraça, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	54	NT_MV08	Serra do Cipó, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	55	NT_MV09	Diamantina, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	57	NT_MV11	Diamantina, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	58	NT_MV13	S. da Piedade, Caeté, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	59	01509	Bocaina de Minas, MG	+	+	+
<i>S. sp. nov. 1</i>	60	01510	Bocaina de Minas, MG	+	+	+
<i>S. speluncae</i>	61	NT_BL04	S. Caparaó, Divino, MG	+	-	+
<i>S. speluncae</i>	62	NT_BL08	Boa Nova, BA	+	-	-
<i>S. indigoticus</i>	63	NT_BL03	Duas Barras, RJ	+	-	-
<i>S. indigoticus</i>	64	NT_BL06	Boa Nova, BA	+	-	-
<i>S. indigoticus</i>	65	NT_BL07	Boa Nova, BA	+	-	-
<i>S. psychopompus</i>	67	NT_BL09	Una, BA	+	-	-

- Holótipo; NT= Material ainda não tombado em Museu; MV = Tecidos coletados por Marcelo Ferreira de Vasconcelos; BL = expedição Bird Life, dezembro de 2004 (Bornschein et al., 2005).

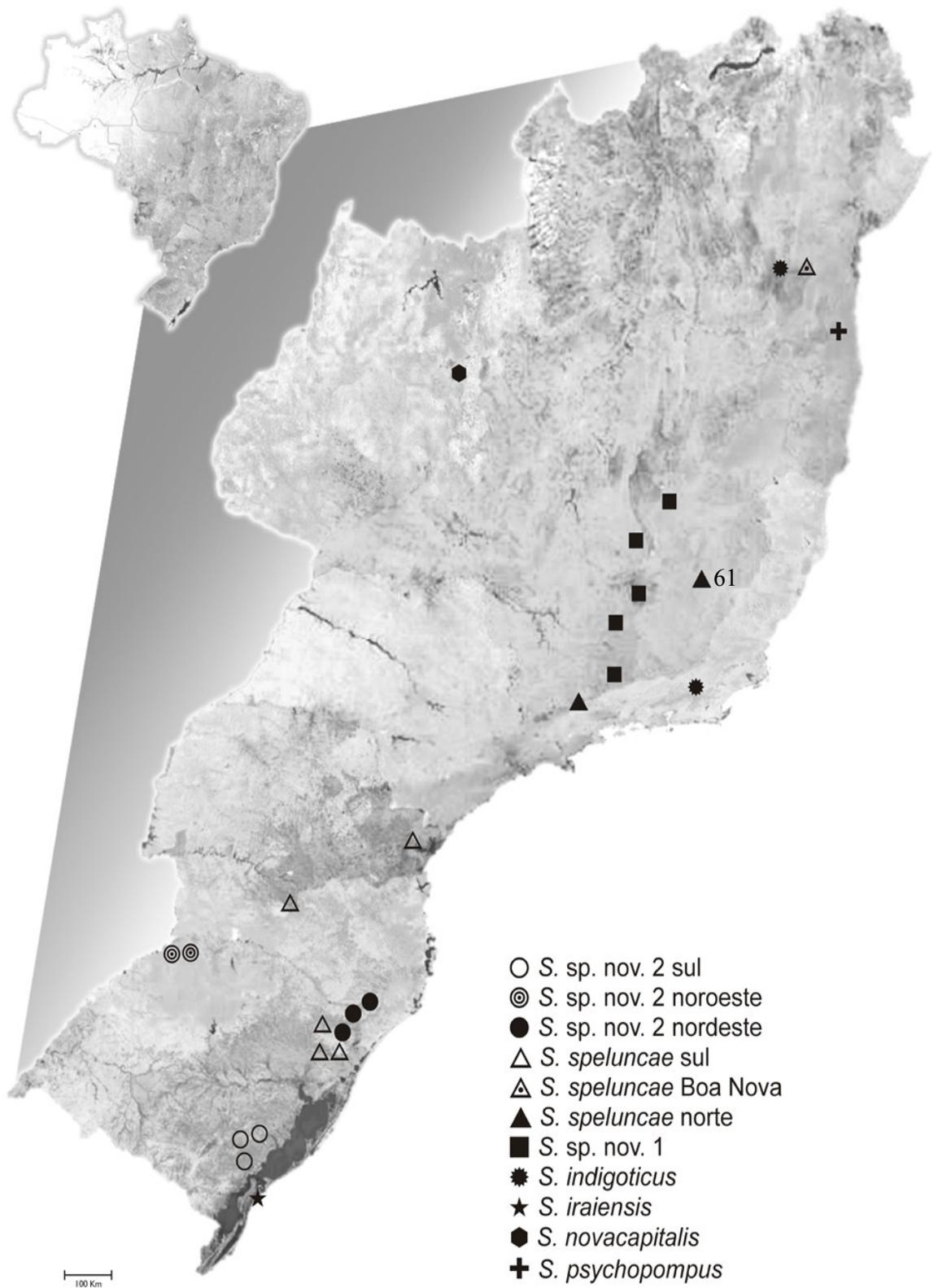


Figura 1. Amostragem das espécies de *Scytalopus* utilizadas neste estudo. O número 61 representa *S. speluncae* coletado na Serra do Caparaó, MG.

3.2 Extração, amplificação e seqüenciamento de DNA

O DNA foi extraído utilizando-se protocolos com acetato de amônio (Silva, 2003), resina Chelex 100 (Karp *et al.*, 1998) ou Quiamp DNA microkit. Foram estudados os genes mitocondriais NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2), citocromo *b* (*cyt b*) e da região controladora (parte dos domínios II e III). Segmentos dos genes ND2, *cyt b* e da região controladora (RC) da mitocôndria foram amplificados por PCR (Reação em cadeia da Polimerase) padrão utilizando-se os primers L5216 e H6313 (Sorenson, 2003), para ND2, L14764 e H15295 (Sorenson *et al.*, 1999) *cyt b* e LFCBL2 e PROHSS (Cabanne, 2004) para região controladora. Os produtos de PCR foram purificados com as enzimas Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Amersham Bioscience). Os primers: L537 (Sorenson *et al.*, 1999.) para a região controladora, L51216 para o ND2 e H15295 para *cyt b* foram usados nas reações de seqüenciamento. As reações de seqüenciamento foram realizadas com o DYEnamic Et Dye Terminator Kit (Amersham Bioscience) e a leitura foi realizada no MegaBACE 1000 DNA Analysis Systems (Amersham Bioscience). Todos os cromatogramas foram visualizados e editados através do programa Chromas 2.23 (Techlysium Pty Ltd) Foram seqüenciados duas ou mais vezes os indivíduos que inicialmente não apresentaram seqüências de boa qualidade.

3.3. Análises

As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL X (1.8) (Thompson *et al.*, 1997) e a inspeção visual do alinhamento e edição das seqüências foram realizadas usando o programa BioEdit, versão 7.0 (Hall, 1999). Para a construção das filogenias foram utilizados três métodos básicos: método de distância, método de máxima parcimônia (MP), método de máxima verossimilhança (ML). Para testar a confiabilidade das árvores obtidas foi realizado o teste de *bootstrap*.

Para o método de distância foram usados o programa MEGA, versão 3.0 (Kumar *et al.*, 2004), o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois parâmetros (K2P) e o método de agrupamento de *neighbour-joining* (NJ). Os sítios contendo inserções/deleções (indels) e dados faltantes foram excluídos da análise. Foram analisadas seqüências de segmentos do gene ND2, *cyt b*, RC e seqüências concatenadas destes segmentos. O teste de *bootstrap* foi realizado com 500 replicações.

Para as análises com os métodos de MP e ML foi utilizado o programa PAUP, versão 4.0 (Swofford, 2003) e apenas o segmento do gene ND2. Para a MP foi utilizada busca heurística partindo de uma árvore *stepwise*, com as seguintes opções: (1) addseq, (2) 100 replicações, (3) rearranjo por TBR (*tree-bisection-reconnection*) e (4) bootstrap com 1000 replicações. Para estimar o melhor modelo de substituição para a análise de ML os dados foram submetidos ao programa MODELTEST, versão 3.06 (Posada & Crandall, 1998), que determinou, pelo critério de Akaike, que o modelo mais adequado é o TrN + G + I (Tamura Nei + distribuição gama + sítios invariáveis). A busca da árvore de ML foi realizada utilizando o algoritmo NJ para a estimativa da árvore inicial e TBR. O teste de *bootstrap* foi realizado com 1000 replicações. Na descrição dos resultados, utilizou-se o seguinte critério subjetivo para avaliação qualitativa da confiabilidade da resolução dos nós nas filogenias construídas: Confiável: 70% (Mindell *et al.* 1997), alto: 90-100% , baixo: menor que 70%.

3.4. Variabilidade Molecular

O programa DNASP (Rozas *et al.*, 2003) foi utilizado para estimar uma série de estatísticas de variabilidade, tais como: diversidade haplotípica (H), diversidade nucleotídica (π), teta (θ) (definido pela equação: $\theta = 2N_e\mu$ – para DNA mitocondrial –, onde N_e representa o tamanho efetivo da população de fêmeas e μ a taxa de mutação). Testes de neutralidade e de flutuações demográficas: Teste D de Tajima e teste Fs de Fu (considerado mais sensível para detectar flutuações populacionais (Ramos-Onsins e Rozas, 2002)).

O F_{ST} é uma medida útil para calcular a variação nas frequências alélicas entre diferentes populações. O programa DNASP estima o F_{ST} através de informações extraídas das seqüências segundo a equação: $F_{ST} = 1 - (H_w/H_b)$ (Hudson *et al.*, 1992, equação 3), onde H_w representa o número médio de diferenças entre as seqüências dentro de subpopulações e H_b , o número médio de diferenças entre as seqüências amostradas de diferentes subpopulações. O número de migrantes entre populações N_m é estimado a partir da equação: $N_m = 1/2 (H_w/H_b - H_w)$ (Hudson *et al.*, 1992, equação 4). Para as estimativas populacionais as populações foram divididas de acordo com a região de coleta.

Com o objetivo de visualizar parâmetros histórico-demográficos foi utilizado o programa NETWORK, versão 4.1 (Bandelt, 1999), com o qual foi construída uma rede de haplótipos (*network*) utilizando-se o algoritmo *median-joining* que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados e introduz a hipótese de um ancestral. A *mismatch distribution* foi visualizada com o programa DNASP.

4. RESULTADOS

Foram obtidas, através da análise de uma amostragem de 55 indivíduos, seqüências de 500 pares de bases (pb) do gene ND2, correspondendo às posições 5331 a 5831 da seqüência de *Gallus gallus* (GenBank n° NC001323); 410 pb da região controladora de 37 indivíduos, posições 600 a 1010 (representando parte do segundo domínio e o bloco CSB-1 do terceiro domínio). Também foram obtidos 440 pb de uma pequena porção do ND5 (80 pb) e citocromo *b* correspondendo às posições 14801 a 15241 (que será denominada apenas *cyt b*) de 36 indivíduos. Para algumas análises, foram utilizados os segmentos individuais e para outras foram concatenados 914 pb de 28 seqüências dos segmentos *cyt b* + ND2; 865 pb de 30 seqüências da RC + ND2 e 1327 pb de 25 seqüências da RC + ND2 + *cyt b*. Na tabela 2 são apresentadas algumas características dos conjuntos de dados utilizados nas análises.

A origem mitocondrial destas seqüências foi suportada pelos seguintes resultados:

- 1) todas as amostras foram obtidas diretamente de tecido (fígado, músculo peitoral, rim ou coração) não tendo sido utilizado sangue para amostragem;
- 2) não foram constatados códons de parada nas regiões que codificam proteínas (ND2 e *cyt b*);
- 3) foram obtidos resultados coerentes entre os três marcadores (ND2, *cyt b* e região controle);
- 4) os resultados foram semelhantes tanto para as inferências morfológicas relacionadas por Mauricio (2003), como para a distribuição geográfica das espécies.

Tabela 2. Distribuição da variação dos sítios nas seqüências dos segmentos estudados (*gaps* não computados).

Região	n	pb	Conservados	Variáveis	i.p.	Varição única
ND2	58	410	266	234	163	71
ND2 ¹	55	500	328	172	138	34
Cyt <i>b</i>	35	439	342	97	78	19
Cyt <i>b</i> ¹	32	439	359	80	65	15
RC	37	388	346	42	27	15
ND2 + cyt <i>b</i>	34	939	758	181	153	28
ND2 + RC	36	888	731	157	113	44
ND2 + cyt <i>b</i> + RC	29	1327	1120	207	148	59

¹ sem grupo externo; i.p.= informativos para parcimônia; n = número de indivíduos.

4.1 Análises Filogenéticas

4.1.1 ND2

O resultado que inicialmente chama a atenção nas árvores resultantes das diversas metodologias aplicadas no segmento de ND2 (árvores MP, ML e NJ, Figs. 2-5) é a existência de dois clados de *Scytalopus* brasileiros, com bom suporte de *bootstrap* (>89%): um formado por *S. indigoticus* e *S. psychopompus* e outro composto pelas outras espécies (*S. speluncae* stricto sensu, *S. iraiensis*, *S. novacapitalis* e as duas espécies novas). As árvores de MP (Fig. 2) e NJ (Fig. 3) são muito semelhantes e apresentam os seguintes aspectos principais além da existência dos dois grandes grupos citados acima: o grupo *S. speluncae* divide-se em três clados: (1) os indivíduos de *S. speluncae* do norte da distribuição, (2) os indivíduos de *S. speluncae* do sul da distribuição e (3) um grande clado contendo: um indivíduo proveniente da Serra de Ouricana, (Boa Nova, BA), inicialmente identificado como *S. speluncae*, *S. iraiensis*, *S. novacapitalis* e as duas espécies novas. Curiosamente, em ambas, o indivíduo de *S. speluncae* de Boa Nova aparece como o mais basal, apesar do suporte não ser muito alto, seguido de *S. iraiensis*. *Scytalopus novacapitalis* aparece como grupo irmão de *S. sp. nov. 1*. Os clados *S. speluncae* norte e *S. speluncae* sul apresentam uma divergência bastante profunda e, apesar de estarem agrupados na árvore de NJ, o suporte é baixo.

A árvore de ML (Fig. 4) é muito semelhante às de MP e NJ, principalmente se desconsiderarmos os agrupamentos com valores de confiança abaixo de 60%, e reforça as posições mais isoladas do indivíduo de *S. speluncae* de Boa Nova, de *S. iraiensis* e dos clados

S. speluncae norte e *S. speluncae* sul. A maior diferença se refere à posição do indivíduo de *S. novacapitalis*, que nas árvores de NJ e MP agrupou-se com *S. sp. nov. 1* (*bootstrap* de 81% e 66%, respectivamente) enquanto na árvore de ML agrupou-se com *S. sp. nov. 2* (suporte de 54%).

Como o indivíduo de *S. psychopompus* e a seqüência de *Formicarius colma* apresentavam uma seqüência mais curta, foi feita uma análise de NJ, retirando-se os mesmos, com o intuito de aumentar o número de pares de bases para aproximadamente 500 (Fig 5). A maior diferença desta árvore em relação à anterior é que o indivíduo de Boa Nova agrupou-se junto com o clado de *S. speluncae* norte, porém com baixo suporte de *bootstrap*.

4.1.2. Região controle, cyt b e segmentos concatenados

Infelizmente até o momento não puderam ser obtidas seqüências de cyt *b* e RC para *S. indigoticus* e *S. psychopompus* e para *S. iraiensis* foi obtida apenas para a RC. As árvores de NJ construídas com estas regiões isoladamente ou combinadas (Figs. 6-10) apresentaram topologia muito semelhantes entre si e também com as filogenias obtidas com o ND2. Alguns resultados podem ser comentados. Todas as filogenias corroboram a existência de um clado com as duas espécies novas mais *S. novacapitalis*, sendo esta última sempre agrupada com *S. sp. nov. 1*, apesar do valor de suporte não ser muito alto (o maior valor sendo 70%, com os três marcadores concatenados, fig.10). Os clados *S. speluncae* norte e *S. speluncae* sul continuam bastante divergentes; mas aparecem agrupados nas árvores, apesar da ausência de grupo externo na maior parte das análises não permitir um teste adequado para esta afirmação. É importante notar que, devido à não disponibilidade de dados de grupos externos para a região controle, as árvores foram enraizadas nos ramos sugeridos pelos outros marcadores. De modo geral, os valores de suporte aumentaram nas árvores com os dados concatenados, apesar de isto estar mais evidenciado nos agrupamentos intraespecíficos.

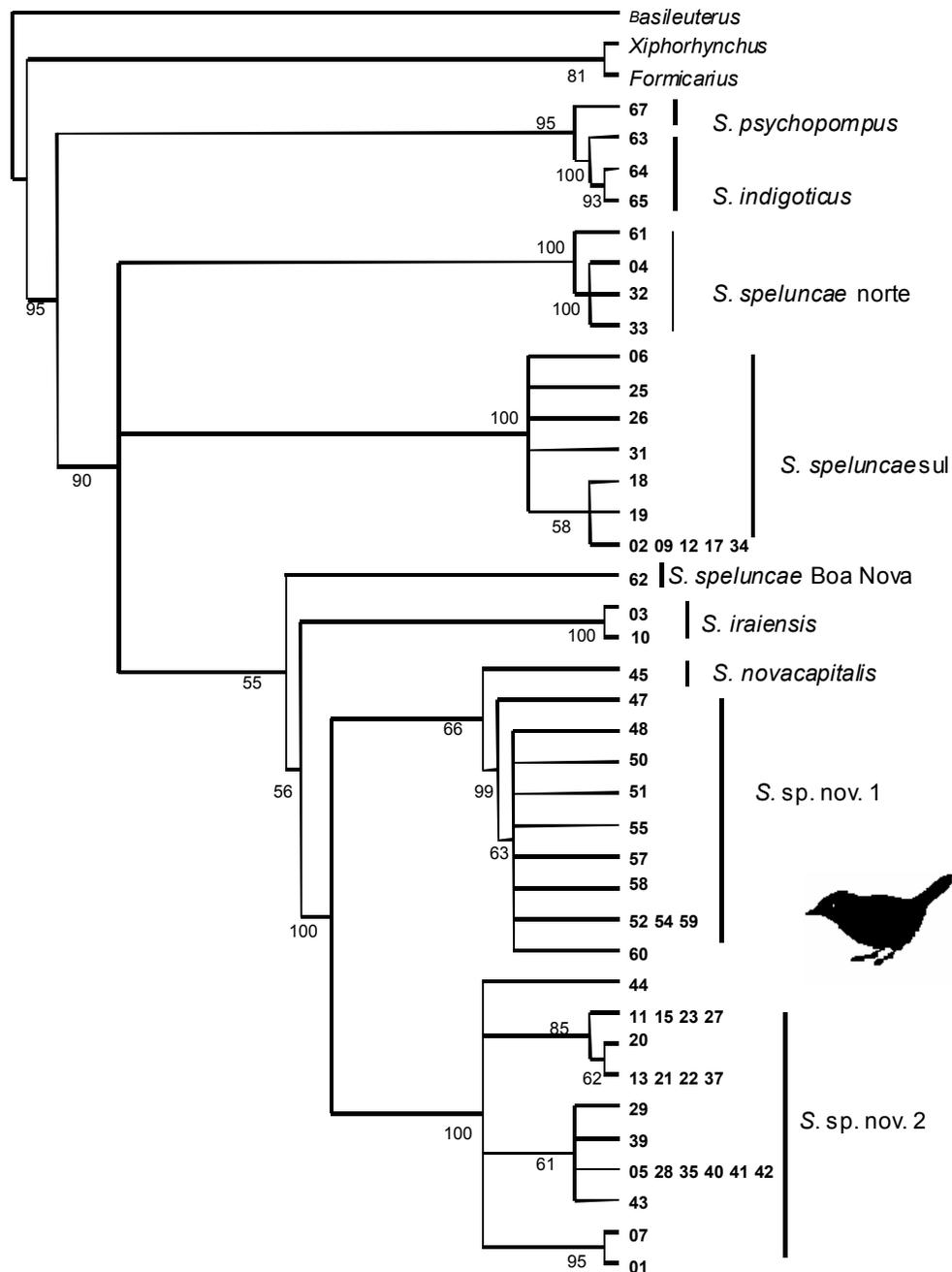


Figura 2. Árvore de Máxima Parcimônia baseada no segmento de gene ND2 (500 pb). Foi obtida através do consenso estrito de 12 árvores igualmente parcimoniosas (489 passos). Os números próximos dos ramos representam os valores (%) *bootstrap* obtidos através de 1000 replicações.

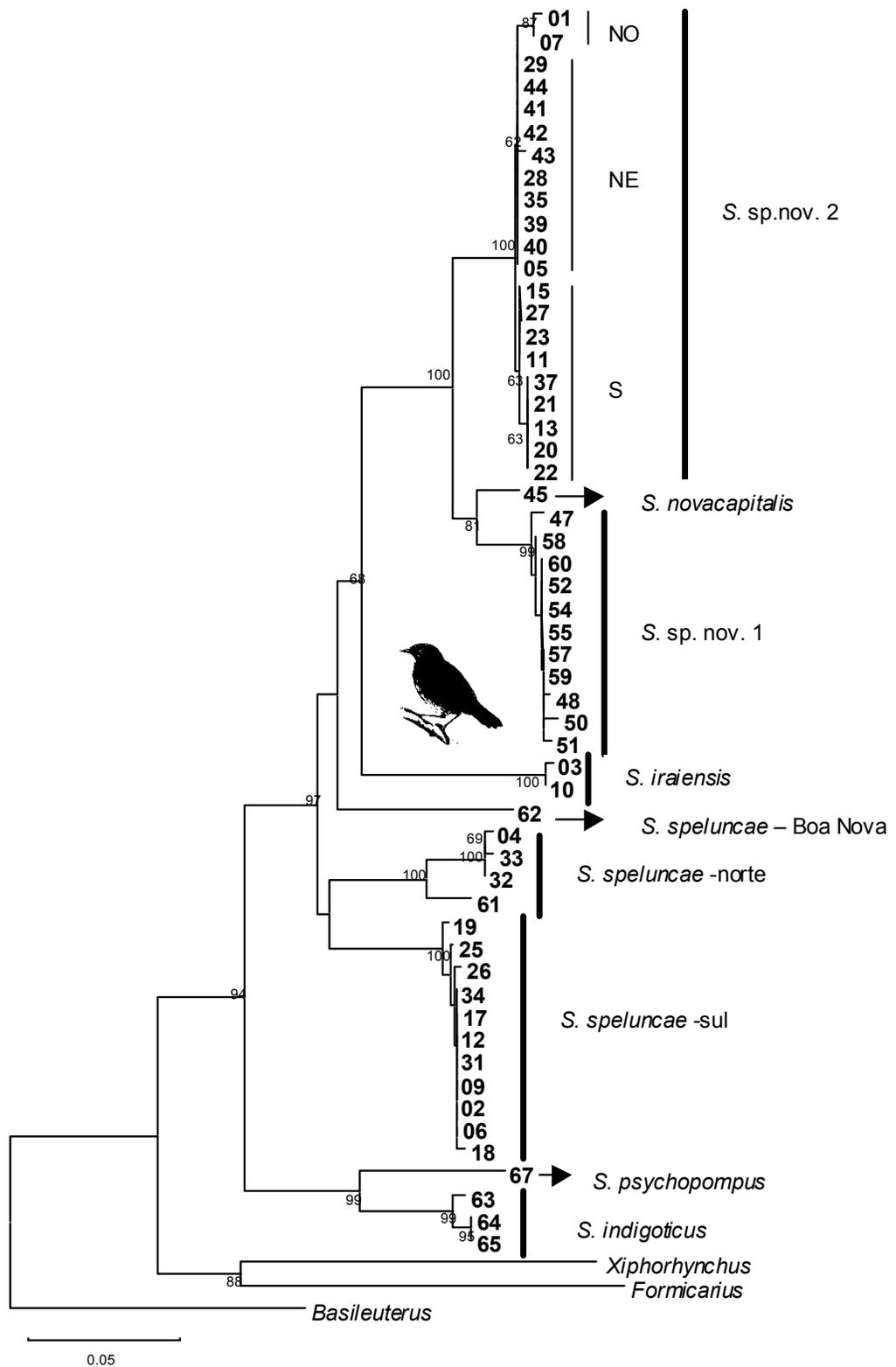


Figura 3. Árvore de NJ baseada no segmento de ND2 (460 pb). Os números próximos dos ramos representam os valores (%) *bootstrap* obtidos através de 500 replicações (valores abaixo de 50% não estão sendo apresentados).

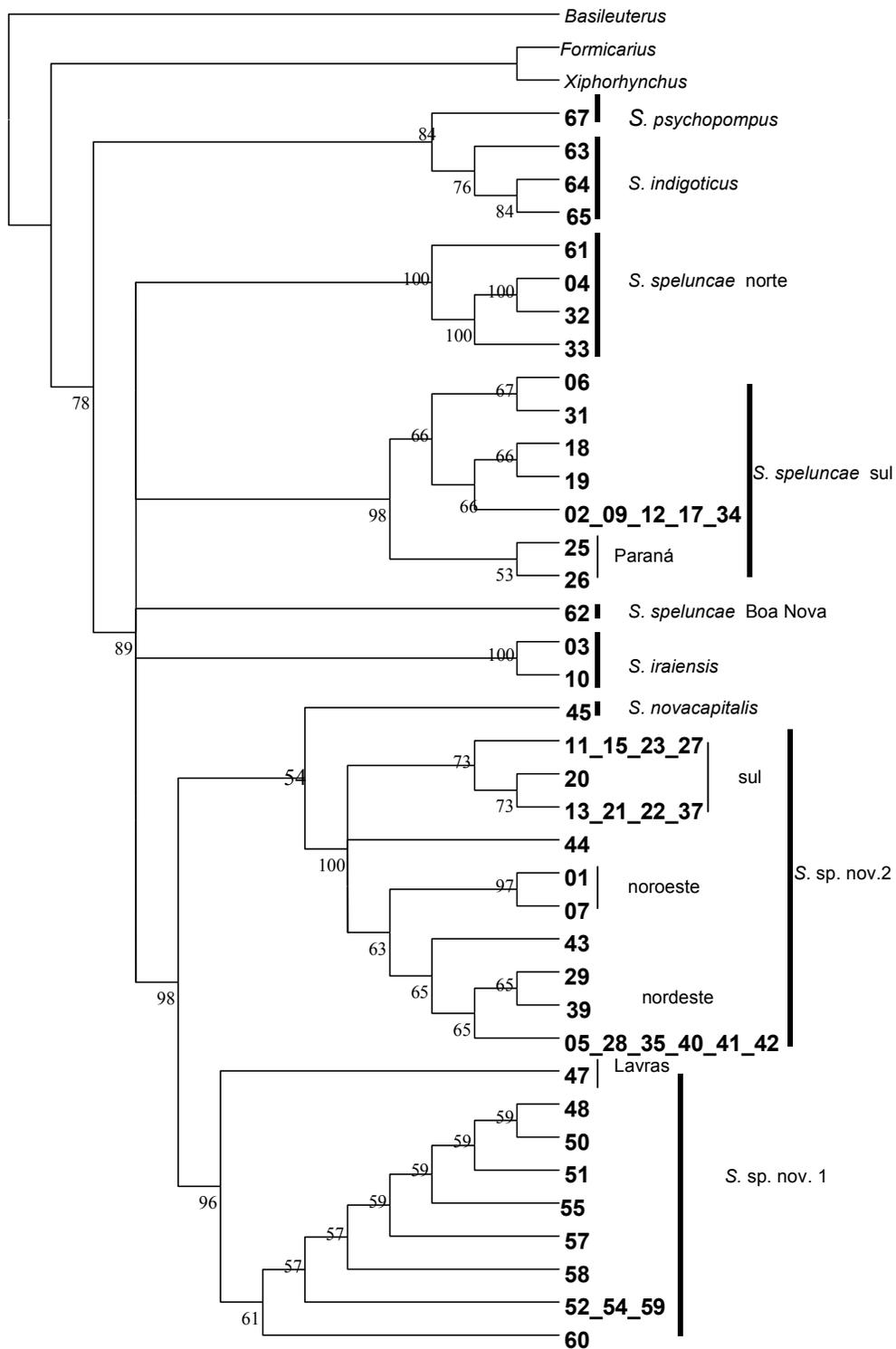


Figura 4. Árvore de Máxima Verossimilhança baseada no segmento de ND2 (500 pb), resultante do modelo TrN + G + I. Os números próximo dos ramos representam os valores (%) *bootstrap* obtidos através de 1000 replicações.

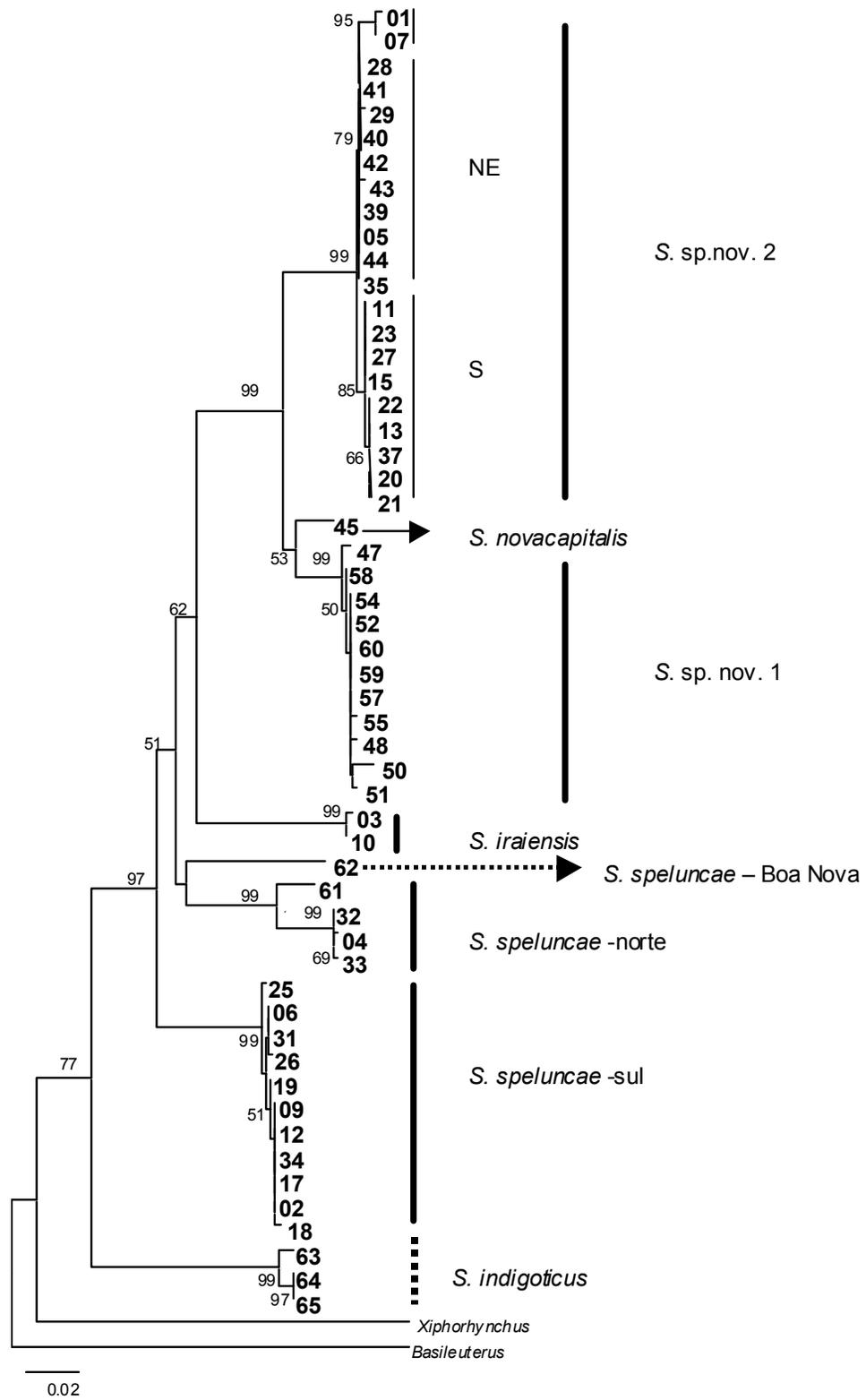


Figura 5. Filogenia construída (NJ, modelo K2P) com segmento de ND2 (500pb) sem o grupo externo *Formicarius* e *S. psychopompus* (valores (%) *bootstrap* e replicações idem à Figura 3).

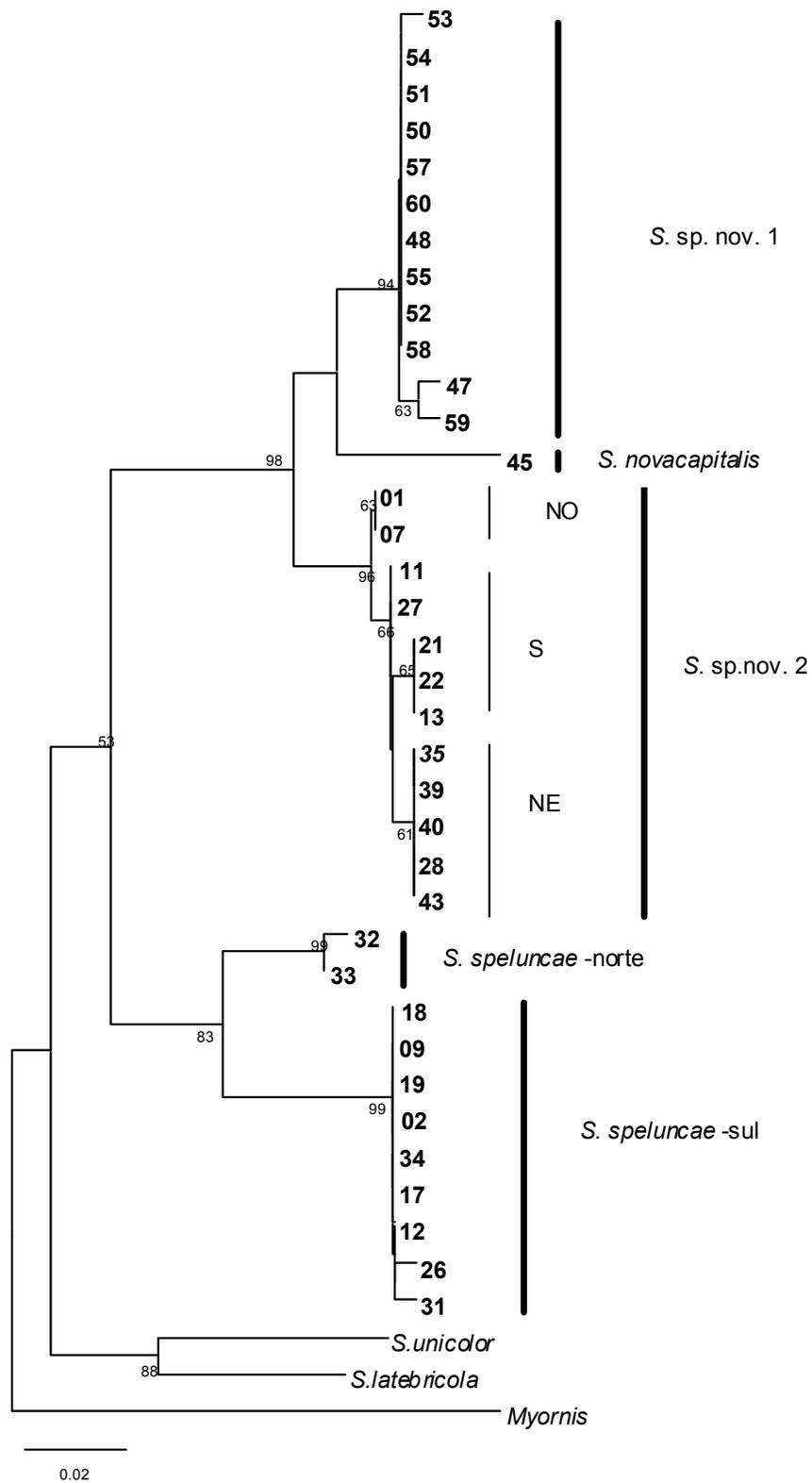


Figura 6. Filogenia (NJ, modelo K2P) baseada no segmento de *cyt b* (440pb) (valores (%) *bootstrap* e replicações idem à Figura 3).

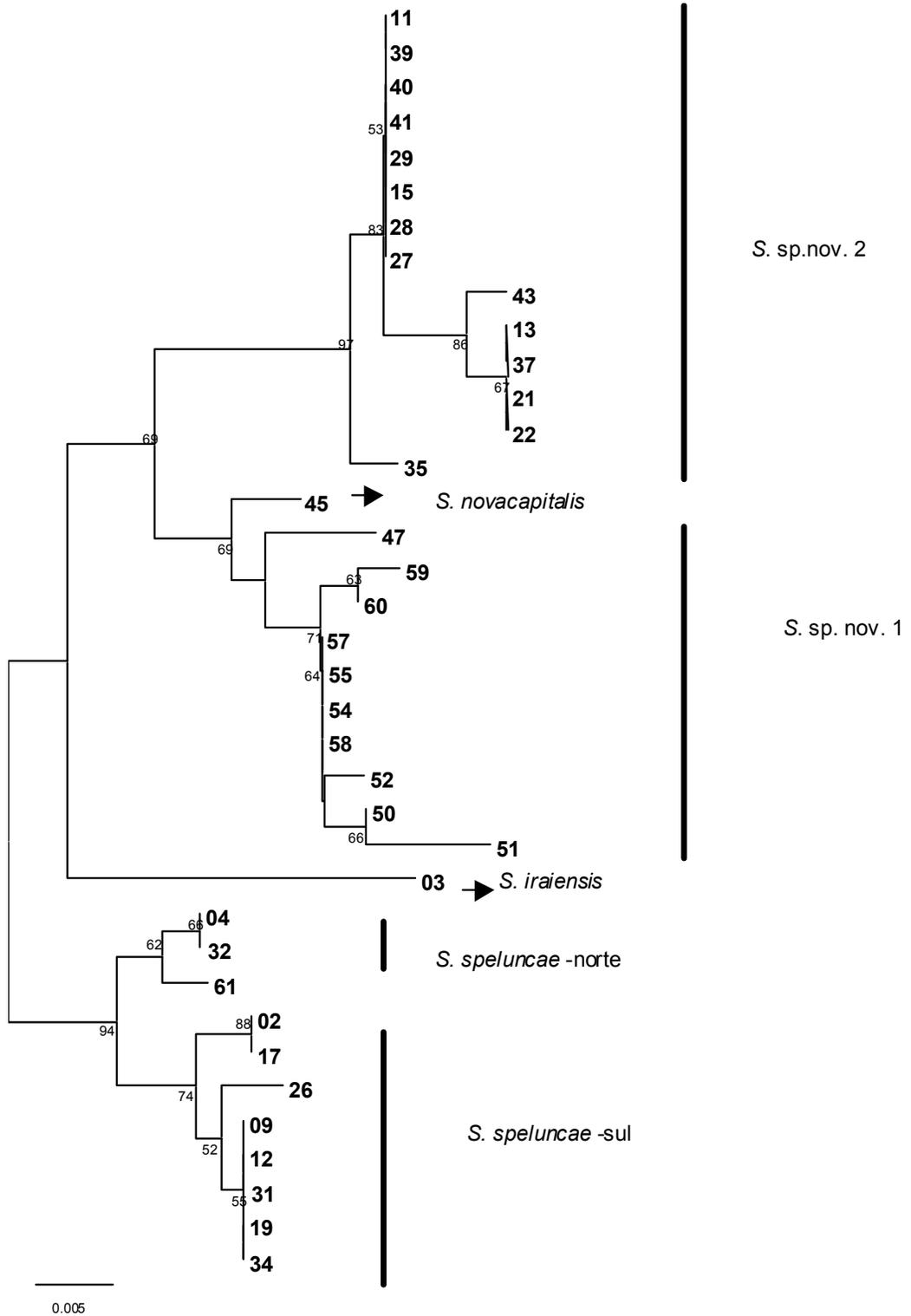


Figura. 7. Árvore filogenética (NJ, modelo K2P) obtida através do segmento da região controle (410pb). A árvore foi enraizada no ramo sugerido pelos resultados do ND2. Valores (%) *bootstrap* e replicações idem à figura 3.

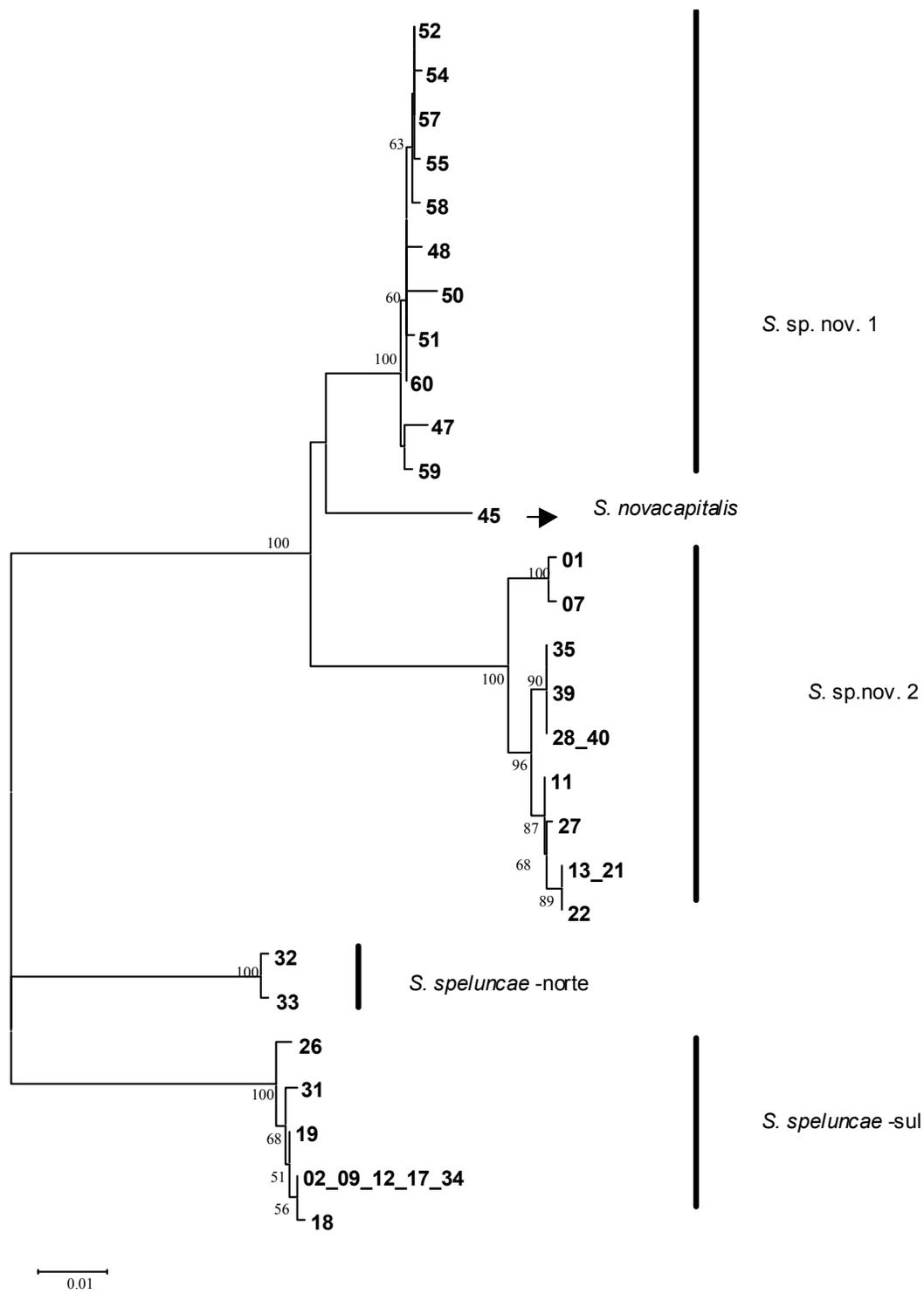


Figura. 8. Filogenia (NJ, modelo K2P) baseada nos segmentos ND2 e *cyt b* concatenados (914 pb) (valores (%) *bootstrap* e replicações idem a Figura 3). Raiz idem à Figura 7.

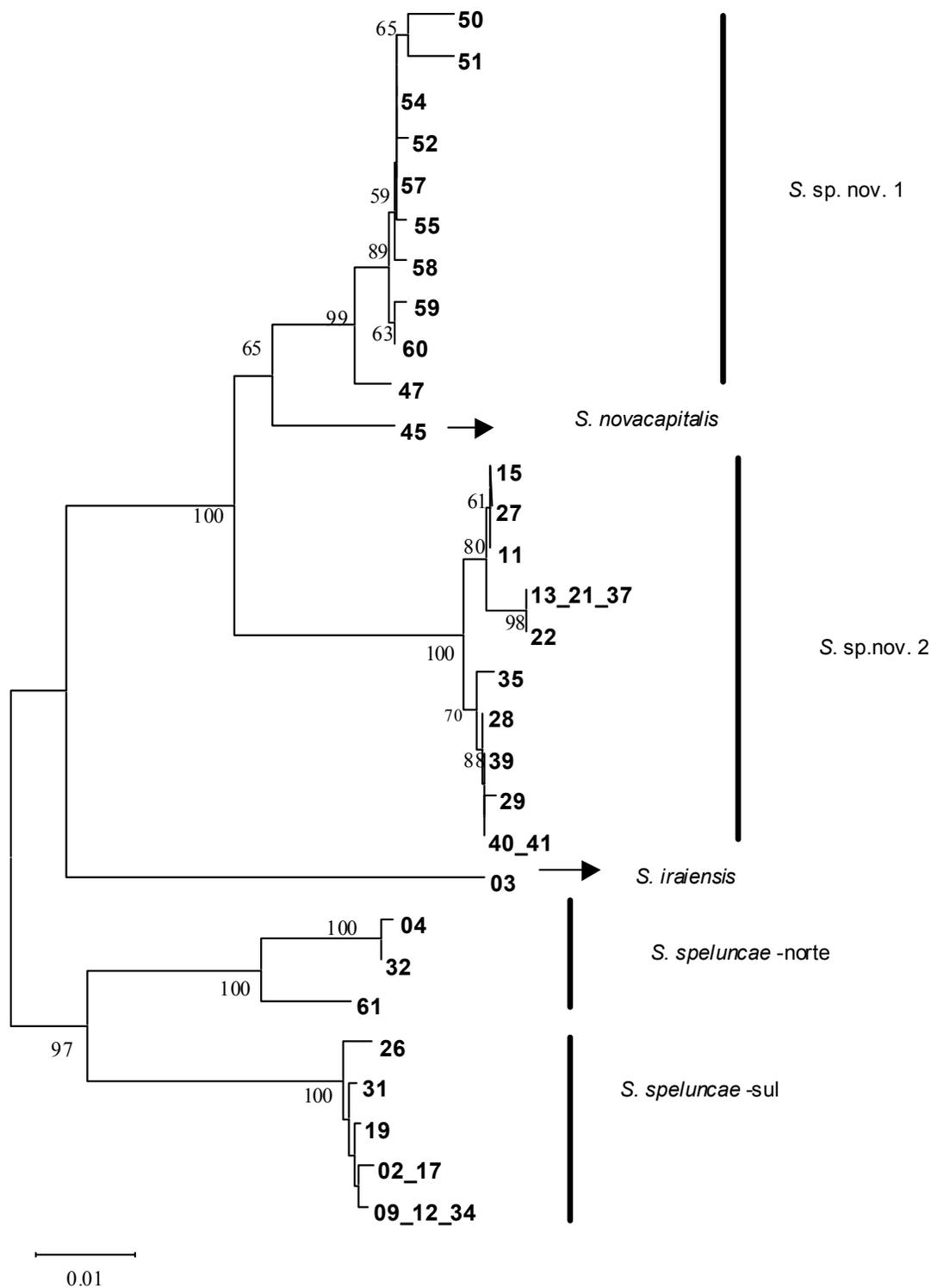


Figura 9. Filogenia (NJ, modelo K2P) baseada nos segmentos de ND2 e região controle concatenados (865pb) (valores (%) *bootstrap* e replicações idem à Figura 3. Raiz idem à Figura 7.

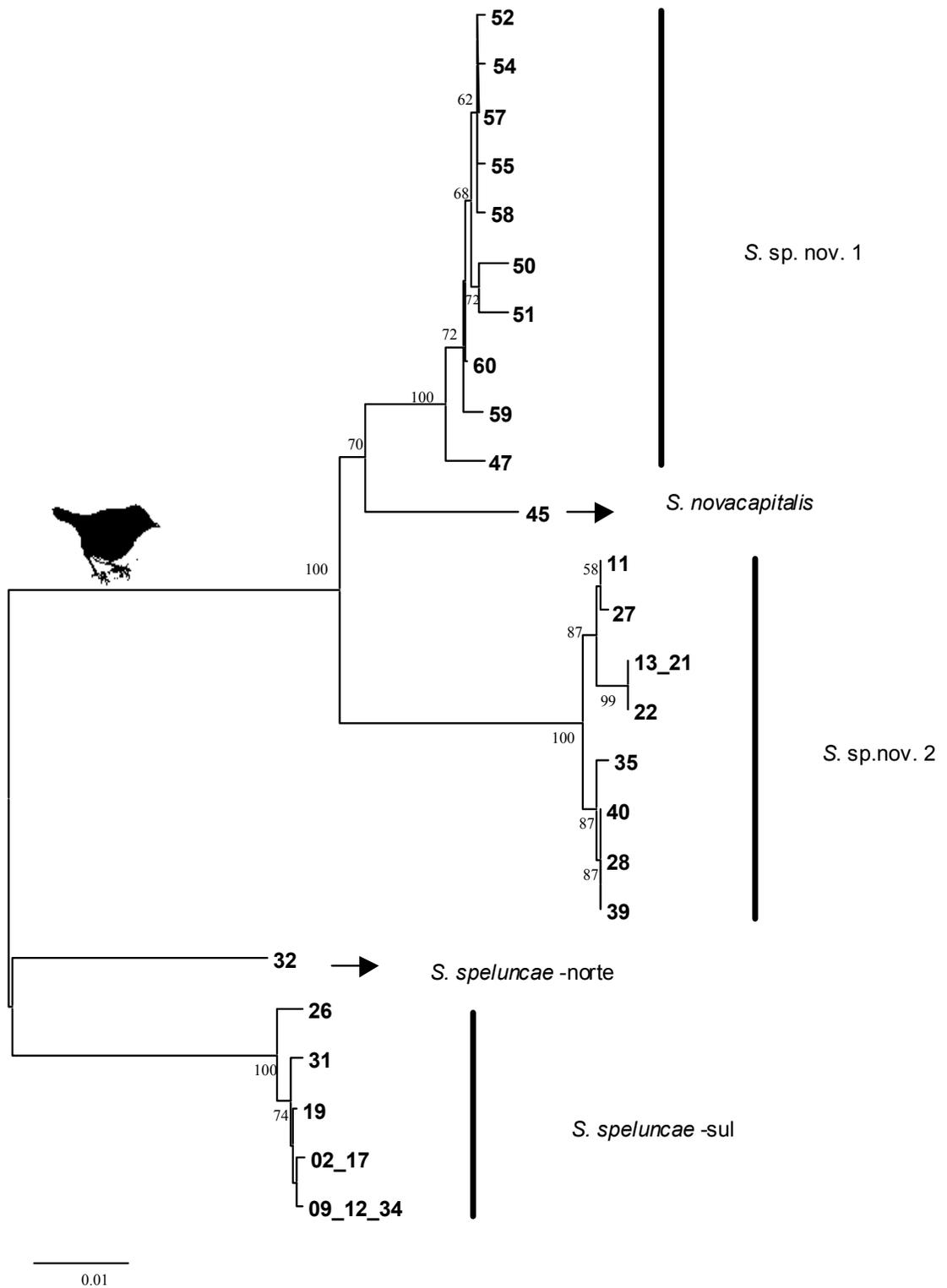


Figura 10. Árvore construída (NJ, modelo K2P) com base nos segmentos ND2 *cyt b* e região controle (1327 pb). Valores (%) *bootstrap* e replicações idem à figura 3. Raiz idem à Figura 7.

4.2. Relações intraespecíficas nas filogenias

Todas as espécies com mais de um indivíduo amostrado, exceto *S. speluncae* apresentaram-se monofiléticas para todas as árvores filogenéticas estimadas (Figs. 2-10). Os resultados das análises das três espécies com maior representatividade amostral são descritos a seguir:

***Scytalopus* sp. nov. 1:** O indivíduo proveniente de Lavras, MG (47), encontra-se em posição mais basal em praticamente todas as filogenias descritas. Os haplótipos não se apresentaram diferenciados geograficamente e em geral mostraram-se pouco divergentes entre si, sugerindo expansão populacional recente, partindo de uma população de tamanho efetivo baixo.

***Scytalopus* sp. nov. 2:** Os haplótipos de *S. sp. nov. 2* em ND2 e *cyt b* apresentaram-se estruturados em três populações geograficamente distintas (noroeste, nordeste e sul) na maior parte das filogenias, com bom valor de confiança em algumas delas, em especial nos dados concatenados. A relação entre as três populações não está resolvida, pois conjuntos diferentes de dados sugerem resoluções diferentes.

***Scytalopus speluncae*:** Os haplótipos dos indivíduos atualmente classificados como *S. speluncae* apresentam-se subdivididos em três clados, como já mencionado anteriormente. No clado sul, o(s) indivíduo(s) do norte do Paraná (25 e 26) muitas vezes apresentam-se separados dos mais ao sul e em posição basal (p.ex. Figs. 4, 7,8 e 10). No clado norte, o indivíduo da Serra do Caparó (Divino, MG), haplótipo 61, apresentou-se bem divergente dos demais em todas as análises em que foi utilizado com alto suporte (exceto para RC, Fig. 7).

4.3. Divergência e diversidade nucleotídica

A distância nucleotídica entre as espécies e principais clados para os segmentos do gene ND2, *cyt b* e região controle é mostrada nas tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3. Distância genética (K2P, abaixo) e o erro padrão (acima, obtido com 500 replicações de bootstrap) para o segmento ND2 entre as espécies de *Scytalopus* (em percentagem).

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>S. sp. nov. 2</i>	—	1,8	1,8	1,8	1,0	1,1	1,9	2,2	2,3
2. <i>S. iraiensis</i>	11,6	—	2,1	1,8	1,8	1,8	2,0	2,3	2,2
3. <i>S. speluncae</i> norte	12,8	14,4	—	1,4	1,8	1,7	1,8	2,1	2,0
4. <i>S. speluncae</i> sul	11,8	11,0	9,0	—	1,7	1,7	1,7	1,9	2,0
5. <i>S. novacapitalis</i>	4,5	11,6	12,8	11,5	—	0,9	1,9	2,3	2,4
6. <i>S. sp. nov. 1</i>	5,4	12,0	11,8	11,2	3,6	—	2,0	2,1	2,1
7. Boa Nova, BA	11,8	13,2	11,1	10,4	12,1	12,6	—	2,5	2,4
8. <i>S. indigoticus</i>	17,3	17,8	15,9	13,2	17,7	15,9	18,2	—	1,5
9. <i>S. psychopompus</i>	18,5	16,9	14,9	15,4	18,5	17,2	17,2	8,4	—

Tabela 4. Distância genética (K2P, abaixo) e o erro padrão (acima, obtido com 500 replicações de bootstrap) para o segmento o *cyt b* entre as espécies de *Scytalopus* (em percentagem).

Taxon	1	2	3	4	5
1. <i>S. sp. nov. 2</i>	—	1,7	1,5	1,2	1,0
2. <i>S. speluncae</i> sul	11,1	—	1,1	1,6	1,5
3. <i>S. speluncae</i> norte	9,1	6,1	—	1,5	1,4
4. <i>S. novacapitalis</i>	6,0	9,9	9,1	—	0,9
5. <i>S. sp. nov 1</i>	4,3	8,9	7,9	3,4	—

Tabela 5. Distância genética (K2P, abaixo) e o erro padrão (acima, obtido com 500 replicações de bootstrap) para o segmento da RC entre as espécies de *Scytalopus* (em porcentagem).

Taxon	1	2	3	4	5	6
1. <i>S. Sp. nov. 2</i>	—	1,0	1,0	0,8	0,8	1,1
2. <i>S. speluncae</i> sul	4,2	—	0,5	0,9	1,0	1,0
3. <i>S. speluncae</i> norte	3,9	1,2	—	0,9	0,9	0,9
4. <i>S. novacapitalis</i>	2,7	3,5	3,3	—	0,5	1,0
5. <i>S. Sp. nov 1</i>	3,1	4,1	3,8	1,6	—	1,0
6. <i>S. iraiensis</i>	4,7	4,4	3,7	4,1	3,9	—

De um modo geral, as espécies e os principais clados mostram-se bem divergentes entre si (ND2, tabela 3), estando seus valores muito acima da média (1,8%) encontrada entre espécies irmãs em aves (Johnson e Cícero, 2004). Note-se que a menor divergência do indivíduo de Boa Nova, BA (com *S. speluncae* sul e *S. speluncae* norte) ficou acima dos 10%, corroborando a posição isolada deste haplótipo nas filogenias. Também é importante salientar que a menor divergência de *S. psychopompus* é com *S. indigoticus* em 8,4% e que a linhagem *S. speluncae* sul apresenta uma divergência de 9% da do norte. As duas espécies novas e *S. novacapitalis* são as espécies que possuem menores distâncias entre si, mas todas estas acima de 3%. Os valores relativos com os outros marcadores são concordantes.

A tabela 6 apresenta as estatísticas básicas de diversidade intraespecífica das unidades evolutivas com amostragem suficiente. As duas espécies novas amostradas apresentam alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica, semelhante entre os diferentes marcadores. *S. speluncae* como um todo apresentou alta diversidade nucleotídica nas estimativas para ND2 e *cyt b*, porém, interessantemente mais baixa em alguns casos para a região controle. A diversidade nucleotídica maior em *S. speluncae* se deve ao fato desta espécie ser composta por dois clados bastante divergentes (norte e sul). Quando analisamos apenas o clado *S. speluncae* sul, o qual apresenta um tamanho amostral maior, a diversidade assume valores semelhantes às outras duas espécies, apesar do clado norte ainda apresentar

um valor alto. Na tabela 6 também são apresentadas as estatísticas para as populações dentro de cada espécie com amostragem suficiente: populações nordeste e sul de *S. sp. nov. 2*, população da Serra do Caraça de *S. sp. nov. 1* e clados (ou espécies, ver Discussão) norte e sul de *S. speluncae*. A diversidade nucleotídica (π) encontrada varia bastante entre as diferentes unidades evolutivas. As diversidades nucleotídicas mais altas (para ND2) são para o clado norte de *S. speluncae* e a população da Serra do Caraça de *S. sp. nov. 1*.

A tabela 6 também apresenta as estatísticas D de Tajima e Fs de Fu, que apresentam uma grande variação nos valores, de positivos para significativamente negativos. Considerando principalmente os resultados com ND2, por possuírem mais dados, podemos observar que os únicos valores significativos foram para o D de Tajima negativo de *S. sp. nov. 1*, o que sugere uma expansão populacional precedida de algum grau de *bottleneck*. Valores negativos próximos da significância foram também obtidos para a população nordeste de *S. sp. nov. 2* enquanto a população sul desta espécie, ao contrário, apresentou um valor positivo alto (mas não significante).

A tabela 7 demonstra a diversidade genética entre amostras de diferentes localidades (algumas vezes representadas por apenas um espécime) de *S. novacapitalis*, *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2*. O indivíduo de Lavras é o mais divergente da espécie de *S. sp. nov. 1*. As populações de *S. sp. nov. 2* apresentam uma divergência média ao redor de 1%.

Os dados obtidos através de análises de diferenciação (F_{ST}) com ND2 e *Cyt b* (Tabela 8) indicam que entre as populações nordeste e sul de *S. sp. nov. 2* praticamente não ocorre fluxo gênico ($Nm \ll 1$), sendo, portanto, populações efetivamente isoladas. A diferença média entre estas duas populações é de 0,8% (Tabela 7, ND2). As estimativas para *S. speluncae* confirmam o que já foi visto na filogenia, indicando que os clados norte e sul são muito estruturados ($F_{ST} = 0,87$ e $Nm < 0,1$) e com alta divergência genética (p.ex. 9% para ND2, Tab. 3).

Tabela 6. Estatísticas básicas de diversidade intraespecífica.

	NS	NH	Hd (D.P.)	π (D.P.) (%)	D (Tajima)	Fs (Fu)
ND2						
<i>S. sp. nov. 2</i>	21	8	0,824 (0,054)	0,55 (0,07)	-0,033	-1,003
sul	9	2	0,556 (0,090)	0,11 (0,02)	1,401	1,015
nordeste	10	4	0,533 (0,180)	0,12 (0,05)	-1,562	-1,96
<i>S. sp. nov. 1</i>	11	7	0,818 (0,119)	0,37 (0,12)	-1,989*	-3,187
Serra do Caraça	5	5	1 (0,126)	0,64 (0,22)	-1,174	-2,116
<i>S. speluncae</i>	13	10	0,923 (0,069)	4,20 (0,97)	0,817	0,995
<i>S. speluncae</i> norte	4	4	1,00 (0,177)	1,80 (0,84)	-0,851	0,210
<i>S. speluncae</i> sul	9	6	0,833 (0,127)	0,31 (0,08)	-0,654	-2,872
Cyt b						
<i>S. sp. nov. 2</i>	12	6	0,803 (0,096)	0,65 (0,18)	-0,262	-0,479
sul	5	3	0,700 (0,218)	0,23 (0,08)	0,243	-0,475
nordeste	5	1	0	0	-	-
<i>S. sp. nov. 1</i>	12	7	0,864 (0,079)	0,42 (0,10)	-1,229	-2,837
Serra do Caraça	5	3	0,800 (0,164)	0,22 (0,06)	0,243	-0,475
<i>S. speluncae</i>	11	5	0,618 (0,164)	2,20 (0,94)	-0,399	4,083
<i>S. speluncae</i> sul	9	3	0,417 (0,191)	0,20 (0,10)	-1,609	0,134
RC						
<i>S. sp. nov. 2</i>	14	4	0,626 (0,110)	0,48 (0,09)	-0,562	1,004
<i>S. sp. nov. 1</i>	10	7	0,867 (0,107)	0,67 (0,21)	-1,458	-2,435
<i>S. speluncae</i>	10	5	0,756 (0,130)	0,61 (0,16)	-0,686	-0,209
<i>S. speluncae</i> sul	8	3	0,607 (0,164)	0,35 (0,12)	-0,524	0,775

NS = Número de seqüências; NH = Número de haplótipos; Hd = Diversidade haplotípica; π = Diversidade nucleotídica. * $P < 0,05$

Tabela 7. Distâncias genéticas (em percentagem) entre as diferentes localidades do clado *S. sp. nov. 1*, *S. sp. nov. 2* e *S. novacapitalis* (ND2 em baixo e cyt b acima).

Grupos geográficos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>S. sp. nov. 2</i> noroeste	—	1,6	1,5	6,1	4,3	3,9	4,2	4,0	4,0
2 <i>S. sp. nov. 2</i> nordeste	1,0	—	0,4	6,0	4,7	4,3	4,5	4,4	4,4
3 <i>S. sp. nov. 2</i> sul	1,3	0,8	—	5,9	4,6	4,2	4,5	4,4	4,4
4 <i>S. novacapitalis</i>	5,3	5,0	4,9	—	3,7	3,3	3,5	3,4	3,4
5 <i>S. sp. nov. 1</i> Lavras	6,0	5,4	5,8	3,4	—	0,6	0,8	0,7	0,5
6 <i>S. sp. nov. 1</i> Serra do Caraça	6,2	5,7	6,0	3,7	0,7	—	0,4	0,2	0,4
7 <i>S. sp. nov. 1</i> Serra do Cipó	6,0	5,4	5,8	3,4	0,4	0,3	—	0,4	0,6
8 <i>S. sp. nov. 1</i> Diamantina	6,1	5,5	5,9	3,5	0,5	0,4	0,1	—	0,5
9 <i>S. sp. nov. 1</i> Bocaina de Minas	6,0	5,4	5,8	3,4	0,4	0,3	0,0	0,1	—

Tabela 8. Diferenciação intra-específica de algumas espécies estudadas.

População 1	População 2	Distância Média (Km)	ND2				Cyt <i>b</i>			
			Fst	NS	NH	Nm	Fst	NS	NH	Nm
<i>S. sp. nov.</i> 2 nordeste	<i>S. sp. nov.</i> 2 sul	300	0,841	19	6	0,09	0,72	10	4	0,19
<i>S. speluncae</i> norte	<i>S. speluncae</i> sul	900	0,87	19	13	0,07	0,97	9	4	0,01

NS = Número de seqüências; NH = Número de haplótipos; Nm = número de migrantes entre populações.

4.4. Networks

Clado *S. sp. nov.* 1, *S. sp. nov.* 2 e *S. novacapitalis*

As redes de haplótipos do clado formado por *S. sp. nov.* 1, *S. novacapitalis* e *S. sp.* 2 baseados nos dados de ND2 (Fig. 11.a), *cyt b* (Fig. 11.b) e região controle (Fig. 11.c) apresentam o haplótipo de *S. novacapitalis* como intermediário entre os haplótipos das outras duas espécies, estando mais próximo de *S. sp. nov.* 1.

Os haplótipos de *S. sp. nov.* 1 são pouco divergentes e, de modo geral, não estão geograficamente estruturados. No caso do ND2 (Fig. 11.a), existe um haplótipo central mais freqüente que está presente em todas as regiões amostradas, exceto Lavras, e do qual se originam os outros, um padrão conhecido como “star tree”, e que é uma assinatura de uma expansão demográfica forte precedida de diminuição populacional. Um padrão semelhante pode ser visto no *network* do *cyt b* (Fig. 11.b). A rede de haplótipos originada dos dados da RC (Fig. 11.c) apresenta uma estrutura semelhante às das outras duas, porém, o haplótipo de Lavras, neste caso, é ainda mais divergente. O haplótipo de Lavras é o mais próximo do haplótipo de *S. novacapitalis*.

Os haplótipos de *S. sp. nov.* 2 também apresentam baixa divergência entre si, porém, são claramente estruturados geograficamente em três regiões (sul, noroeste e nordeste) nos dados de ND2 (Fig. 12a), *cyt b* (Fig. 12b) mas não na rede de haplótipos da região controle (Fig. 12c). As relações entre estes três grupos de haplótipos sugeridas pelos *networks* de ND2 e *cyt b* são diferentes. O *network* do segmento ND2 sugere um sinal de expansão populacional para a população nordeste, corroborado pelas estatísticas da tabela 6.

Scytalopus speluncae

De uma maneira geral, as *networks* dos haplótipos da espécie descrita como *S. speluncae* (Fig. 12), demonstram que a mesma está dividida em dois clados geograficamente estruturados e bastante divergentes (não consideramos nestas análises o indivíduo altamente divergente de Boa Nova, BA). Um dos clados (aqui chamado de *S. speluncae* norte) reúne os espécimes que ocorrem acima do norte do estado de São Paulo e o outro (chamado de *S. speluncae* sul) reúne aqueles que ocorrem do estado do Paraná até o Rio Grande do Sul (Fig.1). Os haplótipos do clado sul têm baixa divergência entre si, com pouca estruturação geográfica, apesar dos dois haplótipos do norte do Paraná (25 e 26) diferirem daqueles mais ao sul. O clado *S. speluncae* norte também apresenta baixa divergência (apesar da baixa amostragem), porém, para o ND2 um haplótipo da Serra do Caparaó (Divino, MG) está bem isolado da população da Serra da Mantiqueira, por 15 passos mutacionais. Como já referido, o haplótipo 62 de Boa Nova (BA) é extremamente divergente dos outros haplótipos de *S. speluncae* (Fig. 3 e Tabela 3), tanto sul quanto norte.

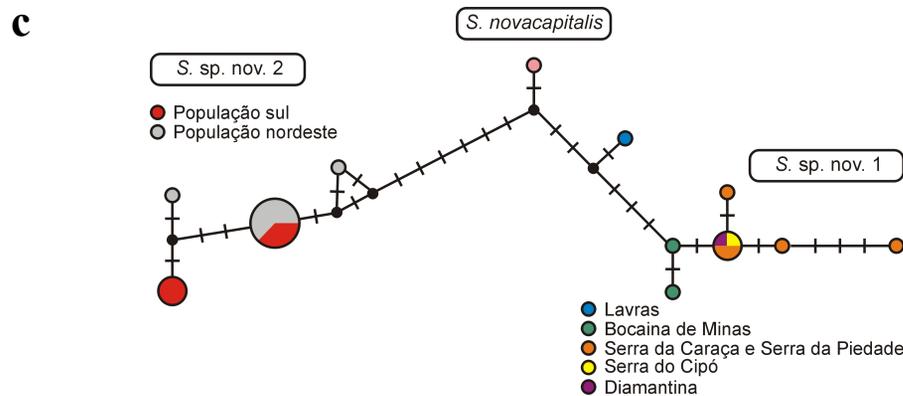
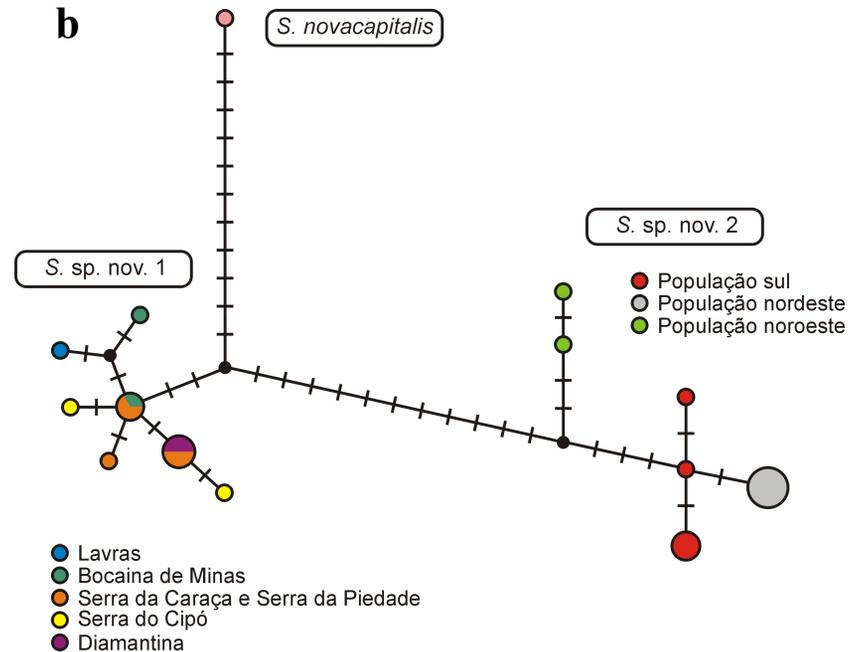
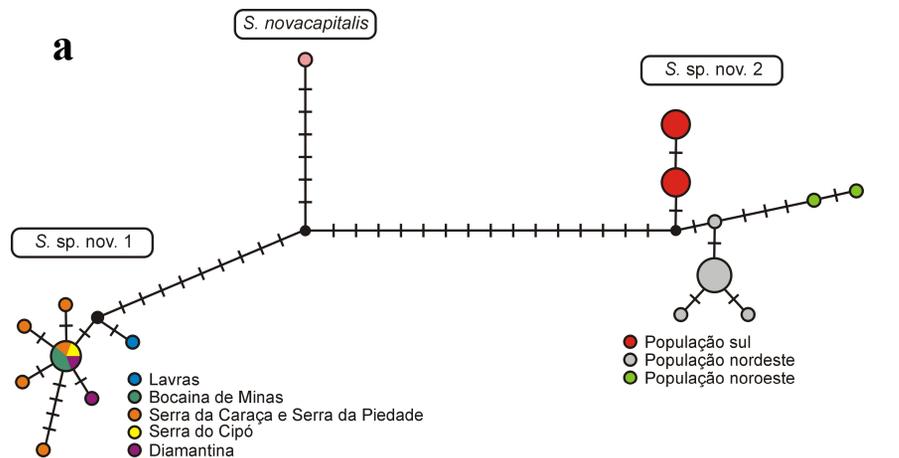


Figura 11. Rede de haplótipos das espécies de *S. novacapitalis*, *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2*, baseados nos dados de ND2 (a), *cyt b* (b) e região controle (c). Os pontos pretos correspondem a haplótipos hipotéticos; o diâmetro dos círculos é proporcional ao número de indivíduos com o respectivo haplótipo.

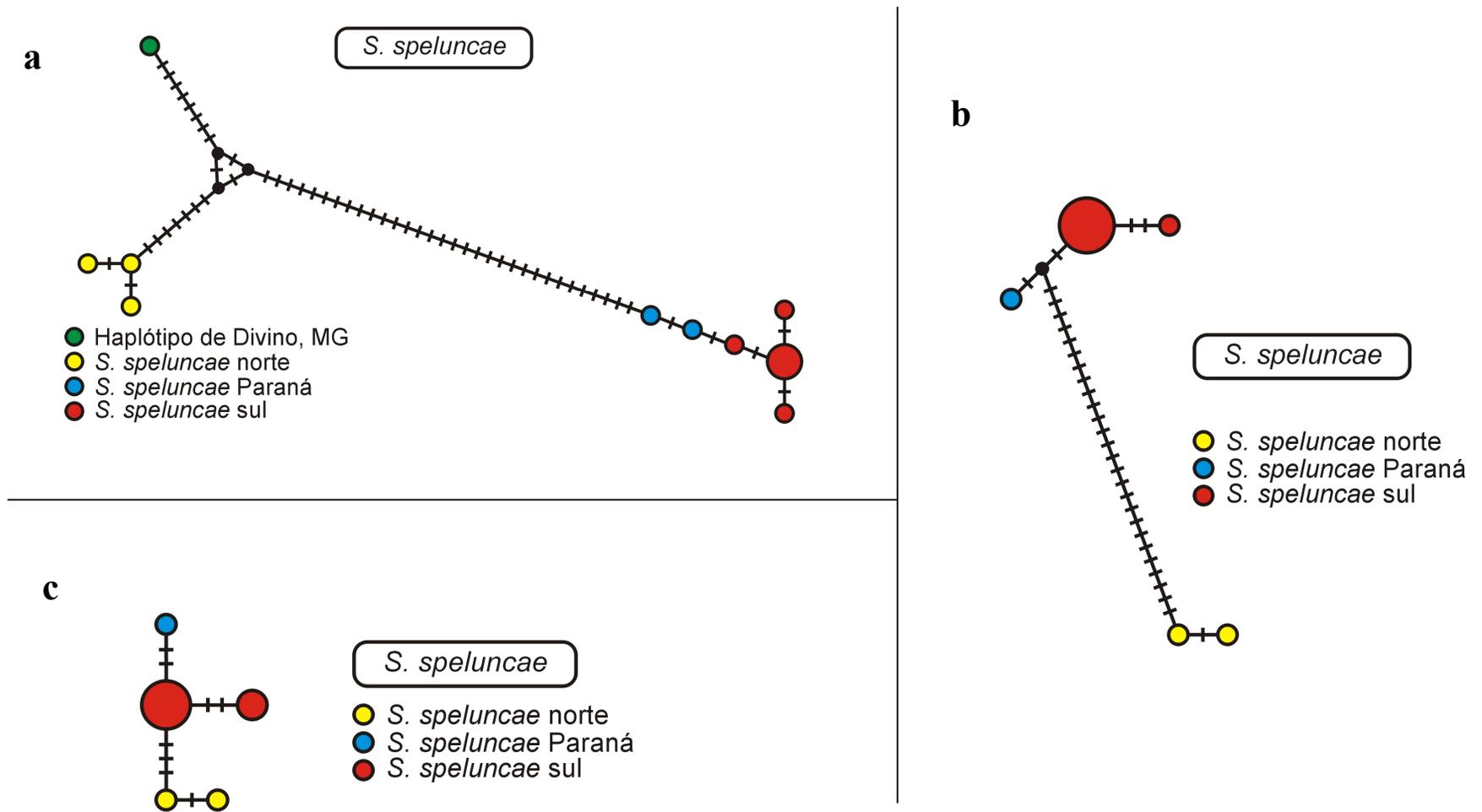
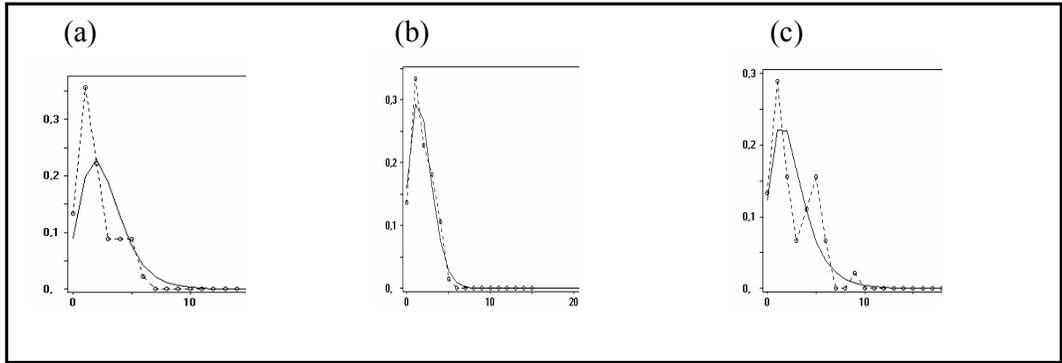


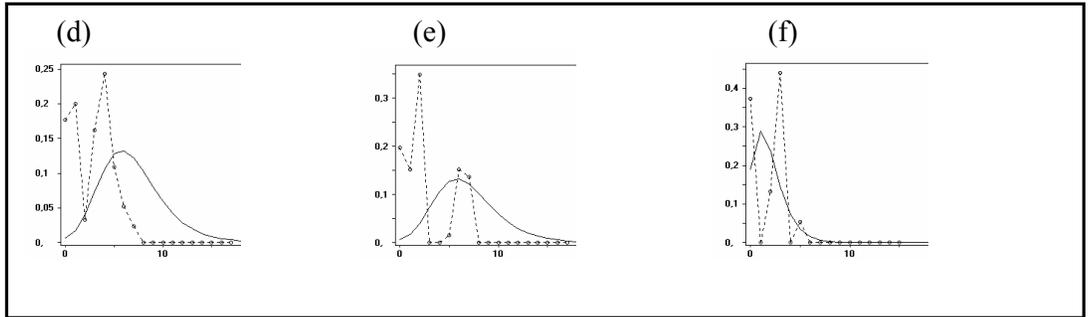
Figura 12. Rede de haplótipos de *S. speluncae*, baseados nos dados de ND2 (a), *cyt b* (b) e região controle (c). Os pontos pretos correspondem a haplótipos hipotéticos; o diâmetro dos círculos é proporcional ao número de indivíduos com o respectivo haplótipo.

4.5. *Mismatch distributions*

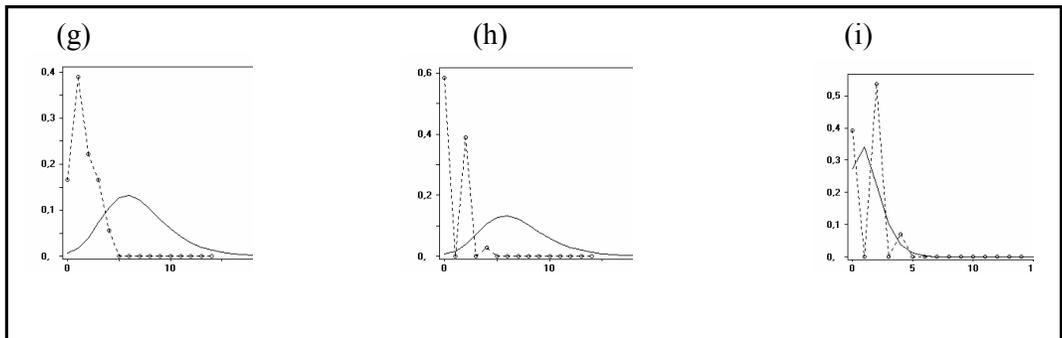
Os gráficos da distribuição das diferenças pareadas (*mismatch distribution*) para *S. sp. nov. 1* (Fig. 13, a-c) mostram-se basicamente unimodais nos segmentos de ND2 e *cyt b*, mas mais irregulares para a RC. Gráficos unimodais são assinaturas de populações com história de expansão populacional partindo de um pequeno tamanho efetivo. Para *S. sp. nov. 2*, as distribuições mostram-se com múltiplos picos para os três segmentos (Fig. 13, d-f), sugerindo uma espécie com estrutura populacional ou com uma população grande e estável. Já para o clado *S. speluncae* sul (Fig. 13, g-i) o gráfico construído com base em ND2 mostra-se unimodal mas com mais de uma moda nos demais segmentos, contudo, os resultados para esta espécie devem ser tratados de forma cautelosa devido ao pequeno tamanho amostral (8-9 indivíduos).



S. sp nov. 1 ND2 (a), *cyt b* (b) e RC (c).



S. sp nov. 2 ND2 (d), *cyt b* (e) e RC (f).



S. speluncae sul ND2 (g), *cyt b* (h) e RC (i).

Figura 13. *Mismatch distribution* para os segmentos ND2, *cyt b* e RC.. Eixo x: número de diferenças; eixo y: frequência. (Linha contínua = distribuição esperada para uma população em crescimento; Linha pontilhada = distribuição observada).

5. DISCUSSÃO

5.1. Relações filogenéticas

Todas as filogenias moleculares obtidas neste trabalho corroboram a hipótese de Maurício (no prelo) de que os *Scytalopus* brasileiros são compostos por dois grupos. O primeiro grupo, formado por *S. indigoticus* e *S. psychopompus*, além dos caracteres moleculares, compartilha a coloração branca nas partes ventrais, azul-acinzentado nas partes superiores e laterais (Maurício, 2005, Del Hoyo, 2003) e canto similar (Bornschein *et al.*, 2005).

O segundo, representa o grupo *S. speluncae* (*sensu* Maurício, 2005) e baseado em caracteres vocais (canto típico com repetições longas e monótonas de uma nota simples) e de plumagem, é composto por *S. speluncae*, *S. iraiensis*, *S. novacapitalis*, *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2*. As estimativas moleculares demonstram que estas espécies formam um grupo monofilético com alto suporte. Dentro do grupo *S. speluncae* encontrou-se o subgrupo reunindo *S. novacapitalis*, *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2*, com alto suporte estatístico em todos os métodos e genes. Este subgrupo apresenta um canto com aceleração final, considerado uma sinapomorfia por Maurício (2005).

Scytalopus iraiensis permanece com suas relações filogenéticas não resolvidas dentro do grupo *S. speluncae* (*sensu* Maurício, 2005), não permitindo, no presente momento, inferir uma posição filogenética mais clara. Contudo, observa-se um agrupamento mais freqüente desta espécie junto ao clado de *S. novacapitalis* e das duas espécies novas, ao longo das avaliações resultantes das diferentes metodologias e genes utilizadas. Um aumento no número de nucleotídeos estudados é necessário para inferir, com maior segurança, as relações de parentesco de *S. iraiensis*.

A relação filogenética entre *S. novacapitalis* e as duas espécies novas também não ficou totalmente resolvida, tendo *S. novacapitalis* se agrupado em todas as situações com *S. sp. nov. 1*, porém, agrupou-se com *S. sp. nov. 2* na árvore de ML. Portanto, se considerarmos os resultados obtidos quanto à distância genética, o consenso entre a maioria das filogenias construídas, bem como os caracteres de plumagem, *S. novacapitalis* é possivelmente o grupo irmão de *S. sp. nov. 1*.

A espécie considerada atualmente como *S. speluncae* apresenta dois cladogramas principais bastante divergentes entre si e em relação às demais espécies do grupo *S. speluncae*, bem como um terceiro clado não agrupado com estes dois (Boa Nova, BA). O agrupamento dos

clados norte e sul em um grupo monofilético apresenta baixo suporte nas árvores baseadas no ND2, não podendo ser corroborado com estes dados. A existência destas três entidades taxonômicas distintas é corroborada por outras evidências independentes (ver abaixo).

5.2 Unidades taxonômicas (delimitação das espécies)

Apesar de se considerar que a definição de espécie não pode ser proposta apenas com base na proporção de diferenças genéticas, atualmente o conhecimento da estruturação genética contribui enormemente para o entendimento da origem e dos limites das espécies (Ball & Avise, 1992; Avise, 2000; Frankham *et. al.*, 2004). No presente caso, um bom exemplo é *Scytalopus speluncae*, que compõe um grupo geneticamente distinto mas que parece ser formado por mais de uma espécie. O clado norte de *S. speluncae* é geneticamente bem divergente do clado sul, sendo esta diferença bem acima da média para a diferenciação entre espécies irmãs (Johnson & Cícero 2004). Esta divergência foi encontrada em todos os genes e métodos testados (todos com alto suporte de *bootstrap*). Esta diferenciação entre forma norte e forma sul é corroborada por caracteres morfológicos e bioacústicos (diferentes medidas de asa, cauda e tarso e por algumas diferenças na nota do canto e grito de alarme; Maurício, 2005), o que fez com que este autor sugerisse que a forma sul se trata de outra espécie.

O indivíduo de Boa Nova apresentou também um alto nível de divergência (em média, acima de 10%) dos outros *S. speluncae*, em um clado isolado (Fig. 2, 3 e 4), também compatível com a separação taxonômica em nível de espécie. Este indivíduo de Boa Nova está geograficamente isolado na Serra do Ouricana e embora não seja morfológicamente muito diferente dos demais *S. speluncae*, parece ser mais uma nova espécie a ser descrita (G. Maurício e colaboradores, com. pessoal).

Além disso, o *S. speluncae* clado norte possui um indivíduo (número 61) bem divergente (3,4%, erro padrão=0,8%), amostrado apenas para ND2 (Figs. 2 e 12). Este indivíduo, proveniente de uma serra isolada no município de Divino, no leste de Minas Gerais, está separado por uma distância de aproximadamente 380 km da amostra mais próxima (Pico dos Marins; ver Tab. 1) do seu respectivo clado.

Scytalopus psychopompus é uma espécie que tem tido sua validade questionada por alguns autores, tais como Gonzaga *et al.* (1995) e Krabbe & Schulemberg (1997). Os resultados moleculares do segmento de ND2, tais como a distância genética e as filogenias sugerem uma grande diferenciação desta com a sua espécie irmã, *S. indigoticus*. Estes

resultados corroboram dados bioacústicos e morfológicos (Bornschein, *et. al.*, 2005), segundo os quais *S. psychopompus* difere de *S. indigoticus* na coloração da plumagem (ausência de barramento nos flancos e coloração cinza-azulada das penas da tíbia), no tamanho e em certos parâmetros vocais. Portanto, todas as evidências apontam para que *S. psychopompus* seja considerada uma espécie válida.

Os resultados baseados em análises genéticas populacionais (Figs 11 e 12) forneceram subsídios para distinguir melhor *S. novacapitalis* de *S. sp. nov. 1*. Estas espécies estão tão proximamente relacionadas quanto à sua morfologia e canto, principalmente por compartilharem semelhante tamanho e coloração mais clara nas partes inferiores. que, inclusive, *S. sp. nov. 1* havia sido atribuída anteriormente à *S. Novacapitalis*.

Do mesmo modo, apesar do status específico de *S. sp. nov. 2* estar bem suportado por diversas características morfológicas e bioacusticas (Maurício, 2005), os resultados aqui apresentados corroboram ainda mais a validade desta nova espécie.

5.3 Diversidade intraespecífica

Scytalopus sp. nov. 1.

Os resultados, tais como as *networks* construídas para as três regiões do mtDNA, sugerem que a diversidade genética desta espécie não está estruturada geograficamente. Além disso, o teste F_s de F_u , com resultados significativamente negativos (para ND2) bem como a distribuição unimodal do gráfico de *mismatch distribution* (Fig.13) sugerem, para esta espécie, uma história de expansão populacional relativamente recente precedida de *bottleneck*.

Porém, um haplótipo obtido de um indivíduo de Lavras (MG) apresenta-se um pouco diferenciado dos demais indivíduos da sua espécie nas *networks*, nas distâncias genéticas (ver tab. 7) e nas filogenias construídas. É importante notar que a população de *S. sp. nov. 1* de Lavras está mais isolada das demais com relação à proximidade de montanhas e em altitude menor (822m) que a média das demais populações (ver Introdução). Entretanto, esta diferenciação é pequena comparada aos valores encontrados entre diferentes espécies nestes estudo e mesmo entre as populações geográficas de *S. sp. nov. 2* (Tab. 7).

Scytalopus sp. nov. 2.

As três populações de *S. sp. nov. 2* (sul, nordeste e noroeste) apresentaram-se relativamente bem divergentes e estão de modo geral estruturadas conforme as suas respectivas distribuições geográficas. Isto pode ser visualizado através das *networks* e nas

árvores filogenéticas (p.ex.: Figs 3, 4 e 6), assim como do F_{ST} alto entre as populações de *S. sp. nov. 2* sul e nordeste (não calculado para a população noroeste devido à sua pequena amostragem). A divergência genética média de 1,1% entre as três populações (Tab. 8) está abaixo da média de 1,8% para espécies irmãs (Johnson & Cícero, 2004). As diferenças moleculares encontradas entre as três populações de *S. sp. nov. 2* corroboram aquelas morfológicas e bioacústicas encontradas por Maurício (2005).

5.4 Morfologia e ecologia

Considerando-se que a evolução de um fenótipo (espécies) depende da adaptação às mudanças do meio ambiente em que ele vive (Pianka, 1994; Mallet, 1996), através da análise de uma hipótese filogenética bem construída é possível demonstrar o relacionamento de vários caracteres ecológicos e comportamentais de um táxon.

Nos *Scytalopus* spp. estudados, as espécies que apresentam simpatria, (*S. speluncae*–*S. sp. nov. 2*), (*S. speluncae*–*S. iraiensis*), (*S. speluncae*–*S. sp. nov. 1*) e (*S. speluncae*–*S. indigoticus*), apresentam-se ecologicamente (em relação a habitat ou/e altitude) mais divergentes (Bornschein, 1998; Vielliard, 1990; Maurício, 2005) e geneticamente mais diferenciadas do que as que estão em alopatria (*S. novacapitalis*, *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2*). Este padrão é semelhante ao encontrado em outros grupos andinos (Garcia Moreno *et al.*, 2001) e andino patagônicos (Cheviron *et al.*, 2005) de Passeriformes; porém, não concordante com o modelo de divergência ecológica apresentado para *Scytalopus* andinos por Arctander & Fjeldsá (1994). Contudo, em nível de divergência genética o padrão de *Scytalopus* andinos estudados mostrou-se semelhante às espécies brasileiras.

Conforme já mencionado anteriormente, apesar da diferenciação genética elevada entre a maioria das espécies, todas as espécies de *Scytalopus* são relativamente semelhantes em morfologia e até mesmo na vocalização. Esta semelhança retardou, de certa forma, o reconhecimento de novas espécies. Este aspecto é particularmente ilustrado por Sick (1997), ao referir-se a *S. novacapitalis*: “foi uma surpresa encontrar posteriormente *S. novacapitalis* sobre as serras mineiras da mesma altitude como o Distrito Federal”.

Por esta razão, cabe aqui mencionar que, até algumas décadas atrás, só havia duas espécies descritas do gênero no Brasil: *S. speluncae* e *S. indigoticus*. Estas correspondem hoje aos dois grandes grupos mais diferenciados: (1) grupo *speluncae* sensu Maurício (2005) – com cinco espécies até o momento e (2) grupo *S. indigoticus/S. psychopompus* – com as duas espécies nominais, até o presente. Dentro destes grupos existem diferentes graus de

variação fenotípica. Contudo, esta divergência entre as espécies não é tão grande em comparação com as diferenças encontradas entre espécies andinas proximamente relacionadas (Arctander e Fjeldsá, 1994, Del Hoyo, 2003), sugerindo uma pressão seletiva menor sobre a morfologia, e/ou até mesmo sobre a vocalização. Esse padrão é claramente observado na espécie considerada hoje como *S. speluncae*. A forma sul, a forma norte e o indivíduo de Boa Nova, possuem alta divergência genética (em nível de espécie); embora estejam geograficamente isoladas, habitam ambientes similares. Apesar de existirem algumas diferenças fenotípicas entre elas, estas populações possuem fenótipos muito semelhantes.

Em outras espécies, contudo, existem maiores divergências morfológicas e/ou bioacústicas, provavelmente, por habitarem ambientes diferenciados. Um possível exemplo disto é *S. novacapitalis*, que pode ter sofrido seleção mais intensa, principalmente na vocalização, devido ao fato de habitar florestas de galeria, um ambiente linear (onde o som se propaga de forma reta através de longas distâncias). Segundo Vielliard (1990), esta espécie teria evoluído para um canto que percorre maiores distâncias, e deste modo, tornou-se mais lento e de maior intensidade.

5.5 Diferenciação

Tanto as distâncias geográficas como a proximidade entre montanhas mais altas são bem menores entre as populações de *S. sp. nov. 1* do que em *S. sp. nov. 2* e *S. speluncae*. Isto pode explicar o padrão diferente encontrado em *S. sp. nov. 1*, que, possivelmente, devida a uma maior conectividade entre populações, isolaram-se mais recentemente, mostrando haplótipos geograficamente difundidos, embora outros regionalmente diferenciados. Interessantemente, o modelo encontrado para o gênero *Scytalopus* no presente estudo é semelhante ao descrito por Smith *et. al.* (2000) para *Andropadus tephrolaemus* e *Nectarinia oritis*, ambas restritas às florestas de montanhas africanas. Eles sugerem que as suas especiações foram alopátricas (possivelmente devido a mudanças paleoclimáticas) e atribuem a menor diferenciação entre populações das montanhas do norte à maior conectividade entre elas, possivelmente devido a corredores que permitiram a dispersão e fluxo gênico entre as montanhas.

Arctander & Fjeldsá (1994) argumentaram que a especiação de *Scytalopus* foi alopátrica a partir de populações pequenas e isoladas e que a atual distribuição das espécies deve-se a eventos secundários. O modelo de especiação por vicariância poderia se aplicar às espécies brasileiras devido à grande divergência genética com estruturação geográfica

encontrada entre elas, ao não compartilhamento de haplótipos, além dos aspectos eto-ecológicos, tais como: sedentarismo, baixa capacidade de vôo, territorialismo e, também, pelo fato de habitarem montanhas sujeitas a isolamento. Assumindo-se que tenha ocorrido uma especiação alopátrica, podemos supor cenários que sugerem que a especiação dos *Scytalopus* brasileiros deveu-se a barreiras topográficas formadas durante a construção de montanhas ou por efeito de *bottleneck* e posterior fragmentação de populações relacionadas com instabilidades ecoclimáticas, ou ainda, devido a ambas. Esta mesma dúvida foi encontrada por Garcia Moreno *et al.* (1998) para tiranídeos andinos.

A ocupação de novos ambientes pelos *Scytalopus* parece obedecer ao padrão de deslocamento altitudinal encontrado no gênero (Arctander & Fjedså, 1994; Krabbe & Schulenberg, 1997; Whitney, 1994) e que pode ser observado em *S. sp. nov. 1* e *S. sp. nov. 2* que teriam se deslocado para altitudes maiores ou para o sul, possivelmente buscando temperaturas mais baixas (Maurício, 2005; Vasconcelos, com. pessoal). Isto pode ser um indicativo de que influências climáticas poderiam ter modelado o padrão de distribuição, isolamento e, conseqüentemente a especiação do gênero no Brasil. Encontra-se esta opinião também na literatura (Arctander & Fjedså, 1994; Krabbe & Schulenberg, 1997; Sick, 1997; Maurício, 2005). Fjeldså & Lovett (1997) sugerem que não é necessária uma barreira física para especiação e que uma heterogeneidade espaço-temporal (como zona tampão) poderia manter espécies. Segundo estes autores, a estabilidade ambiental, mantida por características climáticas e/ou geológicas (principalmente topografia) influencia a persistência de espécies antigas (áreas museus), mas, por outro lado, a instabilidade do ecossistema afeta a distribuição das espécies, sendo esta conseqüência de um *turnover* na comunidade (Fjeldså & Lovett, 1997; Fjeldså *et al.* 1997).

Por outro lado, eventos geológicos parecem ter tido um papel muito importante na diferenciação da fauna em zonas tropicais (Moritz *et al.* 2000; Costa, 2003). Por exemplo, eventos orogênicos podem estar diretamente envolvidos na divisão de alguns ramos como *S. speluncae* forma norte e *S. speluncae* forma sul. Maurício (2005) sugere que eventos ocorridos no Plioceno, durante a formação da falha geológica do rio Tietê (Almeida, 1976) poderiam ser a causa desta divisão. Coincidentemente a divergência entre as seqüências destas duas formas (Tabs. 3 e 4), utilizando a taxa de divergência de 2% por milhão (Lovette, 2004), é de ~4,5 milhões de anos para ND2 e ~3,0 milhões de anos para *cyt b*. Apesar destas estimativas não serem precisas, os dados indicam que a divisão dos ramos das espécies de *Scytalopus* brasileiras é antiga (anterior ao Pleistoceno). Até mesmo o grupo que aparentemente apresenta uma radiação mais recente (ver árvores e *networks*) - *S.*

novacapitalis, *S. sp. nov 1* e *S. sp. nov 2* - possuem uma divergência média de 4,5% (~2,25 milhões de anos) para ND2 e *cyt b*.

5.6 Implicações para conservação das espécies de *Scytalopus* brasileiras

Como já mencionado anteriormente, das cinco espécies de *Scytalopus* descritas no Brasil, *S. iraiensis* e *S. psychopompus* são consideradas globalmente ameaçadas de extinção e *S. novacapitalis* recebe o status de *near threatened* (BirdLife International, 2001). Além disso, *S. indigoticus* é considerada em Perigo de Extinção no Rio Grande do Sul (Bencke *et al.*, 2003). Para um grupo de espécies inconspícuas e de baixa variação morfológica como as espécies de *Scytalopus*, os dados moleculares tornam-se uma importante ferramenta para auxiliar a identificação de novas unidades evolutivas e taxonômicas bem como delimitar a real diversidade entre as variadas unidades taxonômicas já estabelecidas (Arctander & Fjeldsâ, 1994).

Scytalopus speluncae, única espécie sem problema aparente de conservação, é pobremente conhecida. Neste estudo, além de corroborar a validade das duas espécies que estão sendo descritas e que originalmente foram identificadas como *S. speluncae*, demonstrou-se que esta espécie contém mais três clados bastante divergentes (norte, sul e o indivíduo de Boa Nova, BA), e que, possivelmente, podem ser novas espécies. Por exemplo, é preocupante o fato do clado extremamente divergente representado pelo indivíduo de Boa Nova (Serra de Ouricana, sul da Bahia) ocorrer em uma área extremamente negligenciada em relação à conservação de aves no Brasil; mas de grande importância, pois se compõe de vários grupos de espécies endêmicas e ameaçadas (Gonzaga *et al.*, 1995).

A identificação como espécie válida é essencial para as estratégias de conservação bem como a delimitação, por meio dos dados genéticos e outros, da área de ocorrência destas espécies. O esclarecimento do status taxonômico específico é passo fundamental para a sua conservação, pois a legislação vigente no Brasil (e.g. Portaria IBAMA, 1522 de 1989; Lei 4771, de 1965) assim como as estratégias e os recursos econômicos destinados à conservação ainda estão focados nas espécies (Primack & Efrain, 2001). Neste sentido, a confirmação do status taxonômico específico de *S. psychopompus* e das duas novas espécies obtidos com os presentes dados genéticos é uma importante contribuição para preservação das mesmas.

Contudo, o paradigma do foco da conservação nas espécies está sendo modificado, e a importância de se conservar populações geograficamente divergentes, geneticamente

diferenciadas e com uma história evolutiva em comum é fundamental para preservar a variabilidade gênica como um todo (Mallet, 1997; Meffe & Carroll, 1997; Avise, 1992, 2000; Matioli, 2001; Frankham *et al.*, 2004). Portanto, a identificação de estruturação geográfica definida em *S. sp. 2* bem como de um possível clado divergente de *S. speluncae* norte amostrado em Divino, MG, reveste-se de importância. Futuros programas que visem a conservação de *Scytalopus* brasileiros e dos seus respectivos ecossistemas deverão considerar os diversos aspectos filogeográficos identificados neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accordi, I. A. 2003. *Estrutura espacial e sazonal da avifauna e considerações sobre a conservação de aves aquáticas em uma área úmida no Rio Grande do Sul, Brasil*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 163 p.
- Almeida, F. F. M. de. 1976. The system of continental rifts bordering the Santos Basin, Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 48 (Supplement): 15-26.
- Arctander, P. & J. Fjeldså, 1994. Andean tapaculos of genus *Scytalopus* (Aves, Rhinocryptidae): A study of speciation using DNA sequence data. Pages 205–225 In *Conservation Genetics* (V. Loeschke, J. Tomiuk, e S. K. Jain, eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Avise, J.C. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63: 62-76
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. London.
- Ball, Jr. M., R. & J. Avise. 1992. Mitochondrial DNA Phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies. *The Auk* 109: 626-636.
- Bandelt, H-J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bird Life International. 2000. *Threatened birds of the world*. Barcelona e Cambridge Lynx Edicions and Bird life international.
- Bencke, G. A. 2001. *Lista de referência das aves do Rio Grande do Sul*. FZBRS. Porto Alegre.
- Bencke, G. A., Fontana, C. S., Dias, R. A., Maurício, G. N. & J. K. F. Mähler Jr. 2003. Aves. In *Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul* (Fontana, C. S., Bencke, G. A & R. Reis, eds.). EDIPUCRS. Porto Alegre. 632 p.
- Bornschein, M., Reinert B. L., & M. Pichorim, 1998. Descrição, ecologia e conservação de um novo *Scytalopus* (Rhinocryptidae) do sul do Brasil, comentários sobre a morfologia da família. *Ararajuba* 6: 3-36.
- Bornschein, M. R., Maurício, G N., Gatto, C. A. F. R. & H. Mata. 2005. *Avaliação do status taxonômico do macuquinho-baiano Scytalopus psychopompus (Rhinocryptidae), com comentários sobre aspectos biológicos e conservação da espécie*. Relatório Técnico: Bird Life International, São Paulo.

- Cabbane, G. S. 2004. *Estudo da diferenciação genética populacional do Arapaçu rajado *Xiphorhynchus fuscus fuscus* no sudeste da floresta Atlântica pela análise de seqüências da região controladora do DNA mitocondrial*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Cheviron, Z. A., Capparella, A. P. & F. Vuilleumier. 2005. Molecular phylogenetic relationships among *Geositta* Miners (Furnariidae) and Biogeographic implications for avian speciation in Fuego-Patagonia. *The Auk* 122: 158-174.
- Collar, N. J., Gonzaga, L. P., Kragge, N., Madroño Nieto, A., Naranjo, L. G., Parker, T. A. & D. C. Wege. 1992. *Threatened birds of the Americas*. Smithsonian Institution Press. Washington and London. Third edition.
- Costa, E. P. 2003. The historical bridge between the Amazon and Atlantic forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30: 71-86.
- Del Hoyo, J; Elliot, A & J. Sargatal (eds.). 2002. *Handbook of the birds of the world*. Lynx Edicions. Vol. 7.
- Fjeldså, J. & J. C. Lovett. 1997. Geographical patterns of old and young species in african forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centres. *Biodiversity and Conservation* 6: 325-346.
- Fjeldså, J., Ehrlich, D., Lambin, E. & E. Prins. 1997. Are biodiversity “hotspots” correlated with current ecoclimatic stability? A pilot study using the NOAA-AVHRR remote sensing data. *Biodiversity and Conservation* 6: 401-422.
- Frankham, R., Ballou, J., D. & D. A., Briscoe (eds). 2004. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Garcia Moreno, J., Arctander, P., J. & J. Fjeldå. 1998. Pre-pleistocene differentiation among Chat-Tyrants. *The Condor* 100: 629-640.
- Garcia Moreno, J., Ohlson, J. & J. Fjeldå. 2001. MtDNA sequence support monophyly of *Hemispingus* Tanangers. *Molecular Phylogenetics and evolution* 21: 424-435.
- Gonzaga, L. P., Pacheco, J. F., Bauer C. & G. D. A. Castiglioni. 1995. An avifaunal survey of the vanishing montane Atlantic forest of Southern Bahia, Brazil. *Bird Conservation International* 5: 279-290.
- Hudson, R. R., Slatkin, M. & W. P. Maddison. 1992. Estimation of level of gene flow from sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Johnson, N. K. & C. Cicero. 2004. New mitochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in american birds. *Evolution* 58: 1122-1130.

- Karp, A.; G. P. Isaac & D. S. Ingram. 1998. *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman & Hall, London.
- Krabbe, N. & T. S. Schulenberg. 1997. Species limits and natural history of *Scytalopus tapacucos* (Rhinocryptidae), with description of the Ecuadorian taxa, including three new species. In *Studies in Neotropical ornithology honoring Ted Parker* (Ornithological Monographs N°. 48). Pages 47–88. The American Ornithologists' Union. Washington, D.C. 918 p.
- Kumar S., Tamura K. & M. Nei. 2004 MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lovette, I. J. 2004. Mitochondrial dating and mixed support for the “2% rule” in birds. *The Auk* 121:1-6.
- Mallet, J. 1997. The genetics of biology diversity: from varieties species. In Gaston, K.J. (ed). *Biodiversity: a biological of numbers and differences*. Blackwell Science Ltd.
- Matioli, S. R. (ed.). 2001. *Biologia molecular e evolução*. Holos. Ribeirão Preto.
- Maurício, G. N., 2003. *Taxonomia de populações meridionais de Scytalopus speluncae, com descrição de uma nova espécie (Aves: Rhinocryptidae)*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Biociências. PUCRS, Porto Alegre. 37p.
- Maurício, G. N., 2005. Taxonomy of southern populations in the *Scytalopus speluncae* group, with description of a new species and remarks on the systematics and biogeography of the complex (Passeriformes: Rhinocryptidae). *Ararajuba* 13: 5-26.
- Meffe, G. K. & C. R. Carroll (eds). 1997. *Principles of conservation biology*. Sinauer Associate, Sunderland. 729p.
- Mindel, D. P. (ed.). 1997. *Avian molecular evolution and sistematics*. Academic Press. San Diego, California.
- Moritz, C., Patton, J. L., Schneider C. J. & T. B. Smith. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 533-563.
- Pianka, E. R. 1994. *Evolutionary Ecology*. Harper Collins College Publisher. 5 th ed. 485p.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 917-818.
- Primack, R. B. & E. Rodrigues. 2001. *Biologia da conservação*. Midiograf. Londrina. 327p.
- Ramos-Onsins, S. E. & J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.

- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J. C., Messeguer X. & R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sick, H. 1995. Observations on the Andean-Patagonian component of Southeastern Brazil's avifauna. In *Neotropical Ornithology*. Washinton, D.C.: American Ornithologist's Union (Ornithological Monographs, 36), p. 233-237.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brasil. 836p.
- Silva, N. M. 2003. *Populações colonizadoras de mosca do figo (Zaprionus indianus) na cidade de Porto Alegre: aspectos ecológicos e moleculares*. Dissertação de mestrado. UFRGS.
- Smith, T. B., Holder, K., Girman, D., O'Keefe, K., Larison, B. & Y. Chan. 2000. Comparative avian phylogeography of Cameroon and Equatorial Guinea mountains: Implication for conservation. *Molecular Ecology* 9: 1505-1516.
- Sorenson, M, D. Avian mtDNA Primers. Disponível em julho de 2003, (<http://people.bu.edu/msoren/Bird.mt.Primers.pdf>).
- Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T. & D. Mindell. 1999. Primers for a PCR – based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and others vertebrates. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 12: 105-114.
- Swofford, D. L. 2003. *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*, version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. 1997. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Vielliard, J. M. E. 1990. Estudo bioacústico das aves do Brasil: O gênero *Scytalopus*. *Ararajuba* 1: 5-18.
- Whitney, B. 1994. A new *Scytalopus* Tapaculo (Rhinocryptidae) from Bolivia, with notes on other bolivian members of the genus and the *Magellanicus* complex. *Wilson Bull.* 106: 585-612.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Lista dos espécimes analisados (classificados por espécie).

Espécie	Nº	Localidade de coleta
<i>S. indigoticus</i>	63	Duas Barras, RJ
<i>S. indigoticus</i>	64	Boa Nova, BA
<i>S. indigoticus</i>	65	Boa Nova, BA
<i>S. iraiensis</i>	03	Banhado do Maçarico, RS
<i>S. iraiensis</i>	10	Banhado do Maçarico, Rio Grande, RS
<i>S. novacapitalis</i>	45	Brasília, DF
<i>S. psychopompus</i>	67	Una, BA
<i>S. sp. nov. 2.</i>	44	Bom Jardim da Serra, SC
<i>S. sp. nov. 1</i>	47	Lavras, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	48	Serra do Caraça, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	50	Serra do Caraça, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	51	Serra do Caraça, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	52	Serra do Caraça, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	54	Serra do Cipó, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	55	Diamantina, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	57	Diamantina, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	58	S. da Piedade, Caeté, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	59	Bocaina de Minas, MG
<i>S. sp. nov. 1</i>	60	Bocaina de Minas, MG
<i>S. sp. nov. 2</i>	01	Nonoai, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	05	Bom Jardim da Serra, SC
<i>S. sp. nov. 2</i>	07	Derrubadas, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	11	Morro Redondo, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	13	Canguçu, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	15	Canguçu, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	20	Morro Redondo, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	21	Pelotas, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	23	Capão do Leão, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	28	Bom Jardim da Serra, SC
<i>S. sp. nov. 2</i>	29	Bom Jardim da Serra, SC
<i>S. sp. nov. 2</i>	35	Cambará do Sul, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	37	Capão do Leão, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	39	S. José dos Ausentes, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	40	S. José dos Ausentes, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	41	Cambará do Sul, RS

Espécie	Nº	Localidade de coleta
<i>S. sp. nov. 2</i>	42	S. José dos Ausentes, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	43	S. José dos Ausentes, RS
<i>S. sp. nov. 2 *</i>	27	Capão do Leão, RS
<i>S. sp. nov. 2</i>	22	Capão do Leão, RS
<i>S. speluncae</i>	02	São Francisco de Paula, RS
<i>S. speluncae</i>	04	Pico dos Marins, Piquete, SP
<i>S. speluncae</i>	06	General Carneiro, PR
<i>S. speluncae</i>	09	Maquiné, RS
<i>S. speluncae</i>	12	Maquiné, RS
<i>S. speluncae</i>	17	São Francisco de Paula, RS
<i>S. speluncae</i>	18	São Francisco de Paula, RS
<i>S. speluncae</i>	19	São Francisco de Paula, RS
<i>S. speluncae</i>	25	Campina Grande do Sul, PR
<i>S. speluncae</i>	26	Campina Grande do sul, PR
<i>S. speluncae</i>	31	São Francisco de Paula, RS
<i>S. speluncae</i>	32	Delfim Moreira, MG
<i>S. speluncae</i>	33	Delfim Moreira, MG
<i>S. speluncae</i>	34	São Francisco de Paula, RS
<i>S. speluncae</i>	61	S. Caparaó, Divino, MG
<i>S. speluncae</i>	62	Serra da Ouricana, Boa Nova, BA



Apêndice 2. Esquerda para direita: *Scytalopus novacapitalis*; *Scytalopus* sp. nov. 2; *S. iraiensis* e *Scytalopus speluncae*. Foto Márcio Repenning.



Apêndice 3. *Scytalopus psychopompus* (dois da esquerda) e *S. indigoticus* (dois da direita). Foto Marcos R. Bornschein.