

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

**FILOGENIA MOLECULAR DE *CHIROXIPHIA* E *ANTILOPHIA*
(AVES: PIPRIDAE)**

CARLOS EDUARDO AGNE

PORTO ALEGRE - RS, 2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**FILOGENIA MOLECULAR DE *Chiroxiphia* E *Antilophia*
(AVES: PIPRIDAE)**

Autor: Carlos Eduardo Agne

Orientador: Dr. Sandro L. Bonatto

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2012

“A palavra *espécie* vem de uma raiz indo-europeia extremamente antiga, *spek*, que significa “aquilo que se vê”” (Bartleby, 2003).

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------|-----|
| Dedicatória..... | III |
| Agradecimentos..... | IV |
| Resumo..... | V |
| Abstract..... | VI |
| Introdução..... | 1 |
| Material e Métodos..... | 3 |
| Resultados..... | 10 |
| Discussão..... | 13 |
| Referências..... | 19 |

Dedico este trabalho aos meus pais, Gelcí e Toninho,
meu irmão Vine e minha namorada Aline, pelo
incentivo desde sempre, pela paciência,
e por tolerarem minha ausência durante este tempo.

Amo vocês, obrigado!

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esta pesquisa se tornasse possível. Em especial ao meu orientador, Sandro L. Bonatto, pela oportunidade, confiança e paciência. À Priscilla e Cladinara, aos demais colegas e amigos do Genoma, Carla, Lisie, Felipe. Aos colegas e amigos da ornito, Carla, Cybele, Muchacho, em especial ao Isma, com o qual tive o prazer em dividir o ap. por quase um ano.

Aos curadores ou gerentes das coleções que enviaram amostras, Alexandre Aleixo (MPEG), Mario Cohn-Haft e Camila Ribas (INPA), Péricles Sena Rêgo (UFPA – Campus Bragança), Luís Fábio Silveira (MZUSP), Carla Fontana (MCP – PUCRS), Donna L. Dittman (LSU), David Willard (FMNH).

Ao Alex Lees e Guy Kirwan que enviaram ou chamaram a atenção para bibliografias específicas, assim como Fernando Pacheco, que também auxiliou na discussão taxonômica, Marina Anciães pelos comentários e sugestões ao trabalho.

Um dos mais especiais agradecimentos é para minha colega e amiga Paola Pulido-Santacruz, por todos os ensinamentos, desde correr gel, fazer extração com kit, até as análises das sequências.

Resumo

O gênero *Chiroxiphia*, pequenos passeriformes da família Pipridae, compreende atualmente cinco espécies, sendo que *C. pareola*, a espécie com distribuição geográfica mais ampla, inclui quatro subespécies. Anteriormente, todos estes táxons foram tratados como espécies plenas, por outro lado, *C. boliviana* foi até recentemente considerada como subespécie de *C. pareola*, porém nenhuma análise detalhada foi publicada para justificar tal tratamento, e na ausência de dados robustos, alguns autores questionam a validade de *C. boliviana* como espécie. Neste estudo, usamos sequências de dois genes mitocondriais e dois genes nucleares para inferir as relações evolutivas, através de diversos métodos filogenéticos, entre as espécies de *Chiroxiphia* e de todas as subespécies de *C. pareola*, assim como as relações entre *Chiroxiphia* e *Antilophia*. Os resultados mostram que *Chiroxiphia* como atualmente definido é parafilético, uma vez que as duas espécies de *Antilophia* estão incluídas dentro de *Chiroxiphia*, como irmãs de *C. boliviana*. *C. boliviana* deve ser tratada como espécie plena, uma vez que esta espécie não está proximamente relacionada com *C. pareola*. Dentro de *C. pareola* quatro linhagens evolutivas independentes foram identificadas, duas delas correspondendo às subespécies *C. p. regina* e *C. p. napensis*. As duas outras linhagens são separadas atualmente pelo baixo rio Amazonas, estando os indivíduos do norte misturada com os indivíduos de *C. p. atlantica*. O padrão observado para o complexo *C. pareola* sugere que não exista nenhuma estruturação profunda entre os Centros de Endemismo Amazônicos, exceto para a separação Norte e Sul do baixo Amazonas. Portanto, a hipótese dos grandes rios Amazônicos como barreira para o fluxo gênico pode ser refutada para a formação da maior parte das distintas linhagens evolutivas dentro do grupo *C. pareola*. Em relação à nomenclatura, recomendamos a inclusão de *Antilophia* em *Chiroxiphia*, o qual tem prioridade, e o tratamento como espécie plena para *C. regina* e *C. napensis*.

Palavras-chave: Amazônia, biogeografia, *Chiroxiphia pareola*, filogeografia, taxonomia

Abstract

Molecular phylogeny of *Chiroxiphia* and *Antilophia* (Aves: Pipridae)

The genus *Chiroxiphia*, small birds of Pipridae, currently comprises five species, including *C. pareola*, the species with wider geographic distribution, with four subspecies. *Chiroxiphia boliviana* was until recently considered a subspecies of *C. pareola*, but no detailed analysis has been published to justify such treatment, and in the absence of robust data, some authors question the validity of *C. boliviana* as a species. In this study, we used sequences of two mitochondrial and two nuclear genes to infer evolutionary relationships between *Chiroxiphia* species and all subspecies of the *C. pareola* as well as the relationships between *Chiroxiphia* and *Antilophia*. All phylogenies shown *Chiroxiphia* as paraphyletic as currently defined, since the two species of the *Antilophia* are included within *Chiroxiphia* as sister of *C. boliviana*. *Chiroxiphia boliviana* should be treated as full species, since it is not closely related to *C. pareola* and is clearly distinct from *Antilophia*. Within *C. pareola* four independent evolutionary lineages were identified, two of them corresponding to the subspecies *C. p. regina* and *C. p. napensis*, the other two are lineages separated by the lower Amazon River, with individuals from the north mixed with individuals of *C. p. atlantica*. The pattern observed for the complex *C. pareola* suggests that there is no deep genetic structure between the Amazonian centers of endemism, except for the separation between the northern and southern of the lower Amazon River. Therefore, the theory that large Amazonian rivers were important barriers to gene flow was not supported for the formation of the distinct evolutionary lineages within the *C. pareola* group. We recommend the synonymization of *Antilophia* with *Chiroxiphia*, which has priority, and the treatment as full species to *C. regina* and *C. napensis*.

Keywords: Amazonia, biogeography, Blue-backed Manakin, phylogeography, taxonomy

1. Introdução

Os piprídeos (Aves: Pipridae) são pequenos pássaros que habitam ambientes florestais de toda região neotropical. Esta família é relativamente diversa taxonomicamente representando cerca de 50 espécies (Snow 2004). São conhecidos pelo típico sistema reprodutivo de leques, onde os machos que apresentam plumagens de cores vibrantes mantêm seus territórios e exibem danças nupciais elaboradas, acompanhadas de vocalizações especializadas, para atrair o maior número de fêmeas, as quais são esverdeadas, sem brilho e responsáveis pela nidificação e cuidado parental (Sick 1997, Prum 1998, Snow 2004).

A forte pressão de seleção sexual observada na família provavelmente explica o dimorfismo sexual acentuado na maioria das espécies (Snow 2004). Observa-se ainda considerável diversidade morfológica entre espécies de piprídeos, inclusive entre espécies proximamente aparentadas, o que tem sido atribuído a distintos mecanismos de seleção sexual por preferência de fêmeas (Prum 1997). De acordo com Anciães *et al.* (2009), a seleção sexual não somente é responsável pela elaboração morfológica e comportamental na família, como também contribuiu para a formação de linhagens evolutivas independentes.

A maioria das espécies de piprídeos ocorre em ambientes de climas quentes e úmidos, típicos das florestas de planície da região Neotropical, embora algumas espécies ocorram em condições mais frias ou mais áridas, como por exemplo, *Chiroxiphia boliviana* (Ridgely e Tudor 1994, Anciães e Peterson 2009). As espécies de *Chiroxiphia* são extremamente semelhantes ecologicamente e excluem-se uma a outra geograficamente (Snow 1975) (Figura 1). Como a maioria dos pares de espécies irmãs é ecologicamente muito semelhante, sugere-se que o isolamento das linhagens, ao invés de adaptação às novas condições ecológicas, dominou a diversificação desta família (Anciães e Peterson 2009).

O gênero *Chiroxiphia* é atualmente composto por cinco espécies (Figura 1) e é bem caracterizado pela coloração dos machos adultos, onde em quatro espécies os

machos são pretos com as costas azuis, enquanto em *C. caudata* o corpo é principalmente azul. O macho adulto de todas as espécies tem a coroa vermelha exceto em *C. pareola regina* a qual é amarela (Miller 1908, Haffer 1987, Snow 2004, Kirwan e Green 2011). Em três espécies a retriz central do macho é alongada, porém o que se sabe é que não existe nenhuma função para o alongamento, exceto talvez para aumentar o efeito visual dos saltos feitos durante o *display* (Haffer 1987). *Chiroxiphia linearis* foi por longo tempo considerada uma espécie politípica (Snow 2004), porém uma investigação morfológica recente (Kirwan 2011) sugere que *C. linearis* é melhor tratada como espécie monotípica.



Figura 1. Distribuição geográfica de *Chiroxiphia* e *Antiophia*, verde: *C. caudata*; roxo: *C. pareola*; amarelo: *C. boliviana*; laranja: *C. lanceolata*; rosa: *C. linearis*; vermelho: *A. bokermanni* e cinza: *A. galeata*, adaptado de Snow (2004).

Chiroxiphia pareola é a espécie com distribuição geográfica mais ampla e com quatro subespécies atualmente reconhecidas (Miller 1908, Ridgely e Tudor 1994, Snow 2004, Kirwan e Green 2001). Três subespécies (*C. p. pareola*, *C. p. napensis* e *C. p. regina*) tem relativamente ampla distribuição geográfica, enquanto *C. p. atlantica* é confinada à pequena ilha de Tobago. Contudo, essas subespécies tem se mantido como

parte de *C. pareola* desde sua inclusão por Hellmayr (1929), contra Miller (1908), que tratou as quatro formas como espécies separadas. Mais recentemente, Haffer (1987) e Kirwan e Green (2011) sugerem que mais de uma espécie pode estar envolvida dentro de *C. pareola*.

Chiroxiphia boliviana foi até recentemente tratada como subespécie de *C. pareola*, mas foi separada como espécie não somente pelas diferenças morfológicas e ecológicas consideráveis entre elas, mas principalmente pelas diferenças vocais e de *display* (Parker e Remsen Jr. 1987, Snow 2004). Porém a validade como espécie plena tem sido questionada, uma vez que as evidências para tal tratamento não foram devidamente analisadas (Remsen Jr. *et al.* 2012).

O gênero *Antilophia* contém duas espécies, *A. galeata* e *A. bokermanni*, esta última descrita apenas recentemente (Coelho e Silva 1998). *Antilophia galeata* (Figura 1), a espécie mais bem conhecida do gênero, ocorre nas faixas de matas ciliares e pequenas ilhas de mata na região do cerrado do Brasil Central, leste da Bolívia e norte do Paraguai (Snow 2004). *Antilophia bokermanni* é restrita as florestas úmidas da Chapada do Araripe, no estado do Ceará (Coelho e Silva 1998) (Figura 1).

Rêgo *et al.* (2010) encontraram um surpreendente grau de similaridade genética entre as espécies de *Antilophia*, dadas as suas distribuições disjuntas e a pronunciada divergência morfológica. Mais interessante ainda, as duas espécies compartilham haplótipos, o que sugere no mínimo uma diferenciação muito recente.

McKay *et al.* (2010) apresentaram a mais abrangente filogenia molecular da família Pipridae, contudo, com base na limitada amostragem dentro dos gêneros, estes autores sugerem novos estudos que centrem-se em elucidar as relações dentro dos mesmos. No presente estudo, usamos sequências de dois genes mitocondriais e dois genes nucleares para inferir as relações evolutivas entre as espécies de *Chiroxiphia* e de todas as subespécies de *Chiroxiphia pareola*, assim como as relações entre *Chiroxiphia* e *Antilophia*, o qual pode ser parte de *Chiroxiphia* (Tello *et al.* 2009).

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem

Foram obtidas amostras das cinco espécies de *Chiroxiphia* e de todas as subespécies de *C. pareola*, cobrindo a maior parte da distribuição geográfica do complexo (Figura 2), totalizando 29 indivíduos de oito táxons pertencentes ao gênero *Chiroxiphia*, além de dois indivíduos de *Antilophia bokermanni*. Para *Antilophia galeata* foram utilizadas sequências disponíveis no GenBank, pois as amostras obtidas não puderam ser sequenciadas. As amostras utilizadas foram cedidas pelos seguintes museus: Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS, Museu de Zoologia da USP (MZUSP), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Universidade Federal do Pará-Bragança, Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA), Field Museum of Natural History (FMNH) e Louisiana State University Museum of Zoology (LSUMZ) (Tabela 1). O grupo externo inclui representantes dos gêneros, *Ilicura*, *Masius*, *Corapipo*, *Xenopipo*, *Manacus* e *Dixiphia*, da família Pipridae, obtidos de sequências disponíveis no GenBank (Tabela 1), as quais foram escolhidas com base em sua posição como táxons proximamente relacionados com *Chiroxiphia* (Tello *et al.* 2009, McKay *et al.* 2010).

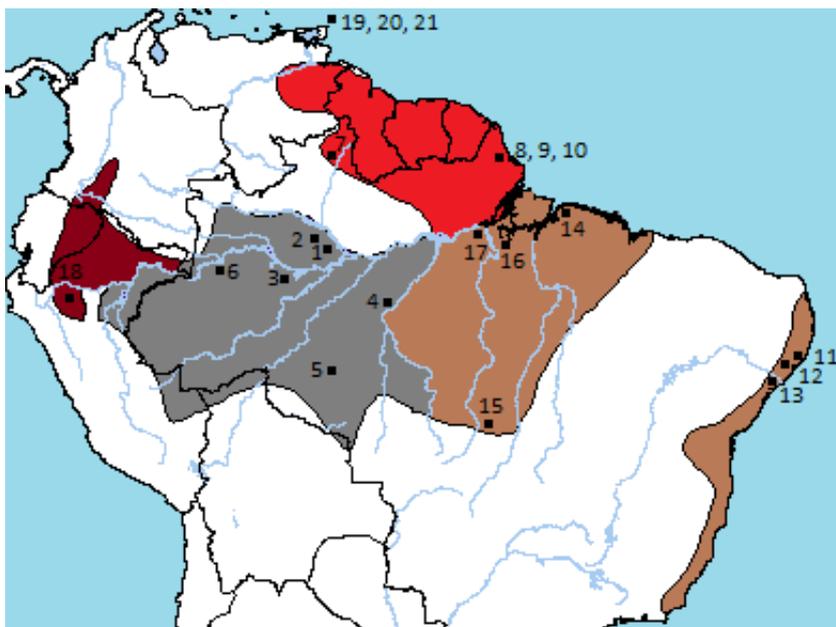


Figura 2. Mapa demonstrando a distribuição geográfica das subespécies de *Chiroxiphia pareola*, a numeração corresponde às amostras utilizadas neste estudo (Tabela 1). Em vermelho *C. p. pareola* do norte, em marrom *C. p. pareola* do sul, em cinza *C. p. regina*, em bordo *C. p. napensis* e os números 19-21 correspondem a subespécie *C. p. atlantica*.

2.2. Extração e sequenciamento

O DNA total foi extraído de tecido muscular ou de penas, usando o Dneasy tissue kit (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante. Amplificamos e sequenciamos dois genes mitocondriais (DNAm_t) e dois genes nucleares. Para amplificar o DNAm_t citocromo oxidase I (COI) usamos o coquetel de primers adaptado de Ivanova *et al.* (2007), anexado com M13 para auxiliar no sequenciamento (Messing 1983), para o DNAm_t NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) usamos os primers L5216 e H6313 (Sorenson *et al.* 1999). Para amplificar as duas regiões nucleares, RAG-1 e RAG-2 foram usados neste estudo os seguintes primers, RAG-1: 17-20, 19-22, 21-24, 23-2b; RAG-2: 1-16 (Groth e Barrowclough 1999, Barker *et al.* 2004, Tello *et al.* 2009).

As amplificações de PCR foram realizadas em 20 µl de reação, usando 1–2 µl do DNA extraído (60 – 100ng), 0,2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1X Buffer, 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs e 0,5µM de cada primer. As condições de PCR para o

ND2 foram descritas em Sorenson *et al.* (1999), COI como em Ivanova *et al.* (2007) e para os genes nucleares RAG-1 e RAG-2 como em Tello *et al.* (2009). Os produtos amplificados foram purificados através da reação enzimática da Exonuclease e Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSAP-IT™ GE Healthcare). Os produtos limpos foram usados como modelo para o sequenciamento em ambas as direções usando os primers de amplificação, exceto para o COI, no qual foi anexo M13 para auxiliar o sequenciamento. As reações de sequenciamento foram lidas no sequenciador automático MegaBACE 1000.

2.3. Análises das sequências

Sequências foram visualizadas, unidas e editadas usando o Geneious pro™ 5.4.3 (Drummond *et al.* 2011) e serão depositadas no GenBank. Nenhuma das sequências dos quatro marcadores apresentou indels ou códons de parada. O alinhamento das sequências foi realizada utilizando Muscle, implementado no Geneious sob parâmetros padrões. O tamanho dos alinhamentos são 618 pb para COI, 965 para ND2, 1973 para RAG1 e 1008 para RAG2.

Tabela 1. Identificação das espécies, fonte (voucher ou número de identificação do tecido), código da amostra, localidade e código de acesso do GenBank para cada gene. Acrônimos: MPEG (Museu Paraense Emílio Goeldi), INPA (Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas), FMNH (Field Museum Natural History), LSUMZ (Louisiana State University Museum of Natural Science), MZUSP (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo), MCP (Museu de Ciências e Tecnologia – PUCRS) e ABO (Universidade Federal do Pará – Campus Bragança). *São as sequências produzidas neste estudo que posteriormente receberão um código de acesso do GenBank.

| # | Taxon | Source | Locality | ND2 | COI | RAG1 | RAG2 |
|----|------------------------------------|-------------|--------------------------------------|-----|-----|------|------|
| 1 | <i>Chiroxiphia pareola regina</i> | MPEG 59653 | Brazil, Amazonas, Novo Airão | * | * | * | * |
| 2 | <i>Chiroxiphia pareola regina</i> | INPA 238 | Brazil, Amazonas, RDS Amanã | * | * | * | * |
| 3 | <i>Chiroxiphia pareola regina</i> | MPEG 62360 | Brazil, Amazonas, Coari | * | * | * | * |
| 4 | <i>Chiroxiphia pareola regina</i> | MPEG 68986 | Brazil, Pará, Jacareacanga | * | * | * | * |
| 5 | <i>Chiroxiphia pareola regina</i> | MPEG 71228 | Brazil, Rondônia, Machadinho d'Oeste | * | * | * | * |
| 6 | <i>Chiroxiphia pareola regina</i> | MPEG 60257 | Brazil, Amazonas, Jutai | * | * | * | * |
| 7 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | INPA 1768 | Brazil, Roraima, Boa Vista | * | * | * | * |
| 8 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | FMNH 391547 | Brazil, Amapá | * | * | * | * |
| 9 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | FMNH 391546 | Brazil, Amapá | * | * | * | * |
| 10 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | FMNH 391545 | Brazil, Amapá, Tartarugalzinho | * | * | * | * |
| 11 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | FMNH 427143 | Brazil, Pernambuco, Mata do Estado | * | * | * | * |
| 12 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | MPEG 70494 | Brazil, Alagoas, Ibataguara | * | * | * | * |
| 13 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | MZUSP 84531 | Brazil, Sergipe, Capela | * | * | * | * |
| 14 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | MPEG 70561 | Brazil, Pará, Curuçá | * | * | * | * |
| 15 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | MPEG 61598 | Brazil, Mato Grosso, Querência | * | * | * | * |

| | | | | | | | |
|----|--------------------------------------|-------------|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| 16 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | FMNH 391549 | Brazil, Pará, Melgaço | * | * | * | * |
| 17 | <i>Chiroxiphia pareola pareola</i> | MZUSP 83685 | Brazil, Pará, Porto de Moz | * | * | * | * |
| 18 | <i>Chiroxiphia pareola napensis</i> | LSUMZ 5470 | Peru, San Martín | * | * | * | * |
| 19 | <i>Chiroxiphia pareola atlantica</i> | FMNH 394508 | Trinidad and Tobago, Tobago | * | * | * | * |
| 20 | <i>Chiroxiphia pareola atlantica</i> | FMNH 394504 | Trinidad and Tobago, Tobago | * | * | * | * |
| 21 | <i>Chiroxiphia pareola atlantica</i> | FMNH 394505 | Trinidad and Tobago, Tobago | * | * | * | * |
| 22 | <i>Chiroxiphia caudata</i> | MCP 1482 | Brazil, Rio Grande do Su | * | * | * | * |
| 23 | <i>Chiroxiphia caudata</i> | MZUSP 80752 | Brazil, São Paulo, Cotia | * | * | * | * |
| 24 | <i>Chiroxiphia boliviana</i> | FMNH 433671 | Peru, Cusco, Paucartambo | * | * | * | * |
| 25 | <i>Chiroxiphia boliviana</i> | LSUMZ 22643 | Bolívia, La Paz | * | * | * | * |
| 26 | <i>Chiroxiphia linearis</i> | FMNH 434063 | El Salvador, Ahuachapan | * | * | * | * |
| 27 | <i>Chiroxiphia linearis</i> | FMNH 434067 | El Salvador, Sonsonate | * | * | * | * |
| 28 | <i>Chiroxiphia lanceolata</i> | LSUMZ 26896 | Panama, Panama | * | * | * | * |
| 29 | <i>Chiroxiphia lanceolata</i> | LSUMZ 26922 | Panama, Panama | * | * | * | * |
| 30 | <i>Antilophia bokermanni</i> | ABO - 1B | Ceará | | | * | * |
| 31 | <i>Antilophia bokermanni</i> | ABO - 2 | Ceará | | | * | * |
| | <i>Antilophia galeata</i> | | | GU985490 | EF111037 | FJ501780 | FJ501780 |
| | <i>Manacus manacus</i> | | | DQ363987 | FJ027769 | FJ501664 | FJ501844 |
| | <i>Dixiphia pipra</i> | | | EF501952 | EF111031 | FJ501625 | FJ501805 |
| | <i>Xenopipo</i> sp. | | | GU985517 | EF111047 | FJ501766 | FJ501946 |
| | <i>Ilicura militaris</i> | | | AY136621 | JN801754 | FJ501645 | FJ501825 |
| | <i>Masius</i> sp. | | | GU985505 | EF111035 | FJ501666 | FJ501846 |
| | <i>Corapipo</i> sp. | | | GU985495 | EF111038 | FJ501621 | FJ501801 |

2.4. Reconstruções filogenéticas

A análise filogenética das sequências foi realizada através de diversos métodos. Para o método estatístico Bayesiano foi utilizado o pacote de software BEAST v.1.6.2 (Drummond e Rambaut 2007). Cada gene teve sua própria taxa de substituição e seu modelo de substituição de nucleotídeos. Para os genes mitocondriais foi usado o modelo HKY + Γ com 4 categorias distribuídos entre as variações dos sítios e sítios invariáveis (Hasegawa *et al.* 1985, Yang 1994), enquanto para os genes nucleares o modelo selecionado foi HKY, sem modelo de heterogeneidade e ou proporção de sítios invariáveis. Como a análise envolveu várias espécies e gêneros, utilizamos o "Speciation: Yule process" como "tree prior". Os tempos de divergência foram estimados usando o prior relógio molecular estrito e a taxa de substituição seguindo uma distribuição normal com média de $1,105E^{-8}$ (por sítio por ano) com desvio padrão de $0,34E^{-8}$, o qual foi demonstrado ser válida para aves por Weir e Schluter (2008), devido a ausência de pontos de calibração dentro de Pipridae. Esta taxa de substituição foi definida para os dois genes mitocondriais, COI e ND2, sendo as taxas para os genes nucleares estimadas a partir destes. Para cada análise, utilizou-se 2 buscas independentes de Markov chains Monte Carlo (MCMC) executando 50.000.000 gerações com amostras retidas a cada 5.000 gerações, com os primeiros 10% das gerações descartadas como burn-in. As análises foram checadas usando o programa Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond 2009). A árvore filogenética final foi sumarizada na forma de uma "Maximum clade credibility tree" usando o programa TreeAnnotator v.1.6.2 (Drummond e Rambaut 2007). Uma filogenia de espécies ("species tree") foi também estimada no BEAST usando o método *Beast (Heled e Drummond 2010) usando os mesmos parâmetros e comandos descritos acima a análise Bayesiana tradicional.

Como alguns indivíduos possuem uma proporção relativamente grande de sítios faltantes (p.ex., *Antilophia bokermanni*), foi realizada outra análise bayesiana com um número mais reduzido de taxons (21 indivíduos), tendo sido retirados os indivíduos com maior proporção de dados faltantes, maximizando assim os sítos com informação completa.

O método da máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) foi aplicado através do programa RAxML-HPC 7.2.8 (Stamatakis 2006, Stamatakis *et al.* 2008) implementado no "CIPRES Science Gateway" (Miller *et al.* 2010), tendo sido utilizado um modelo com 4 partições e outros parâmetros default. A árvore de consenso é do tipo "majority rule" de 200 replicações de bootstrap.

3. Resultados

Foram obtidos 4564 sítios no total, sendo 688 variáveis, sendo 501 informativas para parcimônia. As filogenias bayesiana (BI, Figura 3), de máxima verossimilhança (ML, Figura 4), e do tipo *species tree* (ST, Figura 5) apresentam alto suporte para a maior parte dos agrupamentos. Além disso, mostram, com alto suporte, um clado agrupando estreitamente as espécies de *Chiroxiphia* + *Antilophia*. As sequências dos indivíduos das duas espécies de *Antilophia* são extremamente semelhantes, inclusive as sequências nucleares de *A. galeata* são idênticas as de um dos indivíduos de *A. bokermanni*. Por outro lado, as filogenias sugerem que *Chiroxiphia* não é monofilético, uma vez que as espécies de *Antilophia* aparecem como irmãs de *C. boliviana*. Porém, este agrupamento apresenta graus variados de suporte nas três filogenias apresentadas acima, entre 0,97 a 0,88 de probabilidade posterior. Para testar se a maior proporção de sítios ausentes em alguns indivíduos, em especial a ausência dos segmentos mitocondriais em *A. bokermanni*, poderia estar afetando os índices de suporte das filogenias, foi estimada uma nova filogenia Bayesiana sem 17 indivíduos com maior quantidade de sítios faltantes, inclusive *A. bokermanni* (Figura 6). Esta filogenia apresenta o mesmo padrão de relacionamento das anteriores, mas os valores de suporte se mostraram superiores, inclusive o agrupamento de *C. boliviana* com *Antilophia galeata* apresentou PP de 1.

Dentro do clado *Chiroxiphia* + *Antilophia*, outros agrupamentos com alto suporte são *C. linearis* + *C. lanceolata*, e *C. pareola* com todas as subespécies. A posição filogenética de *C. caudata*, como grupo irmão dos dois grupos citados acima, é a que apresenta os menores valores de suporte.

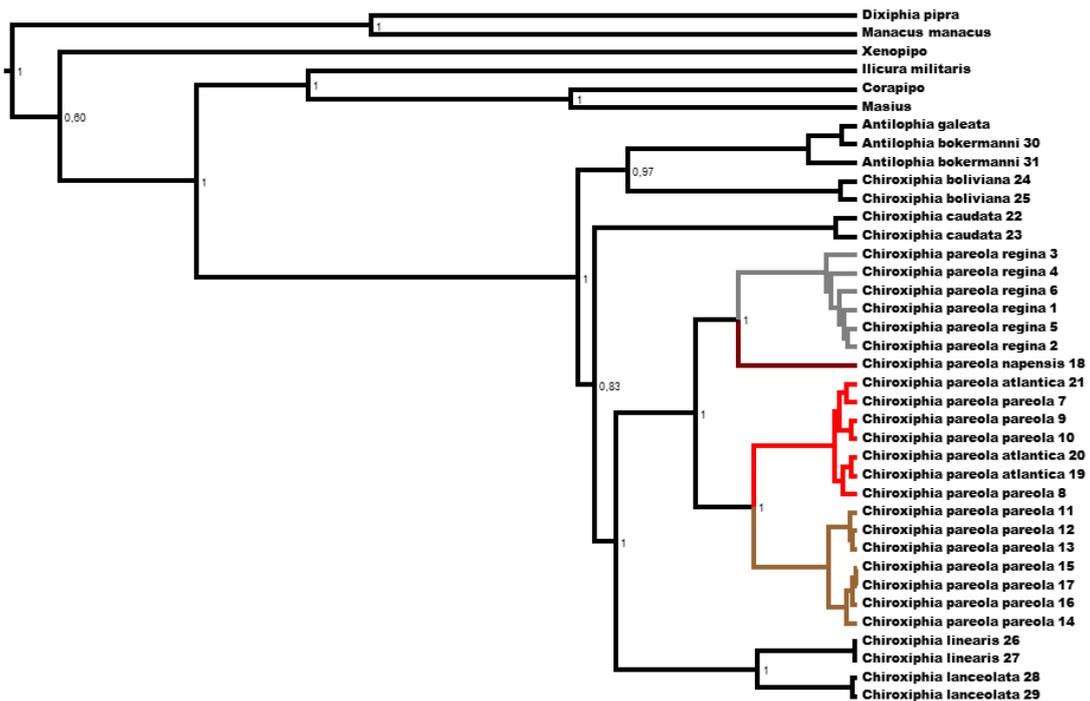


Figura 3. Árvore do tipo "Maximum clade credibility" derivada da análise Bayesiana do BEAST. Os valores de suporte correspondem a posterior probabilidade Bayesiana. Números próximos aos nomes correspondem aos números na Tabela 1.

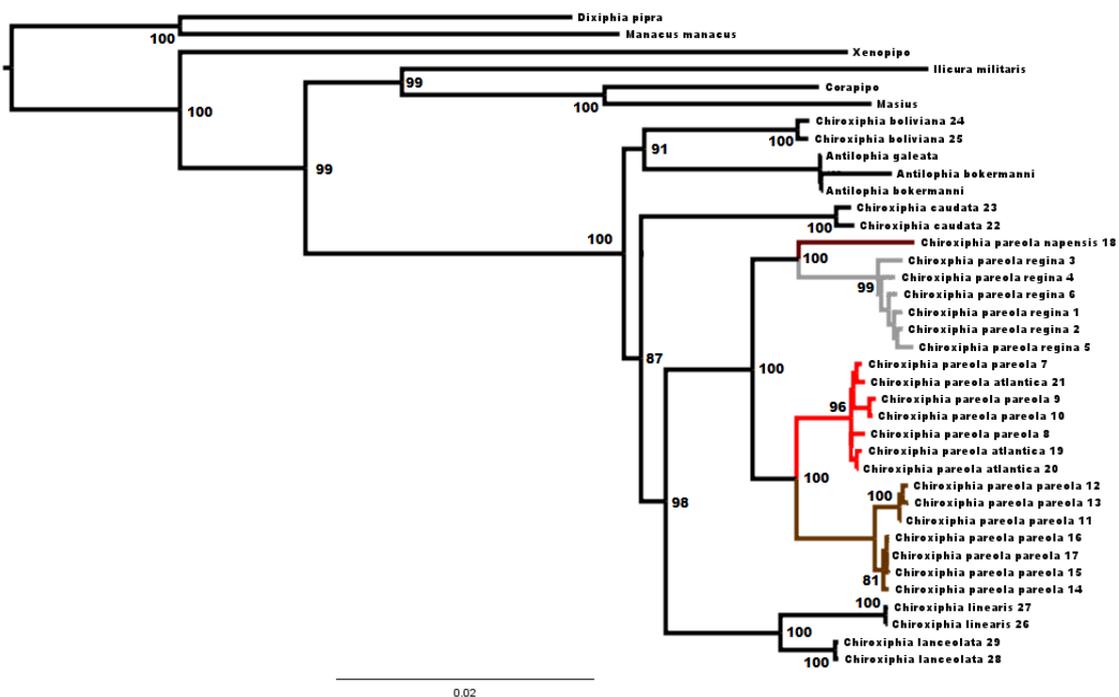


Figura 4. Árvore de consenso de máxima verossimilhança. Os valores de suporte próximos aos nós correspondem ao percentual de 200 replicações de bootstrap. Números próximos aos indivíduos correspondem aos números na Tabela 1.

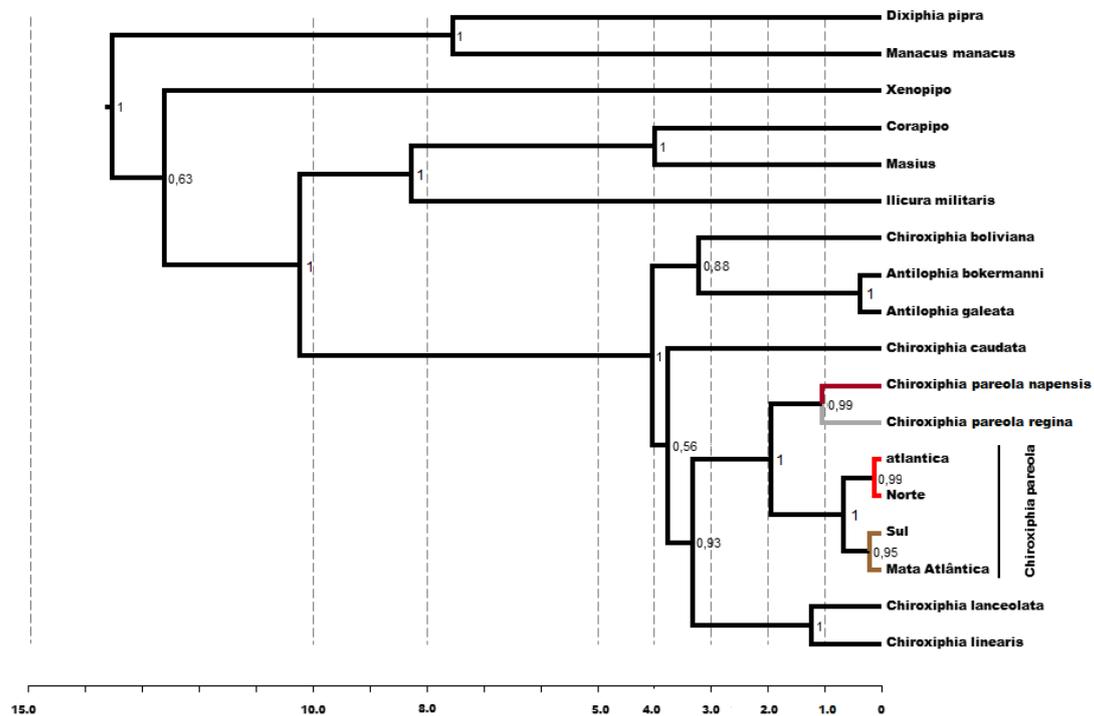


Figura 5. Árvore do tipo "Maximum clade credibility" estimada pelo método de "species tree" Bayesiano *BEAST. Os valores de suporte correspondem a probabilidade posterior Bayesiana. A escala de tempo está em milhões de anos.

Dentro de *C. pareola*, quatro filogrupos foram recuperados, as subespécies *regina* e *napensis* correspondem a unidades evolutivas independentes, enquanto a subespécie *atlantica* está incluída em *C. pareola* nominal. *Chiroxiphia p. pareola* está dividida em dois grupos principais, um ao norte e o outro ao sul do baixo rio Amazonas (Figura 3). O clado sul pode adicionalmente ser separado em dois filogrupos, um do sudeste da Amazônia e outro da Mata Atlântica.

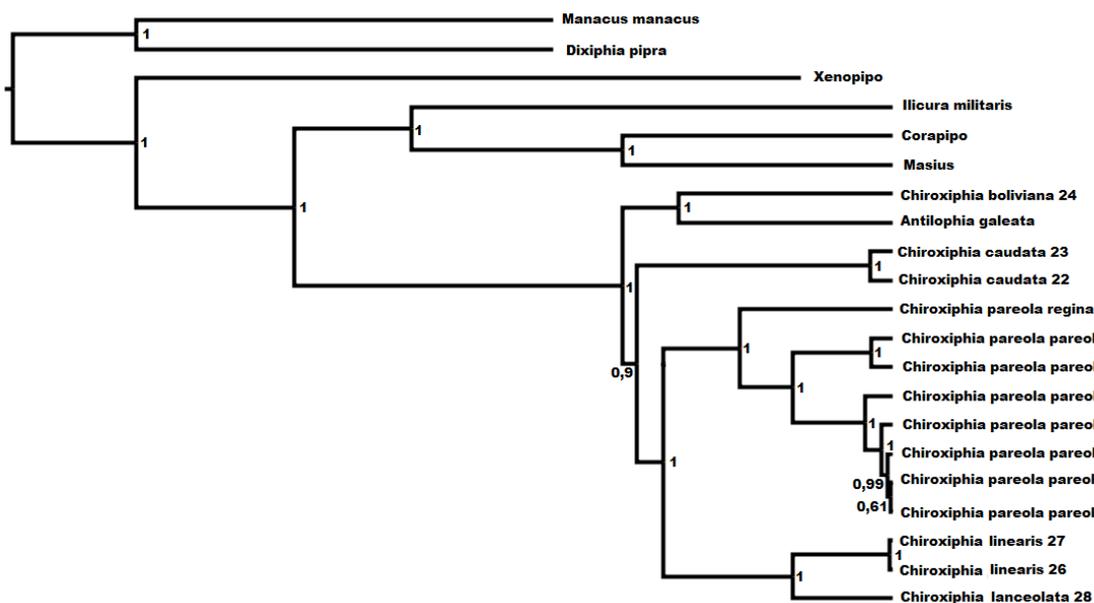


Figura 6. Árvore do tipo "Maximum clade credibility" derivada da análise Bayesiana com os 21 indivíduos com menor número de sítios faltantes. Os valores de suporte correspondem a posterior probabilidade Bayesiana. Números próximos aos nomes correspondem aos números na Tabela 1.

4. Discussão

As nossas filogenias moleculares, com ampla cobertura taxonômica e de genes, apontam claramente que as duas espécies de *Antilophia* estão inseridas entre as espécies de *Chiroxiphia*, especificamente formando um clado com *C. boliviana*.

Esta ausência de monofiletismo em *Chiroxiphia* foi primeiramente reportada por Tello *et al.* (2009), porém com base nos baixos valores de suporte dos nós, nenhuma alteração taxonômica foi proposta naquele trabalho. Além disso, aquele estudo possuía baixa representatividade taxonômica (apenas dois indivíduos de *Chiroxiphia* e um de *Antilophia* foram usados), com o uso de apenas dois genes. Porém, curiosamente, naquele estudo *Antilophia galeata* agrupou com *C. caudata* e não com *C. boliviana* como no nosso estudo. Miller (1908) foi o primeiro a sugerir uma relação próxima entre os dois gêneros, sugerindo que o tamanho e formato da cauda de *C. boliviana* seria um "passo evolutivo intermediário" na direção de *Antilophia*. Adicionalmente, a

proximidade evolutiva entre *Chiroxiphia* e *Antilophia* é suportada pela ocorrência de hibridação entre *C. caudata* e *A. galeata* no sudeste do Brasil, onde as duas espécies estão em contato (Pacheco e Parrini 1995, Sick 1997), enquanto Prum (1992) encontrou que apenas um caráter derivado da siringe suportaria o monofiletismo de *Chiroxiphia* em relação à *Antilophia*.

Apesar do suporte para a inserção de *Antilophia* em *Chiroxiphia* ser um pouco baixo na "species tree" (PP=0,88, Figura 5), as outras filogenias, e em especial a filogenia com menos sítios faltantes (Figura 6), apresentam alto suporte para este agrupamento. Portanto, a classificação de *Chiroxiphia* e *Antilophia* tem que ser revista. As duas opções possíveis são a sinonimização de *Antilophia* com *Chiroxiphia* (o qual tem prioridade) com a passagem de *A. galeata* e *A. bokermanni* para *Chiroxiphia*. Uma segunda opção seria a transferência de *C. boliviana* para *Antilophia*, ficando assim os dois gêneros monofiléticos.

Consideramos que a segunda opção é menos adequada, primeiro, porque as diferenças entre *C. boliviana* e *Antilophia* são muito grandes, tanto morfológicas quanto comportamentais, o que criaria um gênero bastante heterogêneo. Além disso, como o agrupamento de *C. caudata* junto com o clado que, nesta mudança taxonômica, seria *Chiroxiphia*, é ainda suportada com baixos valores nas filogenias, existe a possibilidade de no futuro *C. caudata* se posicionar fora deste último clado, o que exigiria mais uma mudança taxonômica relevante. Já a sinonimização de *Antilophia* com *Chiroxiphia* é estável a esta e diversas outras mudanças futuras na filogenia do grupo. Portanto, recomendamos que *Antilophia galeata* e *A. bokermanni*, sejam tratadas daqui em diante como *Chiroxiphia*.

Chiroxiphia galeata e *C. bokermanni* são as duas únicas espécies dentro da família Pipridae que não reproduzem em sistema de lek (Prum 1994b, Rêgo *et al.* 2010). Snow (1975) sugeriu que *C. galeata* poderia ser uma espécie "primitiva" dentro dos piprídeos dada à ausência da reprodução em lek. Porém, as nossas filogenias não corroboram esta hipótese, sendo mais favorável a hipótese de Prum (1994b), que postula que em algum momento da trajetória evolutiva da linhagem que deu origem a *C. galeata* e *C. bokermanni*, houve a perda do comportamento de lek. Segundo Prum

(1994b) a perda do comportamento de lek estaria associada com a preferência de habitat destas espécies.

O *status* de espécie plena para *C. boliviana* é plenamente justificado, uma vez que ela não é proximamente relacionada com *C. pareola*, para a qual foi até recentemente tratada como subespécie (Snow 2004). Segundo Anciães e Peterson (2009), as espécies de piprídeos geralmente têm nichos ecológicos caracterizados por alta temperatura e precipitação, embora algumas espécies ocorram sob condições mais frias ou áridas, *C. boliviana* é um dos casos extremos, uma vez que ocorre em áreas frias e secas no sul dos Andes. De acordo com estes mesmos autores, *C. boliviana* representa um táxon que teria reinvadido altas elevações de clima mais frio, de um ambiente de clima quente e úmido de planície que é característico para o gênero. Contudo, esta hipótese pode ser descartada, uma vez que *C. boliviana* teria separado das demais espécies de clima úmido, junto com *C. galeata* e *C. bokermanni*, em torno de 4 milhões de anos atrás (Mya). *Chiroxiphia galeata* e *C. bokermanni* são espécies restritas ao bioma Cerrado (Snow 1975, Coelho e Silva 1998), o qual é caracterizado por clima seco e quente. Desta forma, podemos concluir que a divisão que ocorreu dentro do gênero *Chiroxiphia* em torno de 4 Mya teria levado a formação de dois agrupamentos principais, um que deu origem as espécies de clima seco e outro que originou as espécies de clima úmido.

Nos nossos resultados, *C. caudata*, espécie endêmica da Mata Atlântica é uma linhagem isolada, que teria divergido dos grupos de espécies *pareola* e *linearis* há aproximadamente 3,7 Mya. Outras espécies endêmicas da Mata Atlântica divergiram de suas linhagens irmãs amazônicas em torno do mesmo tempo, *Pteroglossus bailloni* (2,3-3,7 Mya: Patel *et al.* 2011), *Brotogeris tirica* (3-3,6 Mya: Ribas *et al.* 2009), *Xiphorhynchus fuscus* (ca. 3 Mya: Cabanne *et al.* 2008), *Dendrocincla turdina* (ca. 3 Mya: Weir e Price 2011), *Mionectes rufiventris* (ca. 2,9 Mya: Miller *et al.* 2008). No leste do Brasil, onde a distribuição de *C. caudata* encontra com *C. pareola*, elas se excluem altitudinalmente, com *C. caudata* ocorrendo em florestas montanas, enquanto *C. pareola* é encontrada em matas de planície (Snow 1975).

Chiroxiphia pareola foi algumas vezes tratada coespecificamente com *C. linearis*, *C. lanceolata* e *C. boliviana* (Snow 2004) e, por outro lado, todas as

subespécies conhecidas do complexo *C. pareola* foram separadas como espécies plenas (Miller 1908). Nossos resultados apoiam o arranjo proposto por Miller (1908), exceto para o reconhecimento de *C. p. atlantica* como espécie, uma vez que este táxon não apresentou independência evolutiva em relação a *C. pareola*. Ela é maior que *C. pareola* nominal, mas muito semelhante, não somente na plumagem, mas também nas vocalizações e no *display* (Snow 1971) (ver abaixo).

Segundo Haffer (1987), as subespécies amazônicas *C. pareola regina* e *C. p. napensis* apresentam um padrão de divergência morfológica entre elas e para *C. pareola* nominal similar com a diferença encontrada entre *C. linearis* e *C. lanceolata*, o que poderia levar ao reconhecimento destas formas como espécies separadas, contudo, nada é conhecido sobre suas vocalizações e *displays*. Baseado em nossos resultados, que mostram tanto a monofilia destes dois táxons quando um tempo de separação, ao redor de 1 milhão de anos, muito semelhante ao par *C. linearis* e *C. lanceolata*, e na distinção morfológica consistente entre os táxons envolvidos (Miller 1908), propomos o reconhecimento de *C. regina* e *C. napensis* como espécies plenas.

Chiroxiphia regina foi anteriormente dividida em duas subespécies, a subespécie nominal, que ocorre nas duas margens do Solimões e *Chiroxiphia regina alicei*, descrita em 1937 por Hellmayr e Gyldenstolpe (Pinto 1944) da margem esquerda do baixo Solimões na região de Codajás. Snow (1979) tratou *C. r. alicei* como sinônimo de *C. p. regina* e Kirwan e Green (2011) não foram capazes de detectar nenhuma diferença diagnóstica entre elas. A sinonimização por Snow (1979) está de acordo com nossos resultados, uma vez que *C. regina* não apresentou nenhum sinal de estruturação na região do baixo Solimões em sua margem esquerda (amostras 1 e 2). De acordo com Pinto (1944) os únicos exemplares conhecidos de *C. r. alicei* são os exemplares da localidade típica, sendo que um destes foi determinado por ele como sendo *C. regina* nominal.

Chiroxiphia napensis foi por muito tempo confundida como *C. pareola*, até ter sido descrita como espécie plena por Miller (1908). De acordo com este autor, a relação com *C. regina* que se encontra imediatamente à leste e entre *napensis* e *pareola* (Figura 1) pode ser mais próxima do que as evidências apontam, uma vez que vários caracteres discretos da plumagem de *C. napensis* se aproximam daqueles de *C. regina*. Nossos

resultados justificam a ideia de Miller (1908), uma vez que encontramos que *C. napensis* é a espécie irmã de *C. regina*, as duas espécies teriam separados por volta de 1 Mya. Uma vez que *C. regina* ocorre ao norte do rio Solimões (Figura 1), no centro de endemismo Napo, do qual *C. napensis* é endêmica, nenhum grande rio amazônico parece atuar como barreira para separar as duas espécies, sugerimos que processos não vicariantes teriam desempenhado papel fundamental na formação das duas espécies.

Cheviron *et al.* (2005) assumem que em *Lepidothrix coronata*, uma espécie de piprídeo que no oeste/sudoeste da Amazônia apresentou quatro clados bem suportados, de ocorrência parapátrica, e que para alguns destes nenhuma barreira biogeográfica é conhecida, mudanças na vegetação associadas com flutuações climáticas, bem como expansão de distribuição podem ter desempenhado papel fundamental na formação das linhagens.

Em *C. pareola*, o padrão observado está de acordo com Hayes e Sewlal (2004) onde o curso inferior do rio Amazonas é uma barreira efetiva para dispersão de aves florestais. A separação data de aproximadamente 700.000 anos atrás o que estaria em acordo com Irion *et al.* (1995) e Lundberg *et al.* (1998) onde períodos de elevação do nível do mar teriam ocorrido no final do Plioceno ou início do Pleistoceno. Estes períodos de elevação do nível do mar tiveram enorme impacto sobre a formação do moderno sistema do rio Amazonas e sua biota associada, com a formação de grandes lagos de água doce especialmente na parte inferior do Amazonas (Irion *et al.* 1995, Lundberg *et al.* 1998). Esta grande diferenciação entre os filogrupos Norte e Sul do rio Amazonas de *C. pareola* aponta uma necessidade de novos estudos neste grupo, os quais poderão levar a reavaliação do status taxonômicos dos mesmos, como subespécies ou mesmo espécies distintas. Sugerimos que estes estudos foquem nas diferenças vocais, uma vez que diferenças em comportamentos de corte, incluindo vocalizações e sons mecânicos podem reforçar o isolamento reprodutivo entre populações divergentes e levar ao reconhecimento destas como espécies (Prum 1994a e 1997). Contudo, sob o ponto de vista filogenético, os dois filogrupos devem ser reconhecidos como unidades evolutivas básicas.

A separação observada entre o sudeste da Amazônia e a Mata Atlântica em *C. pareola*, é bem mais recente, em torno de 220.000 de anos atrás, concordando com

Santos *et al.* (2007) que sugerem a ocorrência de conectividade entre Amazônia e a Floresta Atlântica durante vários períodos do Pleistoceno. A divergência recente e consequentemente a proximidade evolutiva entre o sudeste da Amazônia e Mata Atlântica está de acordo com encontrado para outras espécies de aves, como *Schiffornis turdina* (Niáry 2007) *Mionectes oleagineus* (Miller *et al.* 2008) e *Glyphorhynchus spirurus* (Marks *et al.* 2002).

Com base em nossos dados, a ausência de monofiletismo para *C. p. atlantica* está relacionada com o recente isolamento entre as populações. Parece provável que a população isolada de *Chiroxiphia* em Tobago data da última glaciação, quando Tobago foi separado de Trinidad, e que posteriormente *C. pareola* teria sido extinta de Trinidad e em partes adjacentes da Venezuela, região esta que é hoje ocupada por *C. lanceolata* (Snow 1985). De acordo com Höglund e Shorey (2004), *Manacus manacus trinitatis*, subespécie endêmica de Trinidad, teria sido completamente isolada da população continental à aproximadamente 10.000 anos.

A proximidade evolutiva encontrada entre *C. linearis* e *C. lanceolata*, as únicas que atingiram o Istmo do Panamá, está em concordância com Haffer (1987) que hipotetizou que se elas estivessem em contato, devido a similaridade em seus repertórios vocais, elas poderiam hibridizar e consequentemente serem consideradas coespecíficas. As duas espécies são muito semelhantes, em todas as suas plumagens, exceto pela forma da retriz central, que em *C. linearis* é extremamente alongada (Miller 1908). A formação do Istmo do Panamá, que conectou a América do Sul com a América do Norte, data de aproximadamente 3,5 Mya. (Johnson e Weckstein 2011), a datação esta de acordo com nossos dados, onde *C. linearis* e *C. lanceolata* teriam surgido aproximadamente há 3,3 Mya. Um padrão recorrente é observado nas relações intraespecíficas na América Central, onde foi identificada uma quebra biogeográfica separando linhagens irmãs distribuídas na porção norte e sul da América Central. O mesmo padrão foi observado por Ribas *et al.* (2005) entre *Pyrilia coccin collaris* e *P. haematotis* e, d'Horta (2009) entre populações de *Sclerurus mexicanus* e *S. guatemalensis*. Embora represente uma disjunção, espacialmente congruente, são produtos de eventos temporalmente distintos. Entre as espécies do gênero *Pyrilia* Ribas *et al.* (2005) obtiveram uma estimativa de 3,6 a 5,3 Mya, enquanto d'Horta (2009) em

S. mexicanus as estimativas ficam entre 1,4 e 3 Mya e para linhagens de *S. guatemalensis* as estimativas ficam entre 0,4 a 1,3 Mya, esta última se aproximando das espécies de *Chiroxiphia* que estimamos em aproximadamente 1,2 Mya. Desta forma, a congruência geográfica registrada para linhagens irmãs associada à ausência de congruência nas estimativas de tempo de divergência, sugerem que eventos de vicariância nesta região podem estar associados a processos de natureza cíclica (d’Horta 2009).

O padrão observado no complexo *Chiroxiphia pareola* se encaixa no descrito por Aleixo e Rosseti (2007), onde populações reciprocamente monofiléticas ocorrem no Escudo Brasileiro (*pareola* do sul), Escudo das Guianas (*pareola* do norte) e nas bacias sedimentares do oeste da Amazônia (*napensis/regina*).

De acordo com Haffer (1974), os piprídeos amazônicos são exemplos clássicos de grupos de espécies, filogeneticamente próximas, com distribuições parapátricas, sendo estas muitas vezes delimitadas pelos grandes rios da região. Contudo, o padrão observado para o complexo de subespécies *C. pareola* que ocorrem em todos os centros de endemismos amazônicos exceto Imeri e Pantepui (Haffer 1978, Cracraft 1995, Silva *et al.* 2002), sugere que não exista nenhuma estruturação profunda entre os centros de endemismo. O rio Tapajós não pode ser considerado como barreira primária para separação de *C. pareola* e *C. regina*, uma vez que estas espécies são bastante diferenciadas e principalmente por não serem linhagens irmãs. Portanto, a teoria dos grandes rios Amazônicos como barreira para o fluxo gênico pode ser refutada para a formação da maioria das distintas linhagens evolutivas dentro do grupo *pareola*, exceto para a separação Norte e Sul do baixo Amazonas.

Referências

Anciães, M e A. T. Peterson. 2009. Ecological niches and their evolution among Neotropical manakins (Aves: Pipridae). *Journal Avian Biology* 40: 561-604.

- Anciães, M., R. R. Durães, M. C. Cerqueira, J. R. Fortuna, N. Sohn, M. Cohn-Haft, P. Farias. 2009. Diversidade de píprídeos (Aves: Pipridae) amazônicos: seleção sexual, ecologia e evolução. *Oecol. Bras.* 13: 165-182.
- Aleixo, A. e D. F. Rosseti. 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithology*, 148 (Suppl. 2): S443-S453.
- Barker, F. K., A. Cibois, P. Schikler, J. Feinstein, J. Cracraft. 2004. Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 11040-11045.
- Cabanne, G. S., F. M. d'Horta, E. H. R. Sari, F. R. Santos, C. Y. Miyaki. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fucus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 760-773.
- Cheviron, Z. A., S. J. Hackett, A. P. Caparella. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36, 338-357.
- Coelho, A. G. M. e W. A. G. Silva. 1998. A new species of *Antilophia* (Passeriformes: Pipridae) from Chapada do Araripe, Ceara, Brasil. *Ararajuba*. 6, 81-84.
- Costa, L. P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*. 30, 71-86.
- Cracraft, J., R. O. Prum. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution*. 42, 603-620.
- D'Horta, F. M. 2009. Filogenia molecular e filogeografia de espécies passeriformes (Aes): história biogeográfica da região neotropical com ênfase na Floresta Atlântica. São Paulo, Universidade de São Paulo, 125 p.

- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer, A. Wilson. 2011. Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com>.
- Drummond A. J., A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7, 214.
- Groth, J. and G. F. Barrowclough. 1999. Basal divergences in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12, 115-123.
- Hellmayr, C. E. 1929. Catalogue of birds of the Americas and the adjacent island. Part VI. Oxyruncidae-Pipridae-Cotingidae-Rupicolidae-Phytotomidae. *Field Mus. Nat. Hist.* 13, Publ. 266, 1-258.
- Haffer, J. 1974. Avian speciation in tropical South America. Nuttall Ornithol. Club, Cambridg, MA.
- Haffer, J. 1978. Distribution of Amazon forest birds. *Bonner Zoologische Beitrage*. 29, 38-78.
- Haffer, J. 1987. Biogeography of Neotropical birds. IN: Whitmore, T.C. and Prance, G.T. (Eds.), *Biogeography and Quaternary History of Tropical America*. Clarendon Press, Oxford, pp. 105-150.
- Haffer, J. 1997. Contact zones between birds of southern Amazonia. *Ornithological Monographs*. 48, 281-305.
- Hasegawa, M., H. Kishino, T. Yano. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22, 160-174.
- Hayes, F. E., J. N. Sewlal. 2004. The Amazon river as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography*. 31, 1809-1818.

- Heled, J., A. J. Drummond. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Mol. Biol. Evol.* 27, 570-580
- Höglund, J., L. Shorey. 2004. Genetic divergence in the superspecies *Manacus*. *Biological Journal of the Linnean Society.* 81, 439-447.
- Ivanova, N. V., T. S. Zemlak, R. H. Hanner, P. D. N. Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes.* 7, 544-548.
- Irion, G., J. Muller, J. N. de Mello, W. J. Junk. 1995. Quaternary geology of the Amazonian lowland. *Geo-Mar. Lett.* 15, 172-178.
- Johnson, K. P., J. D. Weckstein. 2011. The Central America land bridge as an engine of diversification in New World doves. *Journal of Biogeography.* 38, 1069-1076.
- Kirwan, G. M. 2011. External characters suggest that Long-tailed Manakin *Chiroxiphia linearis* is monotypic. *Bull. B.O.C.* 131, 76-80.
- Kirwan, G. M. e G. Green. 2011. Cotingas and manakins. Christopher Helm, London, UK. 624 p.
- Lundberg, J. G., L. G. Marshall, J. Guerrero, B. Horton, M. C. S. Malabarba, F. Wesselingh. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. IN: L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena, C. A. S. Lucena, (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Editora da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, pp. 13-48.
- Marks, B. A., S. J. Hackett, A. P. Capparella. 2002. Historical relationships 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.
- McKay, B. D., F. K. Barker, H. L. Mays Jr., S. M. Doucet, G. E. Hill. 2010. A molecular phylogenetic hypothesis for the manakins (Aves: Pipridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 55, 733-737.

- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology*. 101, 20-78.
- Miller, W. D. 1908. A review of the manakins of the genus *Chiroxiphia*. *Bulletin American Museum of Natural History*. 24, 331-343.
- Miller, M. J., E. Bermingham, J. Klicka, P. Escalante, F. S. R. do Amaral, J. T. Weir, K. Winker. 2008. Out of Amazonia again and again: episodic crossing of the Andes promotes diversification in a lowland forest flycatcher. *Proc. R. Soc. B*. 275, 1133-1142.
- Miller, M. A., W. Pfeiffer, T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. IN: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA, pp. 1-8.
- Nyári, A. 2007. Phylogeographic patterns, molecular and vocal differentiation, and species limits in *Schiffornis turdina* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44, 154-164.
- Pacheco, J. F. e R. Parrini. 1995. O rei-dos-tangarás (*Chiroxiphia caudata* X *Antilophia galeata*) no sul de Minas Gerais. *Atualidades Ornitológicas*. 66, 14.
- Parker III, T. A. and J. V. Remsen Jr. 1987. Fifty-two Amazonian bird species new to Bolivia. *Bull. B.O.C.* 107, 94-107.
- Patel, S., J. D. Weckstein, J. S. Patané, J. Bates, A. Aleixo. 2011. Temporal and spatial diversification of *Pteroglossus* arçaris (AVES: Ramphastidae) in the neotropics: Constat rate of diversification does not support an increase in radiation during the Pleistocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 58, 105-115.
- Pinto, O. M. de O. 1944. *Catalogo das Aves do Brasil e lista dos exemplares na coleção do Departamento de Zoologia: 2º parte, Ordem Passeriformes (continuação): Superfamília Tyrannoidea e Subrodem Passeres*. São Paulo, Departamento de Zoologia, 700 p.
- Prum, R. O. 1992. Syringeal morphology, phylogeny, and evolution of the Neotropical manakins (Aves Pipridae). *American Museum Novitates* 3043, 1-65.

- Prum, R. O. 1994a. Species status of the White-fronted Manakin, *Lepidothrix serena* (Pipridae), with comments on conservation biology. *Condor* 96: 692-702.
- Prum, R. O. 1994b. Phylogenetic analysis of the evolution of alternative social behavior in the manakins (Aves: Pipridae). *Evolution*. 48, 1657-1675.
- Prum, R. O. 1997. Phylogenetic tests of alternative intersexual selection mechanisms: macroevolution of male traits in a polygynous clade (Aves: Pipridae). *American Naturalist* 149, 668-692.
- Prum, R. O. 1998. Sexual selection and the evolution of mechanical sound production in manakins (Aves: Pipridae). *Animal Behaviour* 55, 977-994.
- Prum, R. O. and W. E. Lanyon. 1989. Monophyly and phylogeny of the *Schiffornis* group (Tyrannoidea). *Condor* 91, 444-461.
- Rambaut, A., A. J. Drummond. 2009. Tracer v. 1.5. disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rêgo, P. S., J. W. A. Araripe, G. Silva, C. Albano, T. Pinto, A. Campos, M. Vallinoto, I. Sampaio, and H. Scheneider. 2010. Population genetic studies of mitochondrial pseudo-control region in the endangered Araripe Manakin (*Antilophia bokermanni*). *Auk*. 127, 335-342.
- Remsen Jr., J. V., C. D. Cadena, A. Jaramillo, M. Nores, J. F. Pacheco, M. B. Robbins, T. S. Schulenberg, F. G. Stiles, D. F. Stoz, and K. J. Zimmer. Version: 14 November 2011. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>
- Ribas, C. C., C. Y. Myaki, R. Gaba-Lima, J. Cracraft. 2005. Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus "*Pionopsitta*" (Aves; Psittacidae). *Journal of Biogeography*. 32, 1409-1427.
- Ribas, C. C., C. Y. Myiaki, J. Cracraft. 2009. Phylogenetic relationships, diversification and biogeography in Neotropical *Brotogeris* parakeets. *Journal of Biogeography*. 36, 1712-1729

- Ridgely, R. S. and G. Tudor. 1994. The birds of South America. Vol. 2. Univ. Texas Press, Austin. 813 p.
- Santos, A. M. M., D. R. Cavalcanti, J. M. C. da Silva, and M. Tabarelli. 2007. Biogeographical relationships among tropical forests in north-eastern Brazil. *Journal of Biogeography* 34, 437-446.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro. Nova Fronteira, 912 p.
- Silva, J. M. C., F. C. Novaes, D. C. Oren. 2002. Differentiation of *Xiphocolaptes* (Dendrocolaptidae) across the river Xingu, Brazilian Amazonia: recognition of a new phylogenetic species and biogeographical implications. *Bull. B. O. C.* 122, 185-194.
- Snow, D. W. 1971. Social organization of the Blue-backed Manakin. *Wilson Bull.* 83, 35-38.
- Snow, D. W. 1975. The classification of the manakins. *Bull. B.O.C.* 95, 20-27.
- Snow, D. W. 1979. Family Pipridae. IN: Traylor Jr., M. A, (Eds.). Check-list of birds of the World, Vol.8. Museum of Comparative Zoology, Cambridge, Massachusetts, pp. 245-280.
- Snow, D. W. 1985. Affinities and recent history of the avifauna of Trinidad and Tobago. *Orn. Monogr.* 36, 238-246.
- Snow, D. W. 2004. Family Pipridae (Manakins). IN: del Hoyo, J., A. Elliot, D. A. Christie, (Eds.), *Handbook of the Birds of the World. Cotingas to Pipits and Wagtails.* vol. 9. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 110-169.
- Sorenson, M. D., J. C. Ast, D. E. Dimcheff, T. Yuri e D. P. Mindell. 1999. Primers for a PCR-Based Approach to Mitochondrial Genome Sequencing in Birds and Other Vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 12, 105-114.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics.* 22, 2688-2690.

- Stamatakis, A., P. Hoover, J. Rougemont. 2008. A fast bootstrapping algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology*. 57, 758-771.
- Tello, J.G., R. G. Moyle, D. J. Marchese, and J. Cracraft. 2009. Phylogeny and phylogenetic classification of the tyrant flycatchers, cotingas, manakin and their allies (Aves Tyrannides). *Cladistics* 25, 1-39.
- Trainer, J. and D. McDonald. 1993. Vocal repertoire of the Long-tailed Manakin and its relation to male-male cooperation. *Condor*. 95, 769-781.
- Weir, J. T. e M. Price. 2011. Andean uplift promotes lowland speciation through vicariance and dispersal in *Dendrocincla* woodcreepers. *Molecular Ecology*. 20, 4550-4563.
- Weir, J. T., e D. Schluter. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*. 17, 2321-2328.
- Yang, Z. 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *Journal of Molecular Evolution* 39, 306-314.