



**MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ZOOLOGIA**

**Biogeografia e Filogeografia comparada do complexo
Micrastur ruficollis (Aves, Falconidae)**

LEONARDO MOURA DOS SANTOS SOARES

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Mestrado, do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de mestre em Zoologia.

Orientador: Dr. Marcos Pérsio Dantas Santos

Co-orientador Dr. Alexandre Aleixo

Belém – Pará

2012

LEONARDO MOURA DOS SANTOS SOARES

**Biogeografia e Filogeografia comparada do complexo
Micrastur ruficollis (Aves, Falconidae)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Mestrado, do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de mestre em Zoologia.

Orientador: Dr. Marcos Pérsio Dantas Santos

Co-orientador: Dr. Alexandre Aleixo

BELÉM – PARÁ

2012

LEONARDO MOURA DOS SANTOS SOARES

**Biogeografia e Filogeografia comparada do complexo
Micrastur ruficollis (Aves, Falconidae)**

Dr. Marcos Pérsio Dantas Santos

Orientador

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Ecologia e Zoologia de Vertebrados

Dr. Mário Cohn-Haft

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dr. Fábio Sarubbi Raposo do Amaral

Titular

Universidade Federal de São Paulo Campos Diadema, Departamento de Ciências Biológicas

Dr. Luis Fábio Silveira

Titular

Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia

Dr. Péricles Sena do Rêgo

Titular

Universidade Federal do Pará Campos Bragança, Laboratório de Genética e Biologia Molecular

Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza

Titular

Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, Laboratório de Genética e Biologia Molecular

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, ao programa de pós-graduação. A Capes pelo suporte financeiro durante estes dois anos de pesquisas. Agradeço aos meus orientadores Marcos Pérsio e Alexandre Aleixo, pela oportunidade de trabalharmos juntos. Pelo incentivo, pela orientação e por todas as construtivas ideias que me fizeram entender melhor a sistemática e a taxonomia das aves.

Ao Dr. Luis Fábio Silveira curador da Coleção de Aves do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, por me disponibilizar o material que dispunha e ao Dr. Marcos Raposo curador da Coleção de Aves do Museu nacional do Rio de Janeiro pela receptividade e disponibilizar o material.

Aos amigos da ornitologia do Goeldi: Eduardo, Lincoln, Sidão, Marcos, Marcela e Fernanda pelas saídas de fim de semana pra “desestressar”. A Cinthia, Carla e Tibério pela ajuda com todas as análises moleculares e toda a parte laboratorial (Obrigado mesmo). A Fátima Lima pela dedicação, simpatia e pelo maravilhoso trabalho permitindo que encontremos todas as informações da coleção de Aves do MPEG. A Romina, Gregory, Lucas, Denise e Eduardo pelas conversas e discussões que ajudaram bastante na realização deste trabalho. Ao Rodrigo Pena e Zé Luiz pela amizade. Aos amigos que se somaram durante esses dois anos no museu Matheus, Bruno e Antonita. E aos recém chegados Pablo, Gabriela e Maíra.

Aos amigos da Pós-Graduação, Aos meus colegas de mestrado vocês foram muito importantes nessa jornada. Aos amigos do futebol.

Aos meus amigos do UESPI e UFPI, em especial a Marcos Pérsio pela primeira orientação e a André Bastos, Fábio Lopes e Pablo Cerqueira pelas discussões que ajudaram a me despertar para ciência, valeu mesmo.

Um agradecimento especial a minha “Namorada” Lidyane Costa, sem ela eu certamente nem teria chegado até aqui, ela foi minha inspiração e motivação nessa empreitada e foi muito compreensiva durante todo esse período a distância, obrigado Meu Amor.

À minha família, que sem dúvida me ajudaram bastante: em especial meus pais João Evangelista e Maria de Jesus que trabalharam muito pra que isso tudo fosse possível, aos meus irmãos: Márcio Cleto, Mara Layanne, Marcos Lívio e Laércio. As sobrinhas Emille e Lívia Mariane e minha cunhada Mayara, vocês foram muito importantes nesta jornada.

MUITO OBRIGADO

Sumário

Agradecimentos.....	i
Sumário.....	iii
Introdução geral	7
Referências bibliográficas	9
Revisão Sistemática e Biogeografia do Complexo <i>Micrastur ruficollis</i> (Aves Falconidae)	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. Introdução	13
2. Material e métodos	16
2.1 Amostragem	16
2.2 Análises filogenéticas	20
2.3 Relógio molecular	22
3. Resultados	22
3.1 Filogenia Molecular.....	22
3.2 Estimativas do tempo de diversificação	27
3.3 Incongruências Taxonômicas	30
4. Discussão	30
4.1 Filogenia e limites interespecíficos.....	30
4.2 Diversificação histórica do complexo <i>Micrastur ruficollis</i> na Amazônia.....	32
5.0 Referências bibliográficas	36

Introdução Geral

Compilações recentes apontam que a Amazônia é habitada por cerca de 1.300 espécies de aves, dentre as quais 265 são endêmicas Mittermeier *et al.* (2003). Apesar do conhecimento sobre avifauna ser o maior dentre os grupos biológicos amazônicos, vários estudos têm revelado a existência de muitas lacunas, evidenciadas pela descrição contínua de novas espécies de aves nas últimas décadas, várias delas para a Amazônia (Silveira e Olmos 2007).

Boa parte destes estudos revelaram que muitas espécies com ampla distribuição na bacia Amazônica são na verdade compostas por complexos de espécies (Bierregaard *et al.* 1997, Krabbe *et al.* 1999, Zimmer 2002, Aleixo 2002, 2004, Ribas *et al.* 2011), ou seja, por populações alopátricas ou parapátricas bastante diferenciadas vocal e geneticamente, que se comportam como unidades evolutivamente independentes. Portanto, novos estudos taxonômicos deverão revelar uma diversidade muito maior do que aquela conhecida atualmente para a avifauna amazônica.

O conhecimento da diversidade, das filogenias e distribuição dos organismos na Amazônia ainda é insuficiente, sendo que muitas espécies de numerosos grupos taxonômicos coletados nas últimas décadas ainda precisam ser examinados cuidadosamente (Silva *et al.* 2005).

Esta Dissertação de mestrado possui dois objetivos gerais: (a) investigar a filogeografia comparada de três espécies do complexo *Micrastur ruficollis* (*M. ruficollis*, *M. gilvicollis* e *M. mintoni*), que ocorrem na bacia amazônica, com a finalidade de identificar os contextos temporal e espacial da diversificação do grupo no bioma; e (b) reavaliar com base em caracteres moleculares o status taxonômico e limites interespecíficos entre os táxons do complexo.

- 1) Para a melhor apresentação da Dissertação, os objetivos serão cobertos no artigo abaixo:

Revisão sistemática e biogeografia do complexo *M. ruficollis* (Aves Falconidae): o complexo de espécies *Micrastur ruficollis* é de especial interesse para estudos de filogeografia na bacia amazônica, pois preenche requisitos básicos como a existência de espécies politípicas e com ampla distribuição na bacia amazônica. Portanto, tem sido de interesse para aqueles que tentam entender a história de diversificação desta região. Aqui utilizamos análises filogenéticas, biogeográficas e estimativas do tempo de diversificação deste grupo para tentar revelar um cenário espacial e temporal de diversificação dentro da Amazônia e fornecer novas evidências sobre a importância destes processos históricos na formação do bioma.

Referências bibliográficas

- Aleixo, A. 2002. Molecular systematic and the role of the “várzea - terra-firme” ecotone in the diversification of *Xiphorhynchus* woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). **Auk** 119: 621-640.
- Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a “terra-firme” forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. **Evolution** 58: 1303-1317.
- Bierregaard Jr, R. O.; M. Cohn-Haft; D. F. Stotz & D. M. Teixeira. 1997. Cryptic biodiversity: an overlooked species and new subspecies of antbird (Formicariidae) with revision of *Cecomacra tyrannina* in northwestern South America. **Ornithol. Monogr.** 48: 111–128.
- Krabbe, N. & T. S. Schulenberg. 1997. Species limits and natural history of *Scytalopus tapaculos* (Rhinocryptidae), with descriptions of Ecuadorian taxa, including three new species. **Ornithol. Monogr.** 48:47–88.
- Mittermeier, R. A.; C. G. Mittermeier; T. M. Brooks; J. D. Pilgrim; W. R. Konstant; G. A. B. Fonseca & C. Kormos. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. **Proceedings of the National Academy of Science** 100: 10309–10313.
- Silva, J. M. C.; A. B. Rylands & G. A. B. Fonseca. 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. **Conservation Biology** 19 (3): 689-694.
- Silveira, L. F. & F. Olmos. 2007. Quantas espécies de aves existem no Brasil? Conceitos de espécie, conservação e que falta descobrir. **Revista Brasileira de Ornitologia** 15(2): 289-296.
- Zimmer, K. J. 2002. Species limits in Olive-blacked foliage-gleaners (*Automolus*: Furnariidae). **Wilson Bull.** 114 (1): 20-37.

**Revisão Sistemática e Biogeografia do Complexo *Micrastur ruficollis*
(Aves Falconidae)**

Leonardo Moura dos Santos Soares¹, Marcos Pécio Dantas Santos² e
Alexandre Aleixo³

¹ *Curso de Pós-Graduação de Zoologia, Universidade Federal do Pará / Museu
Paraense Emílio Goeldi, Caixa Postal 399, CEP 66040-170, Belém, Pará, Brazil*

² *Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de
Ecologia e Zoologia de Vertebrados, Av. Augusto Correia, n 1, Guamá – Belém – PA
CEP 66075-110*

³ *Coordenação de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Caixa Postal 399, CEP
66040-170, Belém, Pará, Brazil*

RESUMO - O debate central em biogeografia Neotropical diz respeito à importância dos eventos climáticos e geológicos na geração de riqueza de espécies atuais. Estudos que revelam a distribuição e relações filogenéticas entre táxons proximamente relacionados podem fornecer informações acerca dos eventos biogeográficos responsáveis pelos processos de diversificação na bacia amazônica. Além disso, tem sido importantes para desenvolver e testar hipóteses sobre processos evolutivos históricos relacionados com a origem da biodiversidade atual. Desta forma, o presente artigo tem como objetivos principais: (1) investigar a filogeografia comparada de três espécies do complexo *Micrastur ruficollis* (*M. ruficollis*, *M. gilvicollis* e *M. mintoni*), com a finalidade de identificar os contextos temporal e espacial da diversificação do grupo; e (2) reavaliar com base em caracteres moleculares o status taxonômico e limites interespecíficos entre os táxons do complexo. As filogenias moleculares foram baseadas em 3.305 pares de bases dos genes mitocondriais ND2 e *cyt b* e dos genes nucleares BF5 e MUSK de 41 espécimes, incluindo como grupos externos os táxons *M. mirandollei* e *M. semitorquatus*. As árvores filogenéticas obtidas por ML, IB e Árvore de Espécies recuperaram uma única topologia agrupando todos espécimes analisados do complexo *M. ruficollis* em um clado fortemente apoiado, embora as relações internas mais basais dentro do mesmo não tenham sido bem apoiadas estatisticamente. As datas das árvores moleculares indicaram que a separação entre as espécies do complexo ocorreram entre 4 e 5 milhões de anos tendo se iniciado durante o Neógeno (Plioceno) e que resultou na diversificação de 10 linhagens, (sub-clados) em *M. ruficollis*, *M. gilvicollis* e *M. Mintoni*, principais até os dias de hoje que poderão ser consideradas espécies crípticas sob conceitos alternativos de espécie mediante a análises adicionais com base em caracteres fenotípicos.

Palavras chaves: revisão sistemática, filogeografia, biogeografia, complexo *Micrastur ruficollis*

ABSTRACT - The central debate on Neotropical biogeography is related to the importance of climatic and geological events for the formation of wealth species now existing. Researches that reveal the distribution and phylogenetic relations between closely related taxa can provide information about the biogeographic events responsible for diversification processes in the Amazon Basin. In addition, they have been important for developing and testing hypotheses about evolutionary and historical processes related to the origins of biodiversity at present. For that reason, the present article has as main aims: (1) to investigate the comparative phylogeography of three species from the *Micrastur ruficollis* complex (*M. ruficollis*, *M. gilvicollis* and *M. mintoni*), to the effect of identifying the temporal and spatial context of the group diversification and (2) reevaluate based on molecular characters the taxonomic status and interspecific boundaries among taxa of the complex. The molecular phylogenies were based on 3,305 pairs of bases from mitochondrial genes ND2 and *cyt b* and from nuclear genes BF5 and MUSK of 41 specimens, including as external group the taxa *M. mirandollei* and *M. semitorquatus*. The phylogenetic trees obtained by ML, IB and Tree Species reestablished just one topology gathering all the specimens analyzed from the complex *M. ruficollis* in one cladogram strongly supported, besides the more internal basic relations in the complex had not been well supported statistically. The dates in the molecular tree indicated that the separation of species from the complex occurred among 4 to 5 million years which initiated in the Neogene (Pliocene) and results in diversification of 10 principal lineages until today, sub-cladograms in *M. ruficollis*, *M. gilvicollis* and *M. mintoni*, which can be considered cryptic species under alternative concepts of species by means of additional analysis based on phenotypic characters.

Keywords: Systematic review, phylogeography, biogeography, *Micrastur ruficollis* complex.

1. Introdução

O debate central em biogeografia Neotropical diz respeito à importância dos eventos climáticos e geológicos na geração de riqueza de espécies atuais (Rull 2006). Evidências moleculares apontam para um cenário onde a maioria das divergências observadas e eventos de especiação estavam associados a eventos paleogeográficos do Mioceno tardio (Moritz *et al.* 2000, Antonelli *et al.* 2010). No entanto, outros estudos sugerem um papel mais significativo para os ciclos climáticos do Pleistoceno (Thoisly *et al.* 2010). O fato é que até hoje os processos que deram origem a diversidade Amazônica ainda não são totalmente conhecidos e várias hipóteses já foram levantadas com o objetivo de esclarecer que condições no passado permitiram a evolução de um grau tão alto de diversificação (Ribas & Myiaki 2007).

Estudos que revelam a distribuição e relações filogenéticas entre táxons proximamente relacionados podem fornecer informações acerca dos eventos biogeográficos responsáveis pelos processos de diversificação na bacia amazônica. A utilização desta abordagem foi estabelecida por Avise (2000), denominando-se filogeografia e que constitui uma abordagem eficaz para elucidar padrões de fluxo gênico, hibridização, fragmentação histórica de distribuição, expansão e especiação entre muitas linhagens de organismos.

Estudos de filogeografia comparada tem sido importantes para desenvolver e testar hipóteses sobre processos evolutivos históricos relacionados com a origem da biodiversidade atual. A filogeografia comparada tem o potencial de incorporar a informação dos componentes históricos e geográficos a níveis intra e interespecíficos, assim tornando mais detalhado o entendimento dos padrões de variação em grupos co-distribuídos (Hoffman & Baker 2003). Comparar esses padrões inter e intraespecíficos a

partir de espécies co-distribuídas permite avaliar como linhagens independentes responderam aos mesmos processos históricos numa determinada região (Aulsebrook *et al.* 1987, Moritz & Faith 1998).

Dentro deste contexto, o gênero *Micrastur* é composto por 7 espécies e 8 subespécies (dependendo da autoridade taxonômica), todos os táxons são endêmicos da região Neotropical, ocorrendo desde o sul do México ao norte da Argentina (Del Hoyo *et al.* 1994). Este gênero tem uma grande diversidade de padrões de distribuição, sendo algumas espécies endêmicas de florestas tropicais e subtropicais e outras amplamente distribuídas. Esta variedade de padrões torna o gênero *Micrastur* de especial interesse para uma melhor compreensão da história dos padrões de diversificação na região Neotropical.

A espécie *Micrastur ruficollis* foi descrita por Vieillot (1817), alocada inicialmente no gênero *Sparvius* (*Sparvius ruficollis*). Posteriormente, Sclater (1858), revisou parte dos Falconiformes neotropicais e sugeriu a sinonímia dos gêneros *Sparvius* e *Micrastur*, realocando *S. ruficollis* no gênero *Micrastur*. Um grupo de autores reconheceu o taxón *M. gilvicollis* (Vieillot 1817) como uma subespécie de *M. ruficollis* com ampla distribuição na bacia amazônica (Sclater 1918, Peters 1931, Amadon 1964, Brown & Amadon 1968), enquanto outro o tratou como espécie distinta de *M. ruficollis* (Hellmayr 1910, 1921, Pinto 1935, 1947, 1964, Hellmayr & Conover 1949, Meyer Schauensee 1966), status esse reconhecido até hoje a partir do trabalho de Schwartz (1972).

Outros dois táxons do complexo, *M. Pelzelni* (Ridgway 1875), e *M. Concentricus* (Lesson 1830) possuem, respectivamente, validade questionada e status taxonômico incerto até o momento. Schwartz (1972) comparou a morfologia e a vocalização dos táxons do complexo *M. ruficollis*, principalmente aqueles distribuídos

na bacia Amazônica (*gilvicollis*, *concentricus*, *ruficollis* e *pelzelni*), e constatou que *gilvicollis* correspondia aos espécimes que apresentavam asas longas e cauda curta. Já os espécimes correspondentes a *concentricus* e *pelzelni* apresentaram asas curtas e cauda longa, respectivamente, o que levou Schwartz (1972) a propor a sinonímia entre eles. Desta forma, Schwartz (1972) acabou por validar o táxon *gilvicollis* como uma espécie biológica de ampla distribuição na bacia amazônica e considerou *concentricus* como uma subespécie da outra espécie biológica validada por ele (*M. ruficollis*) e que é simpátrica e sintópica com *M. gilvicollis* em algumas regiões da Amazônia. Mais recentemente, um novo táxon (*mintoni*) foi descrito como espécie biológica críptica representando as populações ao sul do rio Amazonas e leste do rio Madeira e Mata Atlântica anteriormente agrupadas em *M. gilvicollis* (Whittaker 2002).

Uma filogenia para o gênero *Micrastur* foi proposta utilizando caracteres moleculares (Fuchs *et al.* 2011). Essa filogenia recuperou a monofilia das sete espécies que compõem o gênero *Micrastur*, bem como do complexo *Micrastur ruficollis*, que além das espécies biológicas distribuídas na Amazônia (*M. ruficollis*, *M. gilvicollis* e *M. mintoni*) também inclui *M. plumbeus* distribuído a oeste dos Andes na região do Chocó (Fuchs *et al.* 2011). No entanto, as relações internas entre as espécies do complexo *M. ruficollis* não foram bem apoiadas estatisticamente, além de não terem sido incluídos todos os táxons do complexo como, por exemplo, *concentricus*.

Desta forma, o presente artigo tem como objetivos principais: (1) investigar a filogeografia comparada de três espécies do complexo *Micrastur ruficollis* (*M. ruficollis*, *M. gilvicollis* e *M. mintoni*), que ocorrem na bacia amazônica, com a finalidade de identificar os contextos temporal e espacial da diversificação do grupo no bioma; e (2) reavaliar com base em caracteres moleculares o status taxonômico e limites interespecíficos entre os táxons do complexo.

Nesse sentido, o complexo de espécies *Micrastur ruficollis* é de especial interesse para estudos de filogeografia na bacia amazônica, pois preenchem requisitos importantes como a existência de espécies politípicas alopátricas, parapátricas e simpátricas com ampla distribuição na região e subespécies endêmicas a determinados interflúvios. Aqui, utilizamos análises filogenéticas, biogeográficas e estimativas do tempo de diversificação deste grupo para revelar um cenário espacial e temporal de diversificação dentro da Amazônia.

2. Material e Métodos

2.1 Amostragem

O DNA total de 36 espécimes do complexo *M. ruficollis*, dentre estes 8 espécimes pertencentes a *M. gilvicollis*, 14 a *M. mintoni*, 11 a *M. r. ruficollis* e 3 a *M. r. concentricus*; além de 5 espécimes correspondentes ao grupo externo, dentre estes 4 *M. semitorquatus* e 1 *M. mirandollei*, foram extraídos de tecidos da musculatura peitoral usando procedimentos padrões com a técnica de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989; Tabela 1). O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Museu Paraense Emilio Goeldi – (LBM-MPEG).

Tabela 1. Informações Gerais sobre as amostras de tecidos sequenciadas nesse estudo.

Voucher	N campo	Espécie	Subespécie	Localidade
MPEG 59314	AMZ 368	<i>Micrastur gilvicollis</i>		AM, Rio Cuiuni, margem esquerda, Barcelos (00°47'00"S,63°16'54"W)
MPEG 65728	CN 631	<i>Micrastur gilvicollis</i>		PA, Oriximiná, ESEC Grão Pará (01°17'N;58°41'W)
MPEG 66167	CN 967	<i>Micrastur gilvicollis</i>		AM, Almeirim, REBIO Maicuru (00°49'N;53°55'W)
MPEG 60437	UFAC 196	<i>Micrastur gilvicollis</i>		AC, Plácido de Castro, Ramal Novo Horizonte, km 09 (10°07'42,2"S, 67°19'42,5"W)
MPEG 60438	UFAC 211	<i>Micrastur gilvicollis</i>		AC, Plácido de Castro, Ramal Novo Horizonte, km 09 (10°07'42,2"S, 67°19'42,5"W)
MPEG 71370	JRD 010	<i>Micrastur gilvicollis</i>		AC, Jordão
MPEG 61156	PUC 283	<i>Micrastur gilvicollis</i>		AM, Coari, Base Petrobrás/Urucu, SUC -1
MPEG 62394	JAP 700	<i>Micrastur gilvicollis</i>		AM, Maraã, Lago Cumapi (01°33'34,5"S;65°52'48,2"W)
MPEG 64592	CN 187	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>concentricus</i>	PA,FLOTA de Faro, 70 km NW de Faro (01°42'S;57°12'W)
MPEG 64958	CN 298	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>concentricus</i>	PA, Óbidos, Flota do Trombetas (00°57'S;55°31'W)
MPEG 62393	JAP 657	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>concentricus</i>	AM, Maraã, Lago Cumapi (01°33'34,5"S;65°52'48,2"W)
MPEG 67110	FPR 009	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	AM, Maués, Flona do Pau Rosa, Comunidade Caiaué (04°01'37,6"S;58°26'05,6"W)
MPEG 56977	PUC 221	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	AM, Tefé, Base Petrobras/Urucu, Papagaio (04° 51'S, 65° 04'W)
MPEG 61653	PPBIO 212	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	PA, Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
MPEG 72308	MPDS 0972	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	PI; Mun. Guadalupe; Faz. Maharish; Praia dos Indianos
MPEG 63472	UFAC 1358	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	AC, Porto Acre, AC 010 linha 07, Reserva Humaitá (09°45'47,8"S;67°36'32,9"W)
MPEG 60436	UFAC 210	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	AC, Plácido de Castro, Ramal Novo Horizonte, km 09 (10°07'42,2"S, 67°19'42,5"W)
MPEG 67238	TLP(B) 127	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	AC, Paranaíta, margem esquerda Rio Paranaíta, Fazenda Aliança (9°33'46"S;56°45'40,8"W)
MPEG 60435	UFAC 574	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	AC, Bujari, Floresta Estadual do Antimary, Limoeiro (09°21'09,0"S,68°05'40,2"W)
MPEG 61217	UFAC 905	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	AC, Rio Branco, Transacreana (AC-090) km 70, Ramal Jarinal km 11 (09°54'02,1"S,68°28'32,1"W)
MPEG 70649	SLB 122	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	PA, Carajás, Salobo
MPEG 72308	ARA 074	<i>Micrastur ruficollis</i>	<i>ruficollis</i>	PA, Santarém, Resex Tapajós Arapiuns
MPEG 54849	ECFP03	<i>Micrastur mintoni</i>		PA, Melgaço, Caxiuanã, Estação Científica Ferreira Penna (1°44'S, 51°27'W)

MPEG 66004	FLJA 048	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Novo Progresso, margem esquerda Rio Jamanxim
MPEG 58956	FRC 079	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Paragominas, Fazenda Rio Capim, CIKEL (03°43'07.1"S, 48°36'25.3"W)
MPEG 65180	MPDS 1227	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Jacareacanga, FLONA do Crepori, Rio das Tropas, Cotovelo (06°31'8,23"S;57°26'40,4"W)
MPEG 65670	MPDS 1308	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Jacareacanga, FLONA Crepori, Rio das Tropas, Cotovelo (6°31'823"S; 57°26'40,4"W)
MPEG 69665	PIME 484	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Jacareacanga, Igarapé do Rato (05°24'02,3"S;56°55'04,2"W)
MPEG 61655	PPBIO 092	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
MPEG 61654	PPBIO 125	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
MPEG 61656	PPBIO 139	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
MPEG 61657	PPBIO 302	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)
MPEG 66077	RT 020	<i>Micrastur</i>	<i>mintoni</i>	PA, Parauapebas, REBIO do Tapirapé (trilha da lagoa) (5°40'30,6"S;50°18'09,1"W)
MPEG 69077	TLP(C) 094	<i>Micrastur</i>	<i>Mintoni</i>	MT, Paranaíta, Rio Teles Pires, margem direita
MPEG 63858	TM 035	<i>Micrastur</i>	<i>Mintoni</i>	PA, Altamira, Floresta Nacional de Altamira (06°09'S;55°02'W)
MNT 1397	MNT 1397	<i>Micrastur</i>	<i>Mintoni</i>	PA, Serra do Cachimbo
MPEG 66391	CN 986	<i>Micrastur</i>	<i>semitorquatus semitorquatus</i>	AP, Almeirim, REBIO Maicuru (00°49'N;53°55'W)
MPEG 67799	NZT 0224	<i>Micrastur</i>	<i>semitorquatus semitorquatus</i>	PI; Mun. José de Freitas; Eco Resort Nazareth
MPEG 60933	MPDS 0951	<i>Micrastur</i>	<i>semitorquatus semitorquatus</i>	Pa, Juruti, Projeto Juruti/Alcoa, Acampamento Mutum (02°36'S;56°11'W)
MPEG 67798	MPDS 1110	<i>Micrastur</i>	<i>semitorquatus semitorquatus</i>	PI; Mun. Guadalupe; Faz. Maharish; Praia dos Indianos
MPEG 71371	JRD 020	<i>Micrastur</i>	<i>mirandollei</i>	AC; Jordão

Os genes mitocondriais *NADH dehidrogenase* subunidade 2 (ND2) e Citocromo *b* (*cyt b*) e os genes nucleares íntron 5 do Beta-fibrinogênio (BF5) e Receptor muscular específico de tirosina-kinase intron 3 (MUSK) dos espécimes foram amplificados via PCR. Foi utilizado aproximadamente 20 ng de DNA genômico, 10 mM de DNTPs, 50 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e 200 ng/microlitros ou 10 pmol de cada um dos iniciadores (Tabela 2). O perfil de amplificação para os genes constituiu dos seguintes passos, podendo ser ajustados: 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 58°C, 54°C, 59°C e 50°C para genes ND2, *cyt b*, BF5 e MUSK respectivamente; e 1 minuto a 72°C, sendo estes precedidos por um passo inicial de 5 minutos a 95°C para a homogeneização da temperatura do bloco e seguidos por um passo final de 5 minutos, a 72°C, para polimerização de eventuais moléculas, das quais a polimerase tenha se dissociado antes do final da síntese total do gene.

Tabela 2. Sumário de primer usados neste estudo

Gene	Primer	Sequencia 5' - 3'	Referência
ND2	L5215	TATCGGGCCACTACCCCGAAAT	Hackett, (1996)
	H6313	TCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	Sorenson <i>et al.</i> (1999)
Cyt b	L14841	GCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATG	Kocher <i>et al.</i> (1989)
	H16064	CTTCGATCTTTGGCTTACAAGACC	Harshman (1996)
BF5	S713	CGCCATACAGAGTATACTGTGACAT	Fuchs <i>et al.</i> (2004)
	AS767	GCCATCCTGGCGATCTGAA	Fuchs <i>et al.</i> (2004)
MUSK	13F	CCTCCATGCACTACAATG GGA AA	Clark & Witt (2006)
	13R	CTCTGAACATTGATCCTCAA	Clark & Witt (2006)

Os produtos das amplificações após serem purificados com PEG (Polietilenoglicol) 8000 foram sequenciados no Aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems) Kit Bigdye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 de acordo com as

especificações do fabricante. As sequências nucleotídicas foram editadas utilizando o aplicativo BioEdit 7.0.5 (Hall 1999).

A presença de saturação de bases foi estabelecida plotando o número de transições e transversões *versus* a divergência nucleotídica usando o programa Dambe versão 4.2.13 (Xia & Xie 2001). As seguintes medidas foram tomadas para assegurar que os genes mitocondriais fossem realmente de origem mitocondrial e não pseudogenes: (1) ambas as fitas de DNA foram sequenciadas e (2) as sequências foram analisadas no programa BioEdit (Hall 1999) quanto a presença de inserções, deleções e códons de parada que resultaria em proteínas não funcionais. A composição das bases, as taxas de transversões e a porcentagem de sítios invariáveis e informativos foram calculados usando o programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004). O modelo evolutivo selecionado pelo programa Mrmodeltest foi baseado no critério de minimum theoretical Akaike Information Criterion AIC (Akaike 1974), o que minimiza a distância esperada entre o modelo verdadeiro e o estimado pelo programa.

2.2. Análises Filogenéticas

Hipóteses filogeográficas para as populações dos espécimes estudados foram estimadas utilizando dois critérios distintos: Máxima Verossimilhança (ML) e Métodos Bayesianos (IB). O método de máxima verossimilhança foi realizado no programa RAxML (Stamatakis 2006, Stamatakis *et al.* 2008). Foi utilizado o teste “likelihood ratio” incorporado ao programa Mrmodeltest 2.3 (Nylander 2004) para selecionar o melhor e mais simples modelo de evolução molecular capaz de explicar a variação nas sequências analisadas, o qual foi usado na busca por ML. Foram empregadas 1.000 réplicas não paramétricas de *bootstrap* nas buscas feitas com ML. As filogenias com base em métodos Bayesianos foram realizadas com o auxílio do programa MrBayes, versão 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) assumindo um modelo de substituição

nucleotídica tempo-reversível, com bases de frequências estimadas e taxas de variação entre sítios seguindo uma distribuição selecionado pelo programa Mrmodeltest 2.3; executando o modelo durante 10.000.000 de gerações, com a amostragem de uma árvore a cada 1.000 gerações. “Fatores Bayes” foram utilizados para determinar o número ótimo de partições dos dados moleculares a serem utilizadas na IB (Kass & Raftery 1995). A convergência dos parâmetros foi avaliada por meio da estacionariedade da cadeia de Markov usando TRACER v. 1.5 (Rambaut & Drummond 2007). O mesmo programa também foi utilizado para assegurar que a amostragem da distribuição posterior tenha alcançado o tamanho efetivo mínimo suficiente ($ESS > 200$) e para garantir a estimativa significativa dos parâmetros. Foram seguidas as recomendações de (Huelsenbeck & Hall 2001) para se descartar árvores obtidas antes da corrente de Markov atingir valores de verossimilhança estáveis e convergentes através da queima de 25% das árvores obtidas.

Como uma alternativa para a abordagem tradicional concatenada, IB também foi utilizada para estimar uma “árvore de espécies” (Edwards *et al.* 2007) no programa BEAST v. 1.6.0 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees; (Drummond & Rambaut 2007)), utilizando o método de coalescência (Heled & Drummond 2010). Foram utilizados nestas análises apenas os táxons monofiléticos sustentados por nós com valores de probabilidade posterior maior ou igual a 95% obtidos nas análises de ML e IB. Assumimos uma correção do relógio molecular lognormal para todos os genes; cada gene teve um modelo de relógio e substituição nucleotídica específica. As árvores foram estimadas com base no *Yule speciation process* por 100 milhões de gerações e com 4 cadeias independentes. Usamos o programa TRACER v 1.5 (Rambaut & Drummond 2007) para assegurar que a amostragem da distribuição posterior tenha alcançado o tamanho efetivo mínimo suficiente ($ESS > 200$) para garantir a estimativa

significativa dos parâmetros. A “árvore de espécies” foi sumarizada utilizando o programa TREEANOTATOR, descartando-se as primeiras 25 milhões de gerações como *burnin*. Sequências de espécimes heterozigotos para os genes nucleares foram codificadas de acordo com o código de edição de bases da IUPAC.

2.3. Relógio Molecular

As estimativas do tempo de diversificação foram realizadas com base nas sequências do gene *cyt b*, utilizando como calibrante a taxa de 2,1% de substituições nucleotídicas por milhão de anos (Weir & Schluter 2008). O software BEAST v 1.6.1 (Drummond & Rambaut 2007) foi utilizado para a inferência de tempo de divergência através de uma abordagem bayesiana objetivando a realização de uma análise de relógio molecular. Foram utilizados para estimar o tempo de divergência: 1) "relógio Relaxado: Lognormal não correlacionado", opção que acomoda a possibilidade de taxas independentes de evolução molecular em diferentes ramos (Drummond *et al.* 2007); e 2) *Yule speciation prior*. O modelo evolutivo utilizado para esta análise foi especificado previamente pelo programa Mrmodeltest 2.3. As análises foram executadas por 100 milhões de gerações amostrando-se uma árvore a cada 10000 gerações. Usamos o programa TRACER v 1.5 para assegurar que a amostragem da distribuição posterior tenha alcançado o tamanho efetivo mínimo suficiente ($ESS > 200$) para garantir a estimativa significativa dos parâmetros. As médias de idades dos nós foram calculadas através de um *burnin* de 10 milhões de gerações estimado pelo programa TRACER.

3. Resultados

3.1. Filogenia Molecular

Nós obtivemos 3305 pares de bases (pb) para os seguintes genes: *cyt b* (1014 pb), ND2 (1041 pb), BF5 (609 pb) e MUSK (641 pb) para 36 espécimes do complexo *M. ruficollis*, dentre estes 8 espécimes pertencentes a *M. gilvicollis*, 14 a *M. mintoni*, 11

a *M. r. ruficollis* e 3 a *M. r. concentricus*; além de 5 espécimes correspondentes ao grupo externo, dentre estes 4 *M. semitorquatus* e 1 *M. mirandollei* (Tabela 1). Do total de 3305 pb, 2793 foram invariáveis, sendo o restante variáveis e distribuídos entre 458 pb filogeneticamente informativos e 54 pb não informativos. Foram observadas inserções e deleções de 7 bases da posição 488 a 495 no gene MUSK e uma inserção e deleção na posição 143 a 145 do gene BF5; não foram observados códons de parada em quaisquer dos genes sequenciados. O gráfico contrastando transições e transversões não indicou saturação entre os espécimes sequenciados do grupo interno. O modelo de evolução das sequências selecionado para o conjunto de dados concatenados e utilizado nas estimativas de ML foi o GTR + I + G, como os seguintes parâmetros: 1) frequências de bases estimadas (A = 0.3122, C = 0.2871 G = 0.1472 T= 0.2536); 2) modelo de substituição seguindo uma matriz AC = 6.3472, AG = 104.4116, AT = 4.3870, CG = 4.0279, CT = 86.7211, GT = 1.0000; 3) proporção de sítios invariáveis I = 0.6895; e 4) taxas para os sítios invariáveis seguindo uma distribuição gamma $\alpha = 0.9319$. Para a IB com os genes particionados, os seguintes modelos foram selecionados para os conjuntos de dados: ND2 (GTR+G), *cyt b* (HKY+G), BF5 (HKY + I) e MUSK (HKY + I).

Todas as árvores filogenéticas obtidas por ML e IB recuperaram uma única topologia agrupando todos os espécimes analisados do complexo *M. ruficollis* em um clado fortemente apoiado, embora as relações internas mais basais dentro do mesmo (entre as três principais linhagens bem apoiadas) não tenham sido bem apoiadas estatisticamente (Figura 1).

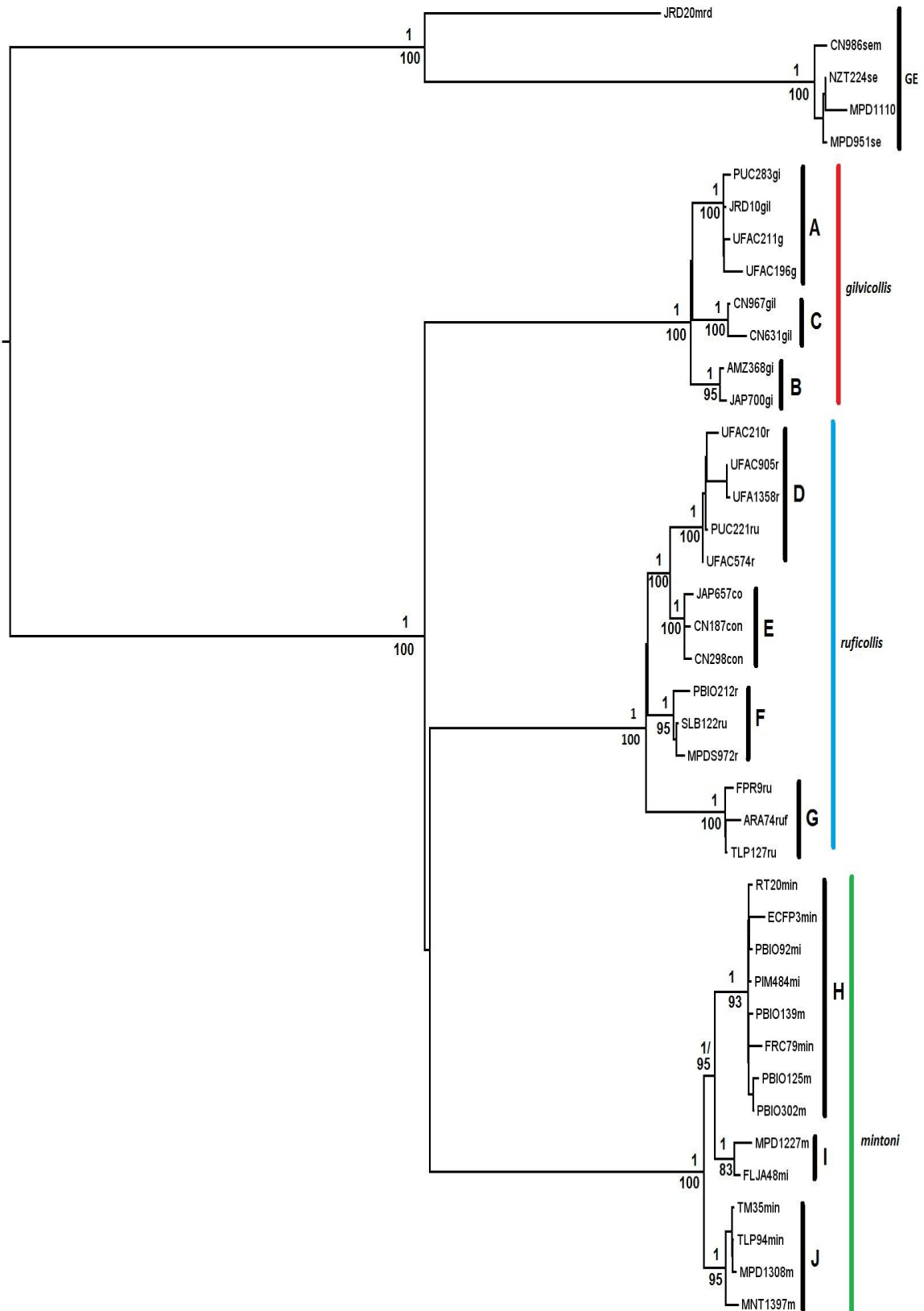


Figura 1. Árvore dos clados do complexo de espécies *Micrastur ruficollis*, obtida a partir de 3.305 pares de base dos genes ND2, *cytb*, BF5 e MUSK e estimada pelos critérios de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB). Números acima da barra indicam apoio estatístico obtidos nas IB e os números embaixo da barra, indicam valores de ML, ambos obtidos com base em 1.000 pseudo-replicações de *bootstrap*.

Dentro do do complexo *M. ruficollis*, as árvores obtidas recuperaram três clados principais reciprocamente monofiléticos (denominados clados *gilvicollis*, *ruficollis* e *mintoni*) com forte apoio estatístico (Figura 1). Dentro do clado *gilvicollis* foram recuperados 3 sub-clados distintos com alto apoio estatístico: (A) população restrita à área de endemismo Inambari, (B) populações das áreas de endemismos Imeri e Napo e (C) população ao norte do rio Amazonas, na área de endemismo Guiana (sensu Silva et al. 2005). No clado *ruficollis* quatro sub-clados foram recuperados: (D) população da área de endemismo Inambari; (E) populações das áreas de endemismos Guiana, Imeri e Napo correspondentes ao táxon (tratado como subespécie) *concentricus*; (F) populações das áreas de endemismos Rondônia e Tapajós (sensu Silva et al. 2005) e (G) população a leste do Rio Xingu. Os sub-clados D e E foram recuperados como grupos irmãos com alto apoio, mas os apoios unindo os sub-clados F e G aos demais dentro do clado *ruficollis* não foram estatisticamente bem apoiados (Figura 1). No clado *mintoni* foram recuperados três sub-clados: (I) população do extremo oeste da área de endemismo Tapajós; (J) população à leste da área de endemismo Tapajós, incluindo localidades próximas ao Rio Teles Pires e (H) população a leste do Rio Xingu até o oeste do Maranhão (Figura 1).

Níveis de divergência não corrigidos (distâncias - “*p*”) no complexo *M. ruficollis* variaram de 0,4 a 1% (entre os táxons / populações de um mesmo clado do complexo) e entre 5,7 e 6,7% (entre os clados principais *mintoni*, *gilvicollis* e *ruficollis*; Tabela 3). Níveis de divergências das seqüências entre os táxons do complexo *M. ruficollis* e o grupo externo escolhido variaram de 10% em relação a *M. mirandollei* e 12% em relação a *M. semitorquatus* (Tabela 3).

Tabela 3. Distância “P” não corrigida para os táxons do complexo *M. ruficollis*

Taxóns	Distância “P”			DM*
	Interespecífica			
	<i>M. mintoni</i>	<i>M. gilvicollis</i>	<i>M. ruficollis</i>	
<i>M. mintoni</i>				0.4 %
<i>M. gilvicollis</i>	6.7%			1.0 %
<i>M. ruficollis</i>	6.3%	5.7%		1.0 %
Grupo externo				
<i>M. semitorquatus</i>	12.3%	12.2%	12.5%	0.3%
<i>M. mirandollei</i>	10.7%	10.4%	10.8%	

DM* distância máxima entre os táxons / populações de um mesmo clado do complexo

A árvore de espécies gerada no programa BEAST teve a topologia idêntica às de ML e IB (Figura 2), embora com probabilidades posteriores menores em alguns nós. Consideramos para esta análise apenas os clados e sub-clados recuperados nas análises de ML e IB com probabilidade posterior maior ou igual a 95% (Figura 1). A árvore de espécies recuperou a monofilia recíproca e com alto apoio dos três clados principais do complexo *M. ruficollis* (*ruficollis*, *gilvicollis* e *mintoni*), embora as relações entre eles tenham recebido baixas probabilidades posteriores. No clado *M. gilvicollis* o sub-clado da Guiana foi o mais basal, sendo os dois sub-clados restantes do oeste da Amazônia irmãos e mais derivados, embora essa relação tenha recebido um baixo apoio estatístico 66% (Figura 2). No clado *M. ruficollis*, dois sub-clados principais foram recuperados, mas com baixa probabilidade posterior: um sub-clado agrupando as populações ao sul do rio Amazonas e leste do rio Madeira no escudo Brasileiro (com probabilidade posterior de 77%) e outro agrupando populações do escudo das Guianas (atribuídas a *concentricus*) e área de endemismo Inambari (com probabilidade posterior de 85% Figura 2). No clado *mintoni*, dois dos três sub-clados se distribuíram na áreas de

endemismo Tapajós (um a leste, mas basal e outro a oeste) e a leste do rio Xingu, embora o apoio para o nó unindo o clado do oeste da área Tapajós com aquele do leste do rio Xingu tenha sido baixo (probabilidade poerior de 44%; Figura 2).

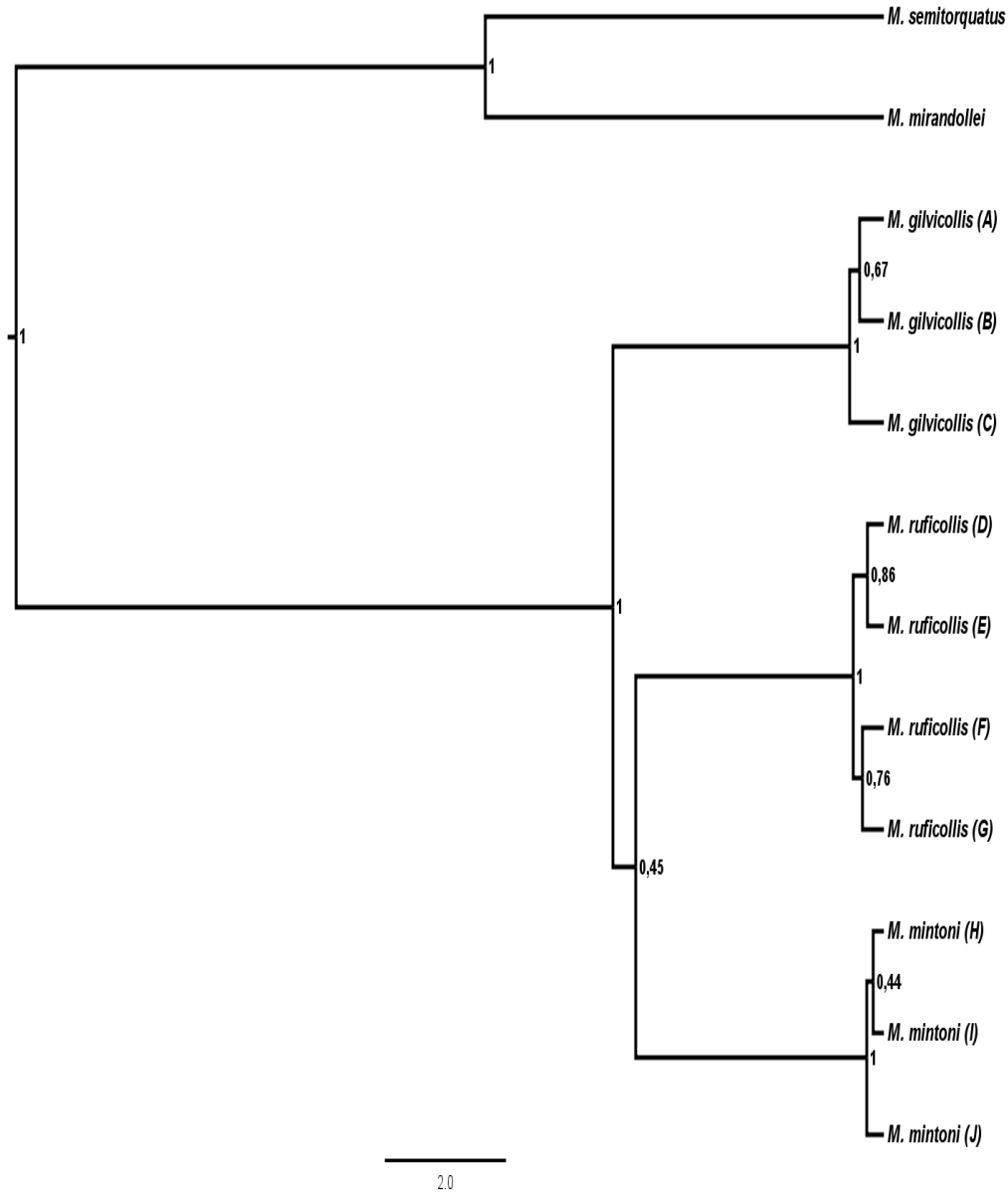


Figura 2. Árvore de espécie do complexo de espécies *Micrastur ruficollis* reconstruída com o programa BEAST partir de 3.305 pares de base dos genes ND2, cytb, BF5 e MUSK. Os números indicam os valores de probabilidade posterior obtidos na análise com 100.000.000 de gerações.

3.2. Estimativas do tempo de diversificação

Os resultados das estimativas do tempo de diversificação indicaram que o primeiro evento de cladogênese dentro do gênero *Micrastur* envolveu a separação dos

seus dois clados principais (complexos *semitorquatus* e *ruficollis*). O primeiro evento de diversificação dentro do complexo *ruficollis* ocorreu entre 4 e 5 milhões de anos e resultou na diversificação das três espécies biológicas reconhecidas atualmente para o complexo na bacia amazônica (Figura 3A) . No clado *gilvicollis*, dois eventos de diversificação ocorreram, um há aproximadamente 1 milhão de anos (separando as populações do escudo das Guianas daquelas a oeste do rio Negro e sul do rio Amazonas) e outro, mais recente, a cerca de 700.000 anos e que separou as populações da Amazônia ocidental separadas pelo rio Solimões (Figuras. 3A e 3C). Para o clado *ruficollis*, o primeiro evento de cladogênese ocorreu também há cerca de 1 milhão de anos, separando as populações ao sul do rio Amazonas e leste do rio Madeira (áreas de endemismos Rondônia, Tapajós, Xingu e Belém) daquelas situadas ao norte do rio Amazonas e oeste do rio Madeira (áreas de endemismo Inambari, Napo, Imeri e Guiana). Um segundo evento ocorreu há aproximadamente 700.000 anos separando duas populações no sudeste da Amazônia (escudo brasileiro) separadas pelo rio Xingu. Por fim, um terceiro evento de cerca de 600.000 anos separou as populações ao norte do rio Amazonas / Solimões (nas áreas de endemismos Guiana, Imeri e Napo) daquelas ao sul do rio Solimões e oeste do Rio Madeira (área de endemismo Inambari; Figuras. 3A e 3B). Para o clado *mintoni*, dois eventos de cladogênese ocorreram, o primeiro há cerca de 400.000 anos separando as populações a leste da área de endemismo Tapajós daquelas a oeste da área de endemismo Tapajós e a leste do rio Xingu. E o segundo há 200.000 anos separando em duas populações uma a leste do rio Xingu daquela a oeste da área de endemismo Tapajós (Figuras 3A e 3C). Estas populações de *mintoni* apresentam intervalos de confiança pequenos mostrando que os resultados aqui obtidos são confiáveis.

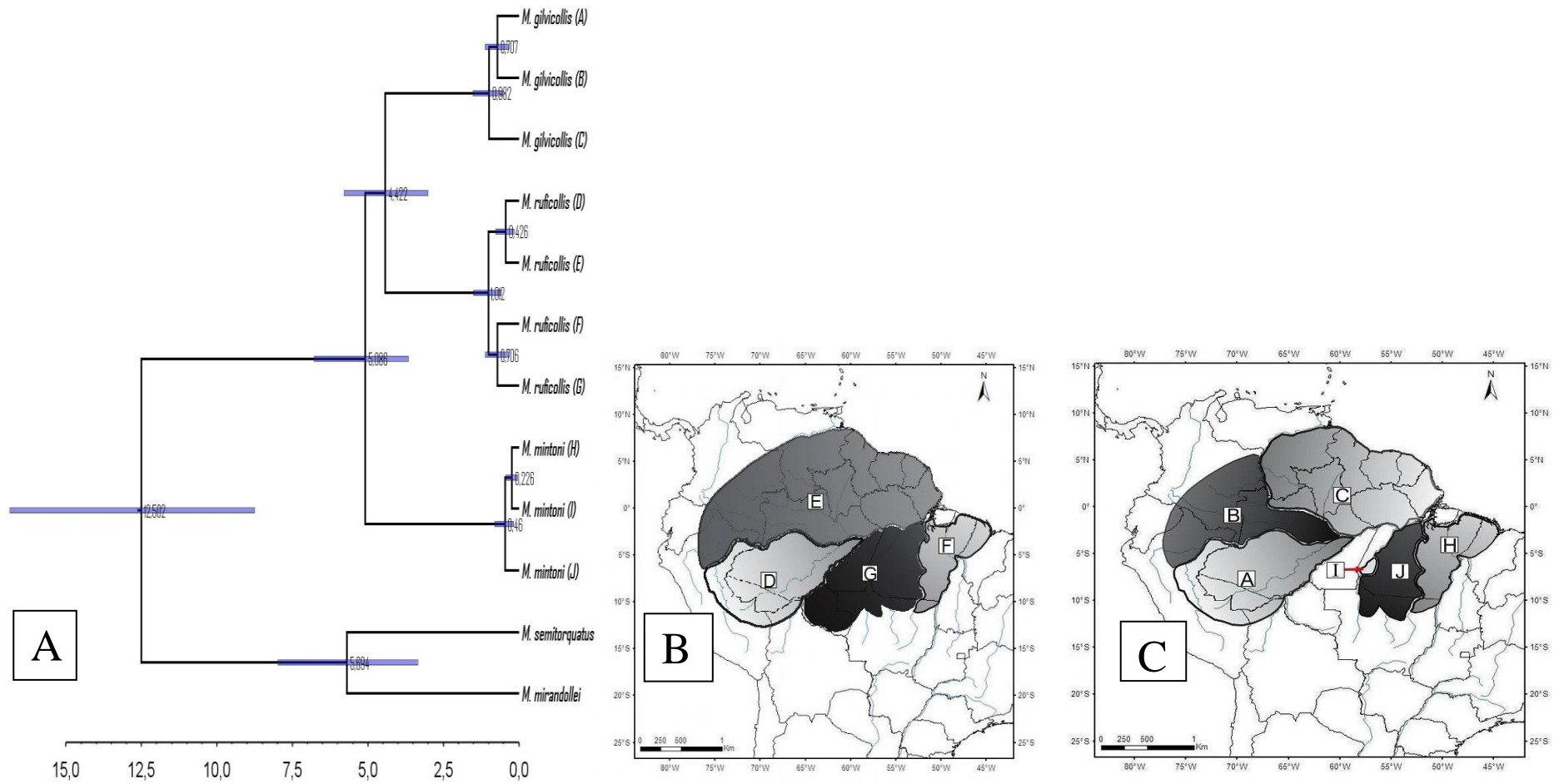


Figura 3A. Estimativas do tempo de diversificação calculado em milhões de anos no programa BEAST para os clados das espécies que compõem o complexo de espécies *M. ruficollis* utilizando como calibrante a taxa de 2.1%. Figura 3B. Mapa correspondente aos sub-clados da espécie *M. ruficollis*. Figura 3C. Mapa correspondente aos sub-clados das espécies *M. mintoni* e *M. gilvicollis*.

3.3. Incongruências Taxonômicas

O clado *gilvicollis* é considerado monotípico, mas nossos resultados mostraram a existência de três populações alopátricas principais reciprocamente monofiléticas e separadas por distâncias genéticas comparáveis àquelas separando sub-clados do politípico clado *ruficollis*. Portanto, é possível que mais espécies crípticas existam dentro do clado *gilvicollis*, o que será investigado por nós em um trabalho em separado. No clado *ruficollis* atualmente são reconhecidos dois táxons com distribuição na bacia amazônica: 1) *concentricus*, que se distribui ao norte do rio Amazonas, sul da Venezuela e leste da Colômbia; e 2) *ruficollis* nominal, que ocorre ao sul do rio Amazonas e leste do rio Madeira, adentrando os biomas Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga. Nossos resultados filogenéticos recuperaram a existência de uma terceira população, cuja identidade é ainda incerta (pode tratar-se do táxon *pelzeni*, sinonimizado em *concentricus* por (Schwartz 1972), mas diferenciada geneticamente e reciprocamente monofilética ao sul do rio Solimões e oeste do rio Madeira (área de endemismo Inambari) e que está mais relacionada à *concentricus* do que à outras populações do sul da Amazônia. Uma quarta população geneticamente diferenciada e reciprocamente monofilética, também não nomeada, ocorre entre os rios Madeira e Xingu. Portanto, nossa análises revelaram que a forma nominal de *ruficollis* é restrita na Amazônia à região situada a leste do rio Xingu apenas.

4. Discussão

4.1. Filogenia e limites interespecíficos

As análises filogenéticas moleculares obtidas mostraram a existência de três clados principais reciprocamente monofiléticos e fortemente apoiados no complexo *M. ruficollis* na Amazônia e que correspondem às três espécies biológicas reconhecidas

atualmente (Del Hoyo *et al.* 1994 & Whittaker 2002). Além de corroborarem os mesmos resultados, Fuchs *et al.* (2011) mostraram que *M. plumbeus*, extra-Amazônico, também está inserido no complexo *ruficollis*, embora suas relações filogenéticas com os membros Amazônicos do complexo não puderam ser resolvidas com alto apoio estatístico, excetuando-se a árvore construída apenas com genes nucleares, que o recuperou como irmão de *M. gilvicollis*. Essa suposta relação de proximidade entre *plumbeus* e *gilvicollis* apoiada pelos dados nucleares já havia sido inferida independentemente com base em caracteres de plumagem (Del Hoyo *et al.* 1994). Também como encontrado por Fuchs *et al.* (2011), as relações basais entre as três principais linhagens Amazônicas do complexo *ruficollis* não puderam ser resolvidas com alto apoio estatístico (Figura 1).

Várias revisões taxonômicas para o complexo *M. ruficollis* foram propostas com base em caracteres morfológicos, chegando a resultados divergentes quanto a validade de alguns táxons e espécies (Lesson 1830, Sclater 1858, Ridgway 1876, Hellmayr 1910, 1921, Sclater 1918, Peters 1931, Pinto 1935, 1947 & 1964, Hellmayr & Conover 1949, Amadon 1964, Meyer Schauensee 1966, Brow & Amadon 1968, Schwartz 1972 & Whittaker 2002). Quando somados com os resultados de Fuchs *et al.* (2011), os dados obtidos neste estudo corroboram igualmente a existência e limites interespecíficos entre as espécies biológicas reconhecidas no complexo *M. ruficollis* por (Schwartz 1972, Del Hoyo *et al.* 1994 & Whittaker 2002). Além disso, pela primeira vez, dados moleculares apoiam a validade do táxon *concentricus* (sub-clado E) e, possivelmente, também de *pelzeni*, cuja localidade tipo é Sarayacu no Peru, no centro de endemismo Inambari, área habitada pelo distinto sub-clado D de *M. ruficollis*. Além disso, nossos dados delimitam 10 linhagens (sub-clados) em *M. ruficollis*, *M. gilvicollis* e *M. mintoni*, que poderão ser consideradas espécies crípticas sob conceitos alternativos de espécie mediante a análises

adicionais com base em caracteres fenotípicos (plumagem, morfometria e vocalizações) que poderão corroborar ou não a existência e limites entre elas dentro do complexo *M. ruficollis*.

4.2. Diversificação histórica do complexo *Micrastur ruficollis* na Amazônia

Nossos resultados sugerem que a diversificação do complexo *Micrastur ruficollis* na Amazônia ocorreu ao longo dos últimos 4 - 5 milhões de anos, tendo se iniciado durante o Neógeno (Plioceno) e que resultou na diversificação de 10 linhagens principais até os dias de hoje. Esse mesmo tempo de diversificação foi inferido por Fuchs *et al.* (2011) com base numa filogenia molecular para todo o gênero *Micrastur*.

A maioria dos táxons que compõem o complexo *M. ruficollis* são limitados pelos principais afluentes do rio Amazonas, sugerindo que a evolução da drenagem destes rios foi o principal impulsionador da diversificação dos táxons que correspondem o complexo *M. ruficollis*, principalmente durante o Pleistoceno. Esta conclusão é reforçada pelo fato de que os membros do complexo *M. ruficollis* são associados predominantemente ao sub-bosque de florestas de terra firme, sendo, portanto, aparentemente bastante sensíveis ao efeito de insularização provocado pelos grandes rios Amazônicos e florestas inundáveis associadas. Portanto, o padrão espaço-temporal de diversificação documentado aqui para o complexo *M. ruficollis* concorda com aquele inferido para outras linhagens de aves e vertebrados associados a florestas de terra-firme na Amazônia (Aleixo & Rossetti 2007, Antonelli *et al.* 2010, Ribas *et al.* 2011).

As populações do clado *ruficollis* tem ampla distribuição na bacia Amazônica, ocorrendo em simpatria com aquelas do clado *gilvicollis* ao norte do rio Amazonas e oeste do rio Madeira e com as populações do clado *mintoni* a leste do rio Madeira no escudo brasileiro e sudeste da Amazônia. Por outro lado, os clados *gilvicollis* e *mintoni* se excluem geograficamente ao longo dos rios Madeira e Amazonas. Infelizmente,

como também verificado por Fuchs *et al.* (2011), as relações basais entre os clados *ruficollis*, *gilvicollis* e *mintoni* dentro do complexo *M. ruficollis* não estão bem resolvidas, não permitindo uma conclusão com relação à maior proximidade filogenética entre estes clados. Uma suposta relação de maior proximidade entre *gilvicollis* e *mintoni*, conforme postulada por Whittaker (2002) com base em caracteres morfológicos e vocais, não pode ser confirmada, por isso não é possível invocar os rios Amazonas e Madeira como as barreiras vicariantes responsáveis pela formação destas duas espécies. No entanto, dentro de cada clado do complexo *M. ruficollis*, a maioria parte dos eventos de vicariância coincidiram com a distribuição atual de grandes afluentes do rio Amazonas.

No clado *gilvicollis*, o primeiro evento de separação ocorreu a cerca de 1 milhão de anos, tendo envolvido populações separadas pelo atual curso do rio Negro (Figuras. 1, 2, 3A e 3C). Ainda nesse clado, o segundo evento de cladogênese ocorreu a cerca de 700.000 anos e envolveu populações separadas pelo curso atual do rio Solimões. No clado *ruficollis*, o primeiro evento de diversificação também data de cerca de 1 milhão de anos, separando populações através dos rios Amazonas e Madeira (Figuras. 1, 2, 3A e 3B). Nesse mesmo clado, o segundo evento envolveu populações separadas pelo rio Xingu (datado de cerca de 700.000 anos) e o terceiro aquelas localizadas em lados opostos do rio Solimões (datado de aproximadamente 500.000 anos; Figuras. 1, 2, 3A e 3B). No clado *mintoni*, embora existam três sub-clados principais fortemente apoiados estatisticamente, estes não são completamente estruturados filogeograficamente, com fluxo gênico entre eles. Por exemplo, espécimes de uma mesma localidade no centro de endemismo Tapajós (Jacareacanga) ocorrem nos três clados principais (Figura 1). De todo modo, os dois eventos principais de cladogênese em *mintoni* tendem a ser mais

recentes do que os seus análogos nos clados *gilvicollis* e *ruficollis* (Figuras. 1, 2, 3A e 3C).

Portanto, não há uma concordância espacial entre os principais eventos de diversificação mais recentes dentro dos clados do complexo *M. ruficollis*, tendo diferentes rios aparentemente envolvidos com diferentes eventos de cladogênese nas diferentes linhagens, apesar delas sobrepor suas distribuições em vários pontos da bacia. No entanto, houve uma certa concordância temporal nos primeiros e segundos eventos de cladogênese nos clados *gilvicollis* e *ruficollis*, com os primeiros datando de aproximadamente 1 milhão de anos e os segundos em cerca de 700.000 de anos em ambas as linhagens. Em apenas um caso, uma mesma barreira atuou (rio Solimões), coincidiu com os limites entre populações reciprocamente monofiléticas em dois clados do complexo *M. ruficollis* (*gilvicollis* e *ruficollis*), com os tempos estimados de separação de 700.000 anos na primeira e cerca de 420.000 anos na segunda (Figuras 3A, 3B e 3C). Contudo, os intervalos de confiança destas duas estimativas se sobrepõem grandemente, não podendo ser descartada a hipótese que eles tenham ocorrido ao mesmo tempo e, portanto, sido causados pelo mesmo evento vicariante (Figura. 3A).

No caso do clado *mintoni*, o padrão de diversificação é completamente concordante com o curso dos modernos rios Amazônicos. Indicando que apesar de existir certa estrutura filogeográfica, os sub-clados principais ainda não adquiriram monofilia recíproca, ao contrário do que foi verificado para os clados *gilvicollis* e *ruficollis*. Isso pode ser um indicativo tanto de tempos mais recentes de separação, como também de processo diferentes, como a dispersão a partir de um refúgio hipotético no centro de endemismo Tapajós (que abriga populações geneticamente mais divergentes da espécie) para leste, habitado por indivíduos geneticamente menos divergentes agrupados no clado H (Figura 1). Infelizmente, não foram obtidas amostras

do clado *mintoni* da área de endemismo Rondônia que permitissem avaliar essa hipótese de colonização e dispersão de oeste para leste com maior probidade, mas ela permanece válida, na medida que a datação dos eventos de diversificação nesse clado se situam totalmente no Pleistoceno, quando boa parte da Amazônia oriental parece ter sido afetada por climas bem mais secos, consistentes com a formação de refúgios (Haffer & Prance 2002).

Em suma, o padrão espaço-temporal de diversificação no complexo *M. ruficollis* na Amazônia aponta para um processo contínuo desde o Plioceno e com um pico no Pleistoceno e cuja causa parece estar ligada principalmente à formação do rio Amazonas e seus principais tributários, não podendo ser descartada alterações climático-vegetacionais particularmente na Amazônia oriental.

5. Referências bibliográficas

- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transaction and Automatic Control*, 19: 716–723.
- Aleixo, A. & D.F. Rossetti. 2007. Avian genes tree, landscapes evolution e geology towards a modern synthesis of amazonian historical biogeography. **J. of Ornithology** 148: 443-453.
- Amadon, D. 1964. Taxonomic notes on birds of prey. *America Museum Novitates*. N° 2166.
- Antonelli, A., A. Quijada-Mascareñas; A.J. Crawford; J. M. Bates; P.M. Velazco & W. Wüster. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In: Hoorn, C., Wesselingh, F.P (Eds.), **Landscape and Species Evolution a Look into the Past**. Blackwell Publ. Ltd., Oxford, 386–404.
- Avice J. C.; J. Amold; E. Ball; T. Lam; J.E. Neigel; C.A. Reeb & N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18: 489-522
- Avice, J. C. 2000. Phylogeography. *The History and Formation of Species*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Brown, L., D. Amadon. 1968. *Eagles, hawks and falcons of the world*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Clark, W.S. & C.C. Witt. 2006. First known specimen of a hybrid Buteo: Swainson's Hawk (*Buteo swainsoni*) _ Rough-legged Hawk (*B. lagopus*) from Louisiana. *Wilson J. Ornithol.* 118: 42–52.
- Del Hoyo, J, A. Elliot & J. Sargatal. 1994. Handbook of the birds of the world, Vol. 2 New World vultures to guinea fowl. Spain, Barcelona: Lynx Editions.
- Drummond A.J & A. Rambaut 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.

- Edwards S.V., L. Lui & D.K. Pearl. 2007. High resolution species trees without concatenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 5936–5941.
- Fuchs, J.; R.C.K. Bowie; J. Fjeldså & E. Pasquet. 2004. Phylogenetic relationships of the African bush-shrikes and helmet-shrikes (Passeriformes: Malaconotidae). ***Molecular Phylogenetics and Evolution*** 33: 428–439.
- Fuchs, J.; S. Chen; J. A. Johnson & D. P. Mindell. 2011. *Pliocene diversification within the South American Forest falcons*. ***Molecular Phylogenetics and Evolution*** 60: 398–407
- Hackett, S. J. 1996. Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). ***Molecular Phylogenetics and Evolution*** 5:368–382
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program for Windows 95/98/NT. ***Nucleic Acids Symposium Series*** 41: 95-98.
- Haffer J. & G. T. Prance. 2002. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica *Estudos avançados*. [online]. vol.16, n.46, pp. 175-206. ISSN 0103-4014.
- Harshman, J. & W. Fitzpatrick. 1996. *Phylogeny, evolutionary rates, and ducks*. Ph.D.Dissertation, University of Chicago, Chicago.
- Heled, J. & A. J. Drummond. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. ***Molecular Biology Evolution*** 27(3):570–580. doi:10.1093/molbev/msp274
- Hellmayr, C. E. 1910. *The birds of the Rio Madeira*. ***Novitates Zoological*** 17: 257-428.
- Hellmayr, C. E. 1921. *Review of the birds collected by Alcide d'Orbigny*. ***Novitates Zoological*** 28:171–213.
- Hellmayr, C. E. & B. Conover. 1949. *Catalogue of birds of the Americas*, etc. Field Museum Natural History Publication Zoological. Ser. 13, Pt. 1, N°. 4.
- Hoffman F.G. & R.J. Baker. 2003. Comparative hybrid zones and phylogeography-or seeing genes in space and time. ***Mol Ecol*** 10: 537-549.

- Huelsenberck, J. P. & B. Hall. 2001. *Mrs. Bayes: Bayesian inference of phylogeny*. A program for the Bayesian Analysis. Material available at <http://brahms.biology.rochesters.edu/software.html>.
- Kass, R. E. & A.E. Raftery. 1995. Bayes factors. *J. Am. Stat. Assoc.* 90: 773–795. (doi:10.2307/2291091)
- Kocher, T. D.; W.K. Thomas; A. Meyer; S.V. Edwards; S. Paabo; F.X. Villablanca & A.C. Wilson. 1989. **Dynamics amplification and sequencing with conserved primers**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6196 – 6200.
- Kumar, S.; K. Tamura & M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** 5: 150–163.
- Lesson 1830. *Traité Orn. livr. 1: 5-77*.
- Meyer de Schauensee, R. 1966. *The species of birds of South America with their distribution*. Livingston Publ. Co. Narberth, Pa.
- Moritz, C. & D.P. Faith. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent áreas for conservation. **Mol Ecololy** 7: 419-429.
- Moritz, C.; J. Patton; C. J. Schneider & T. B. Smith. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics** 31: 533-563.
- Nylander, J. A. A. 2004. MRMODELTEST (version 2). Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden. Program distributed by the author at <http://www.csit.fsu.edu/nylander/>.
- Peters, J.L. 1931. Check-list of the birds of the world, Vol. 1. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Pinto, O. 1935. Aves da Bahia. **Revista Museu Paulista** 19:1–326.
- Pinto, O. 1947. Contribuição à ornitologia do Baixo Amazonas: arquivos de zoologia do Estado de São Paulo. V artigo 6: 322–328.
- Pinto, O. 1964. Ornitologia Brasiliense, vol. 1: Reidae a Cuculidae. Departamento.de Zoologia. Secretaria.de Agricultura., São Paulo, Brazil.

- Ribas, C. C. & C. Y. Miyaki. 2007. Análise comparativa de padrões de diversificação em quatro gêneros de psitacídeos neotropicais. **Revista Brasileira de Ornitologia** 15: 245- 252.
- Ribas, C.C.; A. Aleixo; A.C.R. Nogueira; C.Y. Miyaki & J. Cracraft 2011. A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **The Royal Society Biological Science**. Published online 27 july 2011.
- Ridgway, R. 1875. Studies of the American Falconidae. Monograph of the genus *Micrastur*. Proc. Acad. Natur. Sci. Philadelphia Part 3:470-502.
- Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rull, V. 2006. Quaternary speciation in the Neotropics. **Molecular Ecology** 15: 4257-4259.
- Sambrook, J.; E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schwartz, P. 1972. *Micrastur gilvicollis*, a valid species sympatric with *M. ruficollis* in Amazonia. **Condor** 74:399–415.
- Sclater, P.L. 1858. **Proc. Zool. Soc. London**: 356.
- Sclater, W.L. 1918. **Bull. Brit. Orn. Club** 38: 43- 45.
- Silva, J. M. C.; A. B. Rylands & G. A. B. Fonseca. 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. **Conservation Biology** 19 (3): 689-694.
- Sorenson, M.D.; J.C. Ast; E.D. Dimcheff, T. Yuri & 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 rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. **Syst. Biol.** 75: 758–771.
- Thoisy B.; A. G. Silva; M. Ruiz-García; A. Tapia; O. Ramirez; M. Arana; V. Quse; C. Paz-y-Miño; M. Tobler; C. Pedraza & A. Lavergne. 2010. *Population history,*

phylogeography, and conservation genetics of the last Neotropical mega-herbivore, the lowland tapir (Tapirus terrestris). **BMC Evolutionary Biology** 10: 278.

Vieillot. 1817. **Nouv Dict. Hist. Nat.** 10: 322 - 341

Weir, J.T. & D. Schluter. 2008. Calibrating the avian molecular clock. **Molecular Ecology** 17: 2321–2328.

Whittaker, A. 2002. A new species of forest-falcon (FALCONIDAE: *MICRASTUR*) from southeastern Amazonia and the atlantic rainforests of Brazil. **Wilson Bull.** 114 (4): 421-445.

Xia, X. & Z. Xie. 2001. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity** 92: 371–373.