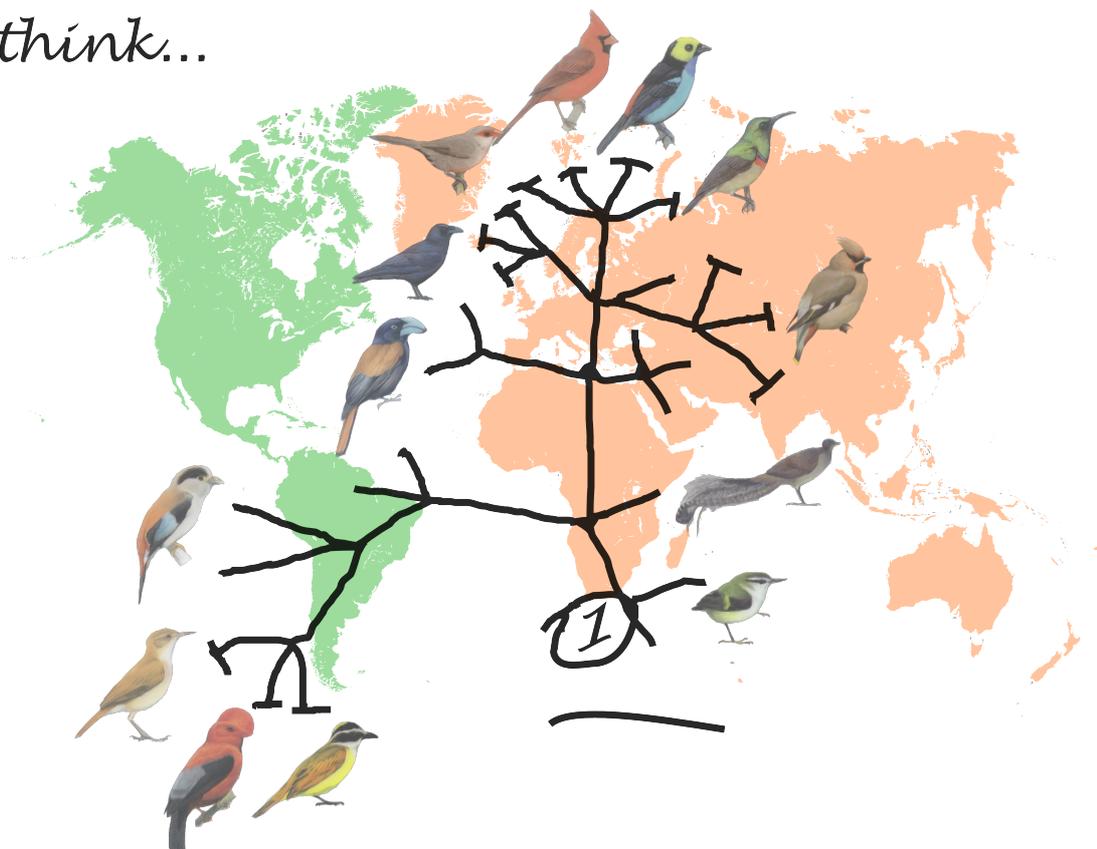


Universidade Federal do Rio de Janeiro

Alexandre Pedro Selvatti Ferreira Nunes

Reconstrução Filogenética em Larga Escala de Passeriformes
Revela uma Diversificação Recente da Ordem e Diferentes
Padrões na Colonização do Novo Mundo

I think...



Rio de Janeiro

2013

Universidade Federal do Rio de Janeiro

RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA EM LARGA ESCALA DE PASSERIFORMES REVELA UMA
DIVERSIFICAÇÃO RECENTE DA ORDEM E DIFERENTES PADRÕES NA COLONIZAÇÃO DO NOVO
MUNDO

Alexandre Pedro Selvatti Ferreira Nunes

2013



UFRJ

RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA EM LARGA ESCALA DE PASSERIFORMES REVELA UMA
DIVERSIFICAÇÃO RECENTE DA ORDEM E DIFERENTES PADRÕES NA COLONIZAÇÃO DO NOVO
MUNDO

Alexandre Pedro Selvatti Ferreira Nunes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Biologia Evolutiva), Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requerimentos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Biologia Evolutiva).

Orientadores: Prof. Dra. Claudia Augusta de Moraes Russo e Prof. Dr. Luiz Pedreira Gonzaga

Rio de Janeiro

2013

RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA EM LARGA ESCALA DE PASSERIFORMES REVELA UMA
DIVERSIFICAÇÃO RECENTE DA ORDEM E DIFERENTES PADRÕES NA COLONIZAÇÃO DO NOVO
MUNDO

Alexandre Pedro Selvatti Ferreira Nunes

Orientadores: Prof. Dra. Claudia Augusta de Moraes Russo e Prof. Dr. Luiz Pedreira Gonzaga

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Biologia Evolutiva), Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requerimentos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade e Biologia Evolutiva).

Aprovada por:

Presidente, Prof.

Prof. Cássia M. Sakuragui, UFRJ

Prof. Marcos A. Raposo, MN/UFRJ

Prof. Renner L. C. Baptista, UFRJ

Prof. Michelle Klautau, UFRJ
Suplente Interno

Selvatti, Alexandre Pedro.

Reconstrução filogenética em larga escala de Passeriformes revela uma diversificação recente da ordem e diferentes padrões na colonização do Novo Mundo/
Alexandre Pedro Selvatti Ferreira Nunes. – Rio de Janeiro: UFRJ/CCS, 2013.

x, 125f.: il.

Orientadores: Claudia Augusta de Moraes Russo; Luiz Pedreira Gonzaga

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Instituto de ciências Biológicas/ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2013.

Referências Bibliográficas: f. 113-125

1. Biologia Evolutiva. 2. Filogenia Molecular em Larga Escala. 2. Passeriformes. I. Russo, Claudia Augusta de Moraes; Gonzaga, Luiz Pedreira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. III. Menos cretáceo, mais Paleógeno: reconstrução filogenética em larga escala de Passeriformes revela uma diversificação recente da ordem e diferentes padrões na colonização do Novo Mundo

Dedico este trabalho a todos os ornitólogos, e também para aqueles que se sentem minimamente maravilhados ao contemplar os dinossauros vivos.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e irmãs, por tudo, por terem me preparado para enfrentar as dificuldades que eu encontraria.

Primeiramente, agradeço aos meus orientadores, cuja missão foi cumprida muito além do âmbito acadêmico. Por mais óbvio que seja, sem eles este trabalho jamais teria o acabamento que apresento aqui. O contato e interação com vocês não somente me encorajaram nos breves momentos de aflição, mas também me ajudaram a ir cada vez mais fundo nas leituras e discussões desde o início. Muito obrigado, Cláudia, pela proximidade e sinceridade em dizer o que tem que ser dito. *Thanks a million!* Muito Obrigado, Luiz, pela presença constante como a de uma ave de dossel, que nem sempre é vista, mas acompanha atenta as movimentações respondendo prontamente todas as vezes que foi solicitado. Espero que minhas primeiras rêmiges já estejam detectáveis em meio à densa penugem.

Agradeço a todos os professores e alunos do LABETA, meu ambiente de trabalho onde foi certamente o local onde mais permaneci nos últimos anos, com imenso prazer. Obrigado por deixarem o ambiente de trabalho tão agradável e com cheirinho e gosto de café. Agradeço em especial Barbara Aguiar por compartilhar seu domínio da arte de programação, me ajudando com *scripts* fundamentais para este trabalho e ao professor Carlos Guerra pela incansável paciência em me ouvir, entender os problemas e fornecer soluções pontuais e eficazes prontamente. Agradeço também aos maravilhosos colegas Beatriz Mello, Julio Vilela, Letícia Loss, Annelise Frazão e Anieli Pereira pela paciência e boa vontade em ajudar e discutir dúvidas, mesmo todos tremendamente ocupados e imersos em seus próprios trabalhos. Obrigado a vocês pela assistência inominável em explicar, debater e auxiliar nas centenas de programas e conceitos novos que aprendi nesses dois anos.

Agradeço em especial André Elias Soares e Luana Calazans, pelos valiosos comentários no manuscrito referente à esta dissertação, que diretamente influenciaram e contribuíram para a própria ascensão desta. Obrigado, Gisela Sobral pela paciente explicação e tutoriais de edição de imagem, sempre com graça e risadas mil! Obrigado Gabriela Sobral pelos *papers* alemães, e obrigado à duas pela ajuda em entender com os difíceis termos deste idioma.

Muito obrigado, Dilton Junior, pela incansável presença em minha vida, e impressionante paciência em meus devaneios acadêmicos e sonos incontroláveis. Já não me impressiono mais com sua capacidade de me impressionar a cada dia, e só posso afirmar que tenho muita sorte em encontrar *the finest Bird exemplar in the entire World*.

Agradeço infinitamente à minha família, tios e tias, primos e primas e especialmente meus queridos avós, de quem pude contar com um apoio indescritível em todos os âmbitos, para minha agradável surpresa. Com muito amor, obrigado, e este trabalho é especialmente dedicado a vocês.

Queridos amigos, distantes e próximos, que convivi desde o ingresso na universidade, obrigado por terem literalmente, mudado minha vida para sempre.

Agradeço à comunidade científica, que de forma implacável continua a se fortalecer e expandir o conhecimento humano, refinando nosso pensar acadêmico e cotidiano. Esta gratidão, apesar de dificilmente ser ouvida em meio a tantas outras publicações, será carregada eternamente comigo em minha vida profissional.

Por fim, agradeço ao corpo docente da UFRJ, em especial aos membros de minha banca, que foram escolhidos com base em suas brilhantes aulas de graduação e seu exímio exemplo como pesquisadores brasileiros. Obrigado por aceitarem contribuir ainda mais para minha formação. Agradeço também ao financiamento CAPES e da UFRJ, que sem os quais a presente dissertação não seria concluída com a riqueza de informações acessíveis com esta ajuda.

“It seems to me that the natural world is the greatest source of excitement; the greatest source of visual beauty; the greatest source of intellectual interest. It is the greatest source of so much in life that makes life worth living.”

Sir David Attenborough

Resumo

No presente estudo apresento uma hipótese filogenética detalhada em nível da família para a maior ordem de aves viventes (Aves: Passeriformes), utilizando 86% dos gêneros existentes e a primeira inferência baseada no relógio bayesiano relaxado, com múltiplos pontos de calibração fósseis. Meu grande tamanho amostral permitiu a recuperação dos grandes grupos passeriformes bem como sua posição na árvore. *Acanthisittia* parece ter divergido de todos os outros passeriformes no Paleógeno inferior, consideravelmente mais recente em relação a estudos anteriores, e como consequência, indica que a ordem sofreu uma radiação adaptativa ainda mais intensa durante o Paleógeno. A partir dos tempos de divergência calculados, proponho uma hipótese biogeográfica alternativa para a diversificação de Suboscines, em que a primeira divisão do grupo nas linhagens do Novo e Velho Mundos estaria relacionada com o rompimento vicariante da conexão biótica América do Sul-África durante o Eoceno inferior, implicando em uma origem Africana para Eurylaimides modernos. Notáveis resultados topológicos desta análise foram o monofiletismo de grupos tido como problemáticos desde a sua circunscrição, como Sylvioidea e Muscipoidea. Proponho também possíveis interações ecológicas que podem ter moldado os padrões distintos de endemismo de Oscines no Novo Mundo. Os Oscines insetívoros endêmicos às Américas Vireonidae (Corvoidea), Mimidae e Troglodytidae (Muscipoidea) provavelmente representaram uma competição direta com os Suboscines autóctones, e com a chegada dessas linhagens durante Mioceno, antes de quaisquer outros Oscines, pode ter preenchido os poucos nichos disponíveis deixados por Tyrannides, restringindo a diversificação das chegadas posteriores de outros Oscines. Os membros predominantemente frugívoros-nectarívoros de Passeroidea, com a maior diversidade de Novos Oscines endêmicas Mundo, pode ter sido totalmente excluída dessa concorrência com os Tyrannides. Pelo contrário, a grande disponibilidade de nichos de frugivoria aliados à escassa concorrência com a fauna passeriforme autóctone pode ter sido crucial para Passeroidea prosperarem no Novo Mundo.

Abstract

The present study I present a detailed phylogenetic hypothesis at family-level for the largest avian order (Aves: Passeriformes), with 86% of extant living genera, and the first multi-calibrated, relaxed clock inference for diversification of modern passerines. My vast taxon sampling allowed the recuperation of many challenging clades and their position in the tree. *Acanthisittia* appears to have diverged from all other passerines at the Early Paleogene, considerably later than previously suggested, and as consequence, the Passeriformes seem to be younger altogether, representing an even more radically intense adaptive radiation. From my time scale, a novel biogeographic hypothesis for diversification of modern Suboscines is proposed, in which the first split separating New and Old World lineages would be related to the vicariant severing of the Africa-South America biotic connection during Mid-Late Eocene, implicating in an African origin for modern Eurylaimides. Notable topological results from this analysis were the monophyletic status of groups not recovered since their circumscription, such as Sylvioidea and Muscicapoidea. I also propose possible ecological interactions that may have shaped the distinct patterns of Oscines in the New World. The insectivorous endemic Oscines in the Americas, Vireonidae (Corvoidea), Mimidae and Troglodytidae (Muscicapoidea) probably imposed direct competition with the autochthonous Suboscines, and the arrival of these lineages during Early Miocene before any other Oscines may have filled the few available niches left by Tyrannides, thus constraining the diversification for insectivorous Oscines later arrived in the Americas. The predominantly frugivorous-nectarivorous members of Passeroidea, with the major diversity of New World endemic Oscines, may have been entirely excluded from such competition with the Tyrannides. Rather, the vast availability of frugivory niches allied to scarce competition with the autochthonous passerine fauna may have been crucial to Passeroids to thrive in the New World.

Sumário

INTRODUÇÃO	13
A IMENSA DIVERSIDADE DE PASSERIFORMES.....	14
UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A SISTEMÁTICA DE PASSERIFORMES.....	16
<i>Contribuições Morfológicas</i>	16
<i>Contribuições Moleculares: Hibridação DNA-DNA</i>	21
<i>Contribuições Moleculares: Sequências de DNA</i>	25
O PANORAMA ATUAL EM PASSERIFORMES E SUAS LACUNAS.....	27
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	33
MATERIAL & MÉTODOS	35
DELINEAMENTO AMOSTRAL E SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO.....	36
ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE DNA.....	38
ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	43
<i>Escolha do Método para Reconstrução</i>	43
<i>O Método de Máxima Verossimilhança</i>	47
<i>Máxima Verossimilhança no Programa Raxml</i>	50
<i>Refinamento Amostral para a Análise Final de Máxima Verossimilhança</i>	57
DATAÇÃO MOLECULAR.....	60
<i>Um Breve Histórico do Relógio Molecular</i>	60
<i>Calibrações Fósseis</i>	64
<i>Inferência dos Tempos de Divergência com o Programa BEAST</i>	68
<i>Testes de Consistência</i>	72
RESULTADOS & DISCUSSÃO	74
ASPECTOS GERAIS DA ORDEM PASSERIFORMES.....	75
SUBORDEM ACANTHISITTIA E A PRIMEIRA DIVERGÊNCIA EM EUPASSERES.....	80
SUBOSCINES (SUBORDEM TYRANNI).....	83
<i>Tyrannides (Suboscines do Novo Mundo)</i>	83
<i>Eurylaimides (Suboscines do Velho Mundo)</i>	87
<i>O Enigmático Gênero Sapayoa</i>	91
OSCINES (SUBORDEM PASSERI).....	93
<i>A Parafilética Linhagem Corvida</i>	94
<i>A Parvordem Passerida</i>	99
<i>Casos de Parafiletismo</i>	109
CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	113

Introdução

"... Sabemos pouco sobre as inter-relações das mais de 60 famílias da subordem Oscines (aves canoras), um conjunto composto por quase metade de todas as espécies de aves. A situação (..) é ainda mais grave, pois afeta a contribuição ornitológica para a história da fauna em escala global. Tal contribuição só pode ser alcançada quando houver uma organização destas famílias em uma árvore filogenética. Com poucas exceções, as relações de grupos que ocupam regiões marcadamente separadas só podem ser cogitadas atualmente." (Beecher, 1953)

A Imensa Diversidade de Passeriformes

A diversidade biológica na Terra não se encontra homogeneamente distribuída entre os diferentes grupos de organismos (ALFARO et al., 2009). Avanços recentes na reconciliação do registro fóssil com filogenias moleculares apontam cada vez mais para a importância das radiações adaptativas na história da vida (ALFARO et al., 2009; JETZ et al., 2012). A maior parte da diversidade biológica originou-se em episódios de múltiplos eventos de especiação em um curto intervalo de tempo, associados a processos de intensas diferenciações fenotípica e ecológica. Enquanto ecólogos e taxonomistas buscam identificar e descrever as variações entre diferentes *taxa* e seus ambientes, filogeneticistas frequentemente se deparam com a desafiante tarefa de decifrar os padrões evolutivos por trás de tais variações. Grupos sabidamente originados em radiações adaptativas geralmente representam mais da metade da diversidade de seu clado inclusivo, tais como peixes Ostariophysi, mamíferos Rodentia, anfíbios Anura e o grande grupo contendo a maior parte das aves viventes (Neoaves) (ALFARO et al., 2009; RAIKOW; BLEDSOE, 2000).

A ordem Passeriformes representa esta desproporcional diversidade em Neoaves (BARKER; BARROWCLOUGH; GROTH, 2002; MAYR, 2013), sendo um dos cinco maiores clados de vertebrados terrestres (ALFARO et al., 2009; ERICSON, 2011; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003). Este grupo inclui tamanha diversidade que ornitólogos frequentemente

dividem a classe Aves em “passeriformes” e “não-passeriformes”, o primeiro um grupo monofilético (HENNIG, 1965) e o segundo um termo informal de exclusão para o restante parafilético da diversidade (HENNIG, 1965).

Os Passeriformes são por sua vez divididos em dois grandes clados; Oscines e Suboscines (ERICSON et al., 2002; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003). Oscines são caracterizados por apresentarem uma siringe (órgão vocal) com muitos pares de músculos intrínsecos, como consequência, vocalizações igualmente complexas aprendidas por imitação durante a ontogenia (CLAYTON; BALAKRISHNAN; LONDON, 2009; JARVIS, 2004). Suboscines, por sua vez, possuem uma siringe com menos músculos e geralmente sua vocalização não se dá através do aprendizado por imitação, porém seu monofiletismo é sustentado por outra característica morfológica, a forma do ossículo columela (AMES, 1971; RAIKOW; BLEDSOE, 2000). Juntas, estas subordens ocupam hoje praticamente todos os nichos possíveis para as aves de ambiente terrestre, em todas as regiões do globo exceto Antártica (BARKER, 2011).

Com pouco mais de 5.700 espécies, os Passeriformes conseguiram expandir sua ocorrência até ambientes com condições extremas para a sobrevivência, como Ártico, desertos e remotos arquipélagos oceânicos (BARKER, 2011; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003). Dentro desta ordem, notáveis radiações adaptativas em diferentes hábitos já foram documentadas, como os tentilhões de Darwin nas ilhas Galápagos, com uma vasta gama de estratégias de forrageamento, (BURNS; HACKETT; KLEIN, 2002); os *honeycreepers* havaianos (nectarívoros) (BURNS; HACKETT; KLEIN, 2003) e duas extraordinárias radiações em escala continental, os insetívoros furnariídeos (Furnariidae, Suboscines) (CLARAMUNT, 2010; DERRYBERRY et al., 2011) e os frugívoros Oscines *novempennatae* (Passeroidea, Oscines) (BARKER et al., 2012), ambos na região Neotropical.

Contrastando com essa espantosa diversidade, a relativa uniformidade morfológica dos Passeriformes tornou a sistemática da ordem extremamente árdua desde os primeiros estudos

(MAYR, 1958). As diferenças entre muitas famílias de passeriformes são, com frequência, mais sutis que aquelas que separam gêneros em outras ordens de Aves, e chegam a ser quase “arbitrárias”, dependendo muitas vezes do pesquisador que as analisa (MAYR, 1958). Por outro lado, as relações filogenéticas entre essas famílias e os grandes grupos foram irrelevantes para sua classificação, permanecendo contraditórias por séculos desde o Iluminismo (BEECHER, 1953; CRACRAFT, 1981; MAYR, 1958).

Um Breve Histórico Sobre a Sistemática de Passeriformes

Contribuições Morfológicas

Até o século XVIII, o termo “Passeriformes” incluía todas as aves conhecidas, com exceção somente das aves-de-rapina (falcões, águias e similares), “aves de caça” (galos, faisões, gansos e formas aparentadas) e grandes aves cursoriais (avestruzes e semelhantes) (AMES, 1971; GARROD; FORBES, 1881). Somente com o grande avanço do conhecimento científico ocorrido no século XIX, estudos morfológicos mais detalhados foram capazes de delimitar a ordem Passeriformes como é conhecida hoje. Também por volta desta época foram propostas as primeiras hipóteses formais para a separação e classificação dos grandes grupos passeriformes (AMES, 1971).

O progresso na sistemática morfológica de Passeriformes consistiu primeiramente em excluir dessa classificação alguns grupos não-Passeriformes, no início do século XIX (ver Ames 1971 para detalhes). Essa exclusão foi gradual e buscou caracterizar a ordem através de tratos anatômicos compartilhados (AMES, 1971). Em paralelo, juntamente às delimitações da ordem Passeriformes *per se*, importantes estudos também foram conduzidos com intuito de organizar

a diversidade interna do grupo. Neste aspecto, o trabalho mais significativo foi o de Johannes Müller (1847), no qual, através dos aspectos gerais da musculatura da siringe, foi possível detectar diferenças significativas entre dois grandes grupos. Müller (1847) utilizou pela primeira vez uma ampla diversidade taxonômica em relação aos estudos anteriores, incluindo muitas linhagens de “verdadeiros” Passeriformes e algumas poucas ordens que ainda eram incluídas no grupo (AMES, 1971; MÜLLER, 1847; MÜLLER; GARROD, 1858). O resultado mais importante de Müller (1847) foi a separação de um grande grupo de passeriformes, que compartilhavam uma siringe mais complexa, provida de um maior número de pares de músculos intrínsecos, daqueles de siringe mais simples, sem musculatura intrínseca ou com apenas poucos pares de músculos (AMES, 1971; GARROD; FORBES, 1881; MÜLLER; GARROD, 1858). O grande grupo que apresentava a siringe mais complexa corresponde atualmente aos Oscines, ou aves canoras, fortemente corroborado em estudos morfológicos e moleculares posteriores (AMES, 1971; BERESFORD et al., 2005; GARROD; FORBES, 1881).

O segundo grupo de passeriformes de Müller incluía também todas as ordens não-Passeriformes remanescentes, classificadas como “não-Oscines”. Muitos estudos posteriores contribuíram para a remoção definitiva desses grupos da ordem (ver Ames 1971 para uma revisão detalhada). Porém, em meio a este grupo parafilético (HENNIG, 1965), se encontrava a segunda grande divisão atual dos “verdadeiros” Passeriformes, os Suboscines ou Clamatores (GARROD; FORBES, 1881; MÜLLER; GARROD, 1858). Como será descrito adiante, levou algum tempo para que uma característica definisse Suboscines verdadeiramente como um grupo monofilético, porém, atualmente este grupo é igualmente corroborado tanto pela morfologia e análises moleculares.

O segundo notável expoente na sistemática de grandes grupos passeriformes foi Garrod (1873-1876), que é considerado o maior contribuinte para as classificações do grupo na segunda metade do século XIX (AMES, 1971). Garrod foi o responsável pela delimitação e

subdivisões atualmente usadas em Passeriformes (GARROD, 1873; GARROD; FORBES, 1881). O autor excluiu conclusivamente as remanescentes aves não-Passeriformes que ainda permaneciam no grupo desde Müller e estudos posteriores, apresentando pela primeira vez de forma clara a ordem Passeriformes, a partir de uma combinação de caracteres morfológicos exclusivos compartilhados entre seus membros. A divisão dos passeriformes em Oscines e Mesomyodi (clado futuramente nomeado Suboscines) foi proposta formalmente pela primeira vez, bem como subdivisões importantes dentro desses grupos, como a separação de Menuræ (“Oscines Abnormales” *sensu* Garrod) do restante dos outros Oscines e a separação de um grupo morfológicamente distinto em Suboscines (“Mesomyodi – Tracheophonæ”). (Figura 1) (GARROD, 1873; 1876; GARROD; FORBES, 1881).

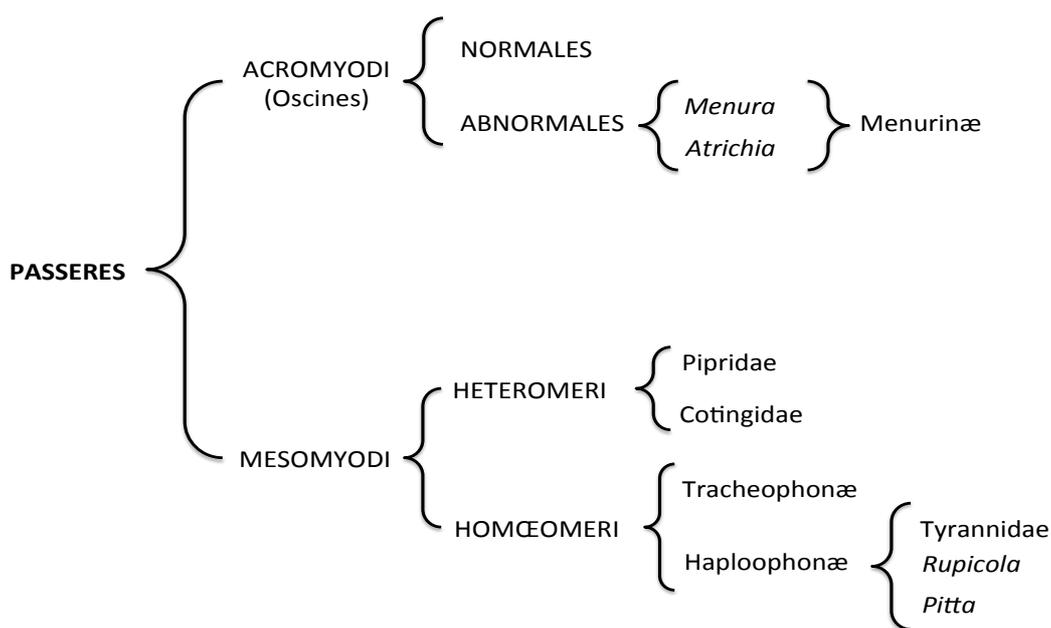


Figura 1: Proposta classificatória de Garrod (1876) para classificação dos grandes grupos de Passeriformes, baseada em características gerais da musculatura da siringe. As propostas de Garrod foram essencialmente guiadas pelos trabalhos de Müller (1847). Neste esquema, alguns arranjos merecem especial atenção, pois foram evidenciados pela primeira vez por Garrod e são corroborados por diferentes análises atualmente. A divisão de Passeriformes (PASSERES) em duas categorias (subordens), separando aqueles com siringe mais complexa, com inserção distal da musculatura intrínseca nos semi-anéis bronquiais, os Oscines (ACROMYODI); daqueles com inserção medial da musculatura, os Suboscines (MESOMYODI). Além destes, outras propostas importantes foram a separação de Menuræ (Menurinæ) dos demais Oscines e a delimitação de um grupo distinto de Suboscines com uma siringe modificada (Tracheophonæ) em relação aos demais (Haploophonæ), que são aceitas até hoje e fortemente corroboradas por análises moleculares.

Desde as grandes contribuições de Müller e Garrod, os Passeriformes possuem caracteres diagnósticos exclusivos para a ordem e seus dois grandes grupos, Oscines (Passeri, aves canoras ou *true songbirds*) e Suboscines (Tyranni ou Clamatores). Os resultados morfológicos de Müller, Garrod e outros autores durante o século XIX (sintetizados em Ames, 1971) foram seminais na sistemática de Passeriformes, com grandes contribuições para as primeiras ideias de classificação para o grupo. Algumas de suas contribuições têm sido corroboradas e reforçadas com novos caracteres morfológicos, filogenias moleculares e análises biogeográficas (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003; SICK, 1997).

Quase um século depois do monofiletismo de Oscines ser estabelecido (GARROD, 1876), Feduccia (1974) identificou uma característica apomórfica em Suboscines, compartilhada por apenas poucos grupos de aves não-passeriformes e exclusiva para Suboscines dentro de Passeriformes (FEDUCCIA, 1977; MAYR, 2003). A columela ou estribo é um ossículo do ouvido médio dos tetrápodes (FEDUCCIA, 1974), apresentando uma grande variação entre as diferentes linhagens como mamíferos e aves. Feduccia (1974) estudou e comparou a forma da columela entre diversas linhagens passeriformes, e verificou que todos os Suboscines apresentavam uma forma bulbosa típica para este ossículo (FEDUCCIA, 1974). Depois disso, ambos Suboscines e Oscines apresentam hoje respectivas sinapomorfias morfológicas, e são fortemente corroborados como grupos irmãos em filogenias moleculares.

Muitos outros estudos morfológicos com a ordem decorreram ao longo dos séculos XIX e XX, envolvendo diversas abordagens como musculatura da siringe (AMES, 1971), musculatura do crânio (BEECHER, 1953) e fusão dos dígitos dos pés (AMES, 1971; BEECHER, 1953; CLARK, 1981), entre outros. Porém, pouco se avançou no conhecimento das relações filogenéticas dos grandes grupos em Passeriformes, como famílias e superfamílias. A presença dessas aves em praticamente todos os ambientes, aliada à ampla exploração de diferentes hábitos alimentares (*e.g.* grãos e frutos, predação de insetos e pequenos vertebrados,

granivoria, frugivoria, herbivoria, nectarivoria), fez com que as classificações baseadas em morfologia refletissem essencialmente, grupos funcionais que compartilhavam diferenciações decorrentes de forrageamento. Por exemplo, os termos *wren*, *robin*, *fly-catcher* e *warbler* eram dados a todos os passeriformes que apresentassem o conjunto de características morfológicas típicos de cada um desses nomes, o que foi responsável por obscurecer muitas diferenças evolutivas importantes entre os grupos (*e.g.* *Acanthisitta* é chamado de *wren* da Nova Zelândia, por aparentar fortemente os *wrens* da Eurásia, no entanto, este gênero não possui nenhuma afinidade filogenética com estes e sim é o grupo irmão de todos os outros passeriformes) (BARKER, 2011; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008; MAYR, 1958; SICK, 1997). Apesar das reconhecidas dificuldades em delimitar os grupos internos de Passeriformes e suas relações, o monofiletismo (HENNIG, 1965) da ordem foi estabelecido desde Garrod (1873-1876), e já foi formalmente testado em um contexto filogenético (HENNIG, 1965; RAIKOW, 1982). Atualmente, a ordem é corroborada por cinco sinapomorfias (HENNIG, 1965) morfológicas e três caracteres morfológicos adicionais (RAIKOW; BLEDSOE, 2000).

Como sumariado nesta seção, as contribuições morfológicas para se entender a evolução de Passeriformes foram fundamentais, organizando pela primeira vez a imensa diversidade do grupo. Particularmente, estes estudos foram importantes para delimitar Passeriformes com características morfológicas exclusivas, excluindo substancialmente as aves não-Passeriformes que eram alocadas no grupo. Entretanto, as maiores descobertas para o entendimento das relações internas de Passeriformes atingiram seu zênite após o advento das técnicas moleculares e os estudos de Sibley & Ahlquist (1990).

Contribuições Moleculares: Hibridação DNA-DNA

Por volta de 1980-1990, técnicas moleculares para inferir filogenias baseadas na hibridação DNA-DNA atingiram seu ápice, sendo aplicadas principalmente em estudos de sistemática de mamíferos e aves (BARKER, 2011). A técnica consiste basicamente em separar uma fita da dupla hélice de DNA de espécies diferentes e realizar fusões entre uma fita de uma espécie com outra fita de uma espécie diferente. Em seguida, este par híbrido é aquecido, e o calor e tempo necessários para desfazê-lo são medidores indiretos do parentesco evolutivo. Quanto mais tempo e calor forem necessários para separar as fitas de duas espécies, maior deve ser a afinidade filogenética entre elas (SIBLEY; AHLQUIST, 1990).

Por volta desta época, o acúmulo de dados gerados com a técnica para a classe Aves por Charles Sibley e Jon Ahlquist culminaram, em 1990, na publicação do livro *Phylogeny and Classification of Birds*. Esta obra se mostrou revolucionária em inúmeros aspectos na classificação de Aves em geral, e apesar da técnica ter sido intensamente criticada (HARSHMAN, 1994), a obra de Sibley e Ahlquist ainda é uma das principais referências em estudos ecológicos e filogenéticos com aves (BARKER, 2011; RICKLEFS, 2005; 2012). Os resultados de hibridação DNA-DNA também forneceram a primeira escala temporal para a divergência das principais linhagens passeriformes, utilizando métodos baseados na teoria do relógio molecular estrito (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965). Até então, a noção do tempo de divergência entre as linhagens de Aves foi completamente desconhecida durante a história da ornitologia (BARKER, 2011).

Para Sibley & Ahlquist (1990), o resultado mais inesperado e certamente a maior contribuição para a história evolutiva de Passeriformes foi a divisão de Oscines em dois grandes clados, as parvordens Corvida e Passerida (SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Corvida continha aves com aspectos gerais de corvos e gralhas, e apesar de algumas linhagens estarem

amplamente distribuídas, a grande diversidade da parvordem está centrada no arquipélago da Australásia (região Australo-Papuásia e Sudeste Asiático, Hemisfério Sul) (SIBLEY; AHLQUIST, 1990). De forma contrária, Passerida, apesar de muitas linhagens cosmopolitas, tem grande parte de sua diversidade concentrada nas áreas continentais da Eurásia (Hemisfério Norte), onde foi inferida sua origem (SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Corvida foi dividida em três superfamílias, Menuroidea, Meliphagoidea e Corvoidea. A parvordem Passerida também foi dividida em três superfamílias, Sylvioidea, Muscicapoidea e Passeroidea (Figura 2). A partir desta separação marcante entre as parvordens Oscines e os Hemisférios Norte e Sul, Sibley e Ahlquist sugeriram uma diversificação em paralelo entre estas maiores linhagens de Oscines. Enquanto Passerida originou-se e diversificou em massa na Eurásia, África e Américas, Corvida obteve igual sucesso na colonização da Austrália, Sudeste Asiático e ilhas oceânicas do Pacífico (BARKER, 2011)

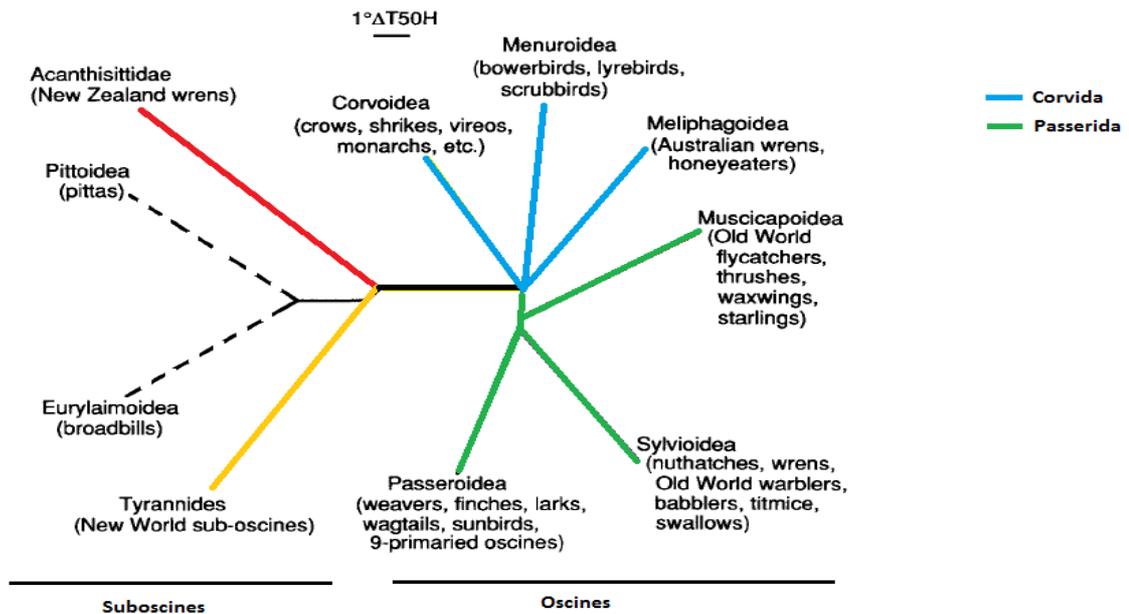


Figura 2: Esquema modificado de Harshmann (1994), ilustrando as relações evolutivas obtidas a partir de hibridação DNA-DNA por Charles Sibley e John Ahlquist (1990). Nesta técnica, uma das fitas de DNA de diferentes espécies é pareada com outra, formando um par híbrido. Em seguida, este par é aquecido, e quanto maior o tempo e calor necessários para desfazê-lo, maior é o parentesco filogenético das espécies envolvidas. A afinidade evolutiva é portanto inferida indiretamente e representada no comprimento dos ramos. Neste esquema é possível notar que Sibley e Ahlquist recuperaram as linhagens tradicionalmente separadas por morfologia, Oscines e Suboscines, e identificaram considerável identidade evolutiva entre os Suboscines do Novo Mundo (Tyrannides) e do Velho Mundo (Eurylaimides). O resultado mais destacado pelos autores foi a divisão de duas radiações de Oscines, as parvordens Corvida (azul) e Passerida (verde), cada uma subdividida em três superfamílias respectivas.

Até os estudos de Sibley e Ahlquist em 1990, acreditava-se que os Passeriformes tinham se originado na Laurásia, no hemisfério Norte (BARKER, 2011; ERICSON et al., 2002). No entanto, paleo-ornitólogos constantemente questionavam esta hipótese, chamando atenção para uma possível origem Austral para a ordem. Esses questionamentos se baseavam no registro fóssil de Passeriformes, que é completamente ausente em estratos do Cretáceo e Paleógeno (antigo Terciário inferior) em todo o Hemisfério Norte (EDWARDS; BOLES, 2002), só começando a ser encontrado em estratos mais recentes, como Mioceno e Oligoceno (MANEGOLD; MAYR; MOURER-CHAUVIRÉ, 2004; MAYR; MANEGOLD, 2004). A possibilidade de uma origem gondwânica para a ordem se fortaleceu após a descoberta e descrição do fóssil mais antigo de um passeriforme na Austrália, datado do início do Eoceno, aproximadamente 54 Milhões de anos atrás (Ma) (BOLES, 1995; 1997). Esta descoberta, além do impacto geográfico

para a origem do grupo, também indicou uma origem muito mais antiga para Passeriformes. Como até a descoberta do relógio molecular (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965) a origem de um grupo era exclusivamente inferida pela morfologia e idade do primeiro fóssil conhecido, antes do espécime australiano de Boles (1995) os fósseis mais antigos de passeriformes datavam no máximo do início do Oligoceno (MANEGOLD; MAYR; MOURER-CHAUVIRÉ, 2004), cerca de 30 Ma. Esta era portanto, a data assumida para a origem do grupo (EDWARDS; BOLES, 2002). As informações de hibridação DNA-DNA, ao identificar Corvida como uma linhagem centrada na Australásia, fortaleceram ainda mais as hipóteses alternativas sobre o papel fundamental da Gondwana na evolução de Passeriformes (BARKER, 2011). A imensa topologia proposta por Sibley e Ahlquist (1990) foi nomeada “A Tapeçaria”, devido à magnitude do trabalho quando impresso.

Quase imediatamente após a publicação de *Phylogeny and Classification of Birds* (1990), um grande número de estudos foram publicados testando as hipóteses filogenéticas propostas por Sibley & Ahlquist (1990). Estes testes, em geral análises nas porções menores da Tapeçaria, buscavam refinar ou detalhar uma radiação em particular, como por exemplo, Corvida. Os primeiros estudos utilizaram o mesmo método de Sibley e Ahlquist (1990), a hibridação DNA-DNA, seguindo por um breve período de análises com sequências peptídicas. Estes trabalhos foram suficientes para indicar que a base de Oscines precisava ser melhor resolvida, especificamente o monofiletismo de Corvida em relação a Passerida (BARKER, 2011; HARSHMAN, 1994). As primeiras evidências para o parafiletismo de Corvida foi a constatação de que a superfamília Menuroidea poderia ser parafilética, evidenciado pela grande distância genética entre o gênero australiano (*Menura*) de todos os outros Oscines (CHRISTIDIS; SCHODDE, 1991; SHELDON; GILL, 1996). Note que esta configuração foi proposta mais de um século antes da Tapeçaria, por Garrod (1876), e as análises moleculares que recuperaram esta posição para *Menura* corroboraram o indicado pela morfologia (Figura 1).

Pouco mais de uma década após a publicação da Tapeçaria, as primeiras filogenias de Passeriformes baseadas em sequências de DNA (BARKER; BARROWCLOUGH; GROTH, 2002; ERICSON et al., 2002) resultaram em um refinamento ainda maior para as relações internas de Passeriformes. As falhas apontadas por estudos anteriores foram confirmadas por sequências de DNA, e o parafiletismo de Corvida foi corroborado com a inserção de Passerida em sua diversidade, trazendo a origem de todos os Passeriformes para o Hemisfério Sul (Gondwana). Outras importantes alterações na Tapeçaria foram evidenciadas pela primeira vez, como o parafiletismo de Suboscines (BARKER; BARROWCLOUGH; GROTH, 2002; ERICSON et al., 2002).

Contribuições Moleculares: Sequências de DNA

Somente uma única linhagem passeriforme permanecia sem uma posição definida na Tapeçaria. Por muitos anos, antes mesmo de Sibley e Ahlquist proporem sua hipótese, a família Acanthisittidae era tentativamente associada tanto a Oscines quanto a Suboscines. Em ambos os casos, nenhum argumento convincente fora proposto para justificar sua posição em um desses clados, pois todas as abordagens morfológicas eram incapazes de elucidar definitivamente a posição de Acanthisittidae entre os demais Passeriformes (ERICSON et al., 2002; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003). Acanthisittidae possui somente três espécies distribuídas em dois gêneros, todos endêmicos da Nova Zelândia (ERICSON et al., 2002). A posição filogenética da família, que já era ambígua por morfologia, continuou incerta mesmo na Tapeçaria (BARKER, 2011). Sibley e Ahlquist (1990) incluíram Acanthisittidae provisoriamente em Suboscines (Figura 2, em vermelho), enfatizando que os resultados da hibridação DNA-DNA eram insuficientes para resolver esta questão (ERICSON et al., 2002; SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Entretanto, o principal argumento para manter Acanthisittidae em

Suboscines era criterioso, pois com base em sua siringe os acanthisitídeos definitivamente não eram Oscines (SIBLEY; AHLQUIST, 1990; SIBLEY; WILLIAMS; AHLQUIST, 1982).

Por outro lado, os argumentos para justificar a afinidade de Acanthisittidae a Oscines foram sugeridos por Feduccia (1975) e Raikow (1987). Feduccia baseou-se na morfologia da columela para tal relação Oscines-Acanthisittidae (FEDUCCIA, 1975), no entanto o próprio autor rejeitou posteriormente sua hipótese, ao verificar que a ocorrência da forma da columela encontrada nas duas linhagens era na verdade plesiomórfica, ocorrendo também em muitas outras aves não-Passeriformes (BARKER, 2011; FEDUCCIA, 1979). Raikow (1987), por sua vez, propôs uma proximidade entre Oscines e Acanthisittidae baseado na musculatura da cintura pélvica e seus membros (RAIKOW, 1987). Como este agrupamento era suportado por somente um único estado derivado de um caráter, Raikow não chegou a questionar sua alocação em Suboscines sugerida por Sibley (BARKER, 2011; RAIKOW, 1987).

Ou seja, ao mesmo tempo que Acanthisittidae não apresenta a columela derivada de Suboscines, (FEDUCCIA, 1975), sua siringe não possui nenhuma musculatura diferenciada, assemelhando-se inclusive a membros não-Passeriformes, o que a exclui definitivamente de Oscines (AMES, 1971; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003; SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Por estes motivos, a posição de Acanthisittidae se manteve problemática até os estudos com sequência de DNA de Ericson *et al.* (2002) e Barker *et al.* (2002), os quais elucidaram não somente a posição filogenética de Acanthisittidae como grupo irmão de todos os outros Passeriformes, mas também forneceram evidências e argumentos explícitos para a origem da ordem na Gondwana (ERICSON *et al.*, 2002). Esta posição de Acanthisittidae violou o monofiletismo de Suboscines *sensu* Sibley e Ahlquist (1990), porém tem encontrado grande aceitação em estudos posteriores, tendo sido elevada à categoria de terceira subordem passeriforme, Acanthisittia (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003), mantendo Suboscines como grupo monofilético.

O Panorama Atual em Passeriformes e Suas Lacunas

Atualmente, Passeriformes são divididos em três subordens, Acanthisittia e as tradicionalmente reconhecidas Oscines e Suboscines, agrupadas no clado nomeado Eupasseres (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003). Com a separação da Nova Zelândia do supercontinente Gondwana, acredita-se que Acanthisittia tenha sido carregada na placa Neozelandesa, isolando-se dos demais Eupasseres (BARKER et al., 2004; ERICSON et al., 2002), que em seguida se dividiriam com o isolamento de Oscines na placa Australiana (BARKER et al., 2004). Em consequência, os Suboscines ficaram restritos às remanescentes Antártica e América do Sul. O padrão atual de distribuição dos Passeriformes, como muitos outros grupos de aves, segue claramente uma divisão entre Novo Mundo e Velho Mundo, ao invés de uma disjunção Laurasia-Gondwana (BARKER et al., 2004; 2012; CRACRAFT et al., 2004; KLICKA; JOHNSON; LANYON, 2000). Isto se evidencia ao observarmos um grande número de linhagens, tanto de Oscines quanto de Suboscines, ocorrerem em continentes Laurasiáticos, mesmo tendo surgido na Gondwana (DEL HOYO et al., 1992). Exemplos de linhagens Gonwânicas em regiões Laurasiáticas podem ser vistos em Suboscines, cuja maior parte da diversidade ocorre no continente Americano, mas também apresenta linhagens no sudeste Asiático e fósseis na Europa central (BALLMANN, 1969).

Atualmente, mesmo com os avanços de séculos nos estudos com Passeriformes, pode-se identificar lacunas no conhecimento acerca da evolução do grupo. Desde Sibley e Ahlquist (1990), nenhum estudo se propôs a inferir a filogenia de Passeriformes com um tamanho amostral tão grande como o utilizado na Tapeçaria. Sibley e Ahlquist forneceram pela primeira vez uma escala temporal para a diversificação da ordem sob o relógio molecular estrito (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965), entretanto, cinco décadas se passaram após a descoberta do relógio molecular, e tanto a abordagem quanto os métodos para estimar a o tempo de

divergência entre organismos progrediram vertiginosamente (KUMAR, 2005; YANG; RANNALA, 2012). Estes métodos mais recentes são capazes de incorporar muitos aspectos fundamentais da evolução molecular, bem como as incertezas que geralmente estão associadas às idades dos fósseis. Dessa forma, inferências dos tempos de divergência com métodos recentes como o bayesiano são extremamente robustas e confiáveis quando comparadas às abordagens mais simplistas do relógio estrito .

Árvores filogenéticas precisam ser devidamente calibradas para a inferência do tempo de divergência entre as linhagens (HELED; DRUMMOND, 2012; SANDERSON, 1997). A calibração consiste em inserir *a priori* a data para um ou mais nós da árvore, geralmente extraídas de informação fóssil ou eventos biogeográficos, os quais são usados para os cálculos de datação molecular (YANG; RANNALA, 2006; YANG; YODER, 2003). A calibração utilizada por Ericson et al. (2002) e Barker et al. (2004) é talvez o tema que mais mereça investigações. Os autores, que foram os primeiros a datar as divergências sem o relógio absolutamente estrito, adotaram somente um único ponto de calibração para toda a árvore. O uso de um único ponto de calibração permite uma inferência menos robusta que outra baseada em múltiplos pontos de calibração (YANG; RANNALA, 2006) (ver detalhes adiante). Um único ponto de calibração ainda pode trazer problemas mais sérios quando a própria data do fóssil é de certa forma incerta, ou quando a data do evento geológico (*e.g.* separação de continentes) inclui uma certa complexidade, como a duração de um evento vicariante por exemplo. Esta imprecisão não acomodada no algoritmo de datação molecular gera estimativas enviesadas ou mesmo incoerentes com o conhecimento do grupo ou de eventos geológicos. Ericson et al. (2002) e Barker et al. (2004) calibraram suas inferências na primeira divergência em Passeriformes, fixando a data do nó *Acanthisittia-Eupasser* (demais Passeriformes) em 82 Ma. Esta data foi adotada ao assumirem que o isolamento filogenético de *Acanthisittia* do restante de

Passeriformes tenha ocorrido imediatamente quando a Nova Zelândia iniciou seu longo processo de separação da Gondwana Leste (COOPER; MILLENER, 1993).

Ericson, Barker e seus respectivos colaboradores mostraram que as divergências entre os grandes grupos de Passeriformes provavelmente estariam associadas à sequência de eventos de ruptura da Gondwana (EDWARDS; BOLES, 2002). No entanto, calibrar nós em uma filogenia com eventos geológicos requer extrema cautela do pesquisador, principalmente quanto aos critérios para especificar a data do evento (PARHAM et al., 2012). Muitas vezes, eventos geológicos podem durar milhões de anos para se completarem, e por isso, ao serem fixados em um valor médio há uma perda inevitável da informação temporal contida no intervalo. Isto gera um viés para os cálculos de tempo de divergência (YANG; RANNALA, 2006; YANG; YODER, 2003). Caso haja um grande intervalo entre o início de um processo geológico e seu fim e um único valor dentro deste intervalo é fixado, a inferência temporal da filogenia se apresenta pouco confiável (PARHAM et al., 2012).

Como os autores não utilizaram métodos de inferência bayesiana para a datação de suas filogenias, não foi possível acomodar a incerteza da data utilizada, restringindo pontualmente a data para o nó em 82 Ma. Nesta data, a placa Neozelandesa de fato iniciou a separação da Gondwana (COOPER; MILLENER, 1993), no entanto este processo foi gradual, sendo concluído somente por volta de 55-52 Ma com a formação da passagem Cato (*Cato Trough*) no mar da Tasmânia (GAINA et al., 1998; SCHELLART; LISTER; TOY, 2006; WORTHY et al., 2010). Para *taxa* com baixa capacidade de dispersão como *Acanthisitta*, a data final é que deveria ser utilizada como calibração vicariante do nó em questão (WORTHY et al., 2010). Na verdade, calibrações geológicas requerem extremo cuidado mesmo com os métodos atuais, e fósseis são frequentemente recomendados como melhores pontos de calibração em datações moleculares (PARHAM et al., 2012; YANG; RANNALA, 2006). Este é claramente um exemplo de caso que exige a necessidade de acomodar a incerteza na data utilizada como calibração. Ao fixarem o nó

Acanthisittia-Eupasseres em 82 Ma, sem acomodar um intervalo de confiança para a ruptura final entre as placas Neozelandesa e Antártica, Ericson et al. (2002) e Barker et al. (2004) incorporaram um erro de pelo menos 20 Ma para a primeira divergência na ordem. Isto fez com que todos os nós das filogenias propostas pelos autores fossem inferidos como mais antigos do que realmente podem ser, comprometendo todas as associações geológicas e biogeográficas com as datas obtidas. Múltiplos pontos de calibração são atualmente possíveis e altamente recomendados para inferir o tempo de divergência com maior acurácia (YANG; RANNALA, 2006; YANG; YODER, 2003). Apesar das taxas entre *loci* e *taxa* poderem variar entre si, os tempos de divergência são compartilhados, e portanto múltiplas restrições internas nos modelos de datação molecular levam a uma estimativa mais confiável acerca dos tempos de divergência, mesmo quando o relógio é violado (YANG; YODER, 2003). Ainda não foram abordadas inferências bayesianas nem múltiplos pontos de calibração em análises filogenéticas com Passeriformes em larga escala.

Outros dois pontos no conhecimento atual de Passeriformes que instigam maiores esclarecimentos são a primeira divergência na subordem Suboscines, que separou o grupo em duas infraordens que atualmente apresentam uma distribuição marcadamente disjunta entre Novo Mundo (Tyrannides) e Velho Mundo (Eurylaimides). Nenhum estudo investigou especificamente como as infraordens Tyrannides e Eurylaimides apresentam atualmente uma distribuição tão disjunta. Os estudos focados em Tyrannides, um grupo primariamente Neotropical (DEL HOYO et al., 1992), já partem do princípio que o ancestral desta infraordem habitava o continente Americano desde sempre, apresentando lá uma notável diversificação autóctone (MOYLE et al., 2009; OHLSON et al., 2013; TELLO et al., 2009). Por outro lado, a única proposta formal para origem e diversificação de um clado de Suboscines desde a Gondwana se direcionou para a linhagem de Suboscines do Velho Mundo, Eurylaimides (MOYLE et al., 2006). Neste estudo, Moyle e colaboradores (2006) inferiram a origem do grupo

no subcontinente Indiano após migrarem da Gondwana, atravessando uma grande extensão de mar. Quando a placa indiana se chocou com a Ásia, os Eurylaimides se diversificaram nas linhagens Asiáticas, Malaias e Africanas atuais. A data inferida para o clado dos Suboscines do Velho Mundo foi em torno de 70 Ma (MOYLE et al., 2006), data esta em que a Índia já se apresentava consideravelmente isolada do restante do continente gondwânico por mais de 2000 km (ALI; AITCHISON, 2008; CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2012). Ainda assim, um evento de dispersão sobre uma vasta porção do proto-oceano Índico foi proposta por Moyle e colaboradores (2006) para satisfazer a hipótese Índia-Ásia para a origem de Eurylaimides. Mesmo com esta proposta para a origem dos Suboscines do Velho Mundo, a divergência de Eurylaimides de seu grupo irmão Tyrannides não foi abordada, e a data utilizada pelos autores foi a mesma data enviesada de 82 Ma para a raiz de Passeriformes. Portanto, o contexto em que estas duas linhagens Suboscines se separaram permanece em aberto.

A maior lacuna no conhecimento da evolução de Oscines se encontra nos distintos padrões da colonização da subordem no Novo Mundo. Muitos Oscines são verdadeiramente cosmopolitas, ocorrendo em praticamente todas as regiões do planeta (DEL HOYO et al., 1992). No entanto, muitas linhagens, especialmente na parvordem Passerida, colonizaram as Américas de forma notável, e atualmente cerca de um terço de toda diversidade Oscines é endêmica do Novo Mundo (DEL HOYO et al., 1992). Tais colonizações também apresentam padrões marcantes, pois nem todas as linhagens de Oscines conseguiram chegar ao Novo Mundo, tampouco as que conseguiram se diversificar de forma homogênea e proporcional entre si. Nenhum estudo até o momento se dedicou a identificar estes padrões em larga escala, ou mesmo propor hipóteses para o sucesso diferenciado de somente algumas linhagens Oscines no continente Americano. Certamente estes padrões podem ter alguma relação com o tempo de chegada de uma linhagem ao continente e as possíveis interações ecológicas com a fauna autóctone. Isto nos traz de volta ao problema central desta dissertação, a ausência de

uma escala temporal confiável e devidamente calibrada para Passeriformes. (BARKER et al., 2004; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008; KLICKA; JOHNSON; LANYON, 2000; ROBINSON et al., 2010).

Finalmente, estudos que investigaram relações filogenéticas de grandes grupos em Passeriformes se utilizaram um pequeno tamanho amostral em relação à magna diversidade do grupo, não superando 70 taxa e dois *loci* (BARKER et al., 2004; BARKER; BARROWCLOUGH; GROTH, 2002; ERICSON et al., 2002). Estes números, em especial o tamanho amostral taxonômico, representam uma parcela ínfima para o número de famílias (130), gêneros (~1.235) e espécies (~10.600) atualmente reconhecidas em Passeriformes (GILL; DONSKER, 2012).

Justificativa e Objetivos

As principais lacunas no atual conhecimento sobre a evolução dos Passeriformes são o baixo tamanho amostral utilizado em reconstruções filogenéticas; uma única data usada como ponto de calibração, sem nenhum intervalo de confiança associado; bem como nunca terem sido implementadas análises bayesianas de relógio molecular relaxado. Meus objetivos gerais no presente trabalho são explorar essas lacunas pela primeira vez, testando as hipóteses atuais para a evolução dos grandes grupos Passeriformes e propor novas explicações para padrões inéditos que possam emergir.

Os objetivos específicos são:

1) Inferir a filogenia de Passeriformes, fornecendo uma visão detalhada sobre as relações evolutivas entre famílias e grandes grupos da ordem, utilizando o maior tamanho amostral até o momento, com aproximadamente 86% da diversidade atual dos gêneros passeriformes (GILL; DONSKER, 2012) e nove *loci* (4 nucleares e 5 mitocondriais).

2) Utilizar a inferência bayesiana para calcular o tempo de divergência em Passeriformes com o relógio molecular relaxado não-correlacionado, utilizando pela primeira vez múltiplas calibrações fósseis representando 15 nós internos na filogenia, para uma datação robusta das principais linhagens de Passeriformes.

3) Com os resultados filogenéticos e tempos de divergência devidamente calculados, buscarei definir o cenário da primeira diversificação de Suboscines, referente à separação Novo – Velho Mundo, bem como identificar e analisar em larga escala o panorama geral dos padrões da colonização de Oscines no Novo Mundo.

Material & Métodos

Delineamento Amostral e Sistema de Classificação

O escopo deste estudo foi reconstruir uma hipótese filogenética abrangente em nível de família para Passeriformes e, portanto, o monofiletismo de gêneros foi assumido. A razão pela qual resolvi assumir o monofiletismo de gênero é baseada nos seguintes pontos. Muitas espécies em Passeriformes ainda sequer possuem um *locus* sequenciado, enquanto que a maioria das espécies que têm alguma informação depositada em bancos de dados como GenBank (BENSON et al., 2010), apresenta um ou poucos *loci*. Portanto, uma análise incluindo todas as espécies reconhecidas da ordem, cerca de 5.700, aumentaria drasticamente o número de caracteres ausentes na matriz (*missing data* ou *gaps*), o que por sua vez aumenta a disparidade entre *taxa* que apresentam sequências longas e completas e aqueles com poucos *loci* e curtas sequências. Essa disparidade diminui severamente a proporção de sinal filogenético, reduzindo a acurácia dos programas de reconstrução (WIENS, 2003). Estudos indicam que o que realmente prejudica inferências filogenéticas com matrizes com grande número de caracteres ausentes é esta disparidade proporcional entre sequências longas e curtas, em vez dos caracteres ausentes em si (WIENS, 2003). Ademais, matrizes com grande disparidade informativa entre sequências são igualmente responsáveis por intensificar os efeitos dos *rogue taxa* ou “*taxa desonestos*” na filogenia (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013; WILKINSON, 1996) (ver adiante detalhes sobre *rogue taxa*). Por fim, o tempo computacional necessário para um conjunto de dados baseado em nível específico tornaria a inferência computacionalmente exaustiva, senão proibitiva, reduzindo a acurácia dos algoritmos de busca e gerando resultados de qualidade inferior (STAMATAKIS, 2006; 2006).

Ao assumir o monofiletismo de gêneros, é possível aumentar consideravelmente o preenchimento da matriz, pois espécies de um mesmo gênero que possuem diferentes marcadores sequenciados permitem que os *loci* combinados forneçam sinal filogenético para o

gênero. Desta forma, a análise feita em nível de gêneros permite uma inferência confiável para as relações filogenéticas em nível de famílias, e ao mesmo tempo promove um teste robusto para o próprio monofiletismo das famílias, ambos o foco específico deste estudo.

A Classificação para gêneros e famílias seguiu o Comitê Internacional de Ornitologia (IOC) 3.2 (GILL; DONSKER, 2012). Os grandes clados seguem nomes informais comumente usados em estudos com o grupo, como “Oscines Basais” e “Oscines de Transição” (BERESFORD et al., 2005; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008; JONSSON et al., 2011).

A escolha do grupo externo foi baseada em estudos recentes investigando explicitamente o grupo irmão de Passeriformes (SUH et al., 2011; WANG; BRAUN; KIMBALL, 2012). Cinco gêneros não-Passeriformes foram utilizados como grupo externo: *Amazona*, *Nestor* (Psittaciformes), *Cuculus* (Cuculiformes), *Falco* (Falconiformes) e *Grus* (Gruiformes).

Dados de distribuição geográfica seguiram a coleção *Handbook of Birds of the World* (DEL HOYO et al., 1992-2011). A distribuição individual de cada espécie foi levantada para delimitar uma zona geral de distribuição dos seus respectivos gêneros. Os nomes e delimitações das regiões zoogeográficas usados na discussão seguem HOLT et al. (2013) Durante o processo de desenvolvimento do presente estudo, foram consideradas análises formais de biogeografia. No entanto, até o início das análises biogeográficas para esta dissertação, nenhum programa era capaz de lidar com um número maior que 7 regiões biogeográficas (Richard Ree, comunicação pessoal), e para Passeriformes são reconhecidas pelo menos 11 regiões biogeográficas, podendo chegar a 21 unidades distintas (HOLT et al., 2013), impedindo uma análise biogeográfica detalhada para a ordem. Nesta dissertação, portanto, preferi restringir as discussões biogeográficas a dois grandes domínios biogeográficos, profundamente ligados à história filogenética de Passeriformes, as áreas Novo Mundo e Velho Mundo, facilmente identificáveis sem a necessidade de reconstruções

ancestrais. Com efeito, gêneros e linhagens que ocorrem em ambas as regiões simultaneamente são denominados *cosmopolitas*.

Alinhamento de Sequências de DNA

Todas as sequências deste estudo foram exploradas e baixadas a partir do portal PhyLoTA (SANDERSON et al., 2008). Esta base de dados fornece informações instantâneas para a distribuição taxonômica atual de sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank (BENSON et al., 2010), seguindo a organização taxonômica do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O objetivo do PhyLoTA é fornecer prontamente os possíveis conjuntos de dados que apresentam-se distribuídos em uma grande quantidade de organismos, permitindo filogenias em escalas maiores. Tais conjuntos são denominados *clusters* ou conjuntos de sequências homólogas, obtidos por algoritmos de agrupamento de sequências e cuja homologia é inferida através de pesquisas **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) seguindo o método “todos-contra-todos”, onde todas as sequências são comparadas entre si e agrupadas em *clusters* de acordo com o índice de similaridade (SANDERSON et al., 2008). Desta forma, as sequências dispostas para cada organismo ou grupos de organismos no PhyLoTA já passaram por um teste prévio para apresentar as sequências potencialmente homólogas, sendo mais recomendadas para seu uso em inferências filogenéticas.

A escolha dos marcadores buscou explorar a maior diversidade taxonômica, portanto os genes mais sequenciados em Aves, como citocromo *b* e citocromo oxidase *I*, foram imediatamente escolhidos. Com este critério, objetivei a melhor resolução topológica possível, pois quanto maior o tamanho amostral taxonômico, melhor tende a ser a estimativa da

filogenia (LARTILLOT; PHILIPPE, 2008; ROURE; BAURAIN; PHILIPPE, 2013). Isto se dá pois quanto maior o número de *taxa*, maiores são as chances de ramos longos serem quebrados, refletindo de fato a história evolutiva de grupos verdadeiramente monofiléticos, minimizando artefatos como a atração de ramos longos (*long branch attraction*) (PICK et al., 2010; SOARES; SCHRAGO, 2012; WIENS, 2005). Este tipo de artefato geralmente ocorre quando duas sequências filogeneticamente distantes, apresentam um número muito elevado de substituições, causando com frequência o agrupamento destas na topologia somente por ambas apresentarem ramos longos.

Também foram incluídos genes de diferentes origens genômicas, cujas taxas de evolução são marcadamente diferentes entre si por desempenharem diferentes funções metabólicas, como ribossomais, mitocondriais e nucleares (DRUMMOND et al., 2006; IRESTEDT; OHLSON, 2008; YANG; YODER, 2003). Com este segundo critério, visei considerar a heterogeneidade das taxas evolutivas encontrada entre diferentes marcadores em uma mesma estimativa filogenética. Genes diferentes podem ter evoluído de formas diferentes desde o ancestral de uma linhagem, não seguindo necessariamente os eventos de cladogênese (MADDISON, 1997; MADDISON; KNOWLES, 2006). Assim, múltiplos *loci* de diferentes origens genômicas tendem a fornecer uma taxa mediana na recuperação da história evolutiva de determinada linhagem. Nesse sentido, a taxa agiria de forma a tamponar as inferências filogenéticas com um amplo espectro de heterogeneidade das taxas evolutivas, reduzindo por sua vez as discrepâncias entre diferentes genealogias de cada gene (MADDISON; KNOWLES, 2006; ROSENBERG; KUMAR, 2001; YANG; RANNALA, 2006; YANG; YODER, 2003). De forma semelhante, as diferentes taxas evolutivas podem ser incorporadas na inferência do tempo de divergência (DRUMMOND et al., 2006; YANG; YODER, 2003).

Do ponto de vista biológico, um alinhamento de sequências de DNA é uma hipótese sobre homologia de múltiplos resíduos de proteínas ou sequências de nucleotídeos (SALEMI;

VANDAMME; LEMEY, 2012). Os principais pressupostos do alinhamento são: todas as sequências são homólogas; cada coluna agrupa sítios homólogos entre as sequências e o nome associado a cada sequência reflete uma entidade monofilética. Portanto, ao alinhar as sequências, assume-se que cada coluna (sítio) do alinhamento divergiu de um estado ancestral comum, assim cada coluna agrupa sítios homólogos entre as sequências. Idealmente, uma matriz deveria conter sequências de tamanhos idênticos para todos os taxa, sem nenhum caráter ausente. Caracteres ausentes (*gaps*) podem significar inserções e deleções que ocorreram ao longo do processo evolutivo, mas também podem indicar que certos *loci* não foram completamente sequenciados (sequências incompletas), o que reduz o número de sítios comparáveis para a reconstrução filogenética (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Métodos estatísticos de busca baseados na otimização de caracteres, como a Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* – ML), tratam *gaps* como caracteres ambíguos, adotando assim probabilidades iguais daquele sítio específico ser A, T, C ou G (1.1.1.1) (FELSENSTEIN, 2004). Portanto, os métodos estatísticos de reconstrução filogenética são capazes de calcular a verossimilhança de cada terminal, incluindo os valores de probabilidade de caracteres ambíguos, e assim calcular o restante da árvore (FELSENSTEIN, 2004; YANG, 2006).

A partir dos critérios descritos acima, nove *loci* foram selecionados do PhyLoTA para integrar a análise final deste estudo, incluindo cinco marcadores mitocondriais (regiões codificantes do citocromo b – *cytb*, citocromo oxidase I – *coxI* e NADH desidrogenase subunidade 2 – *nd2*, e ribossomais 12S e 16S); e quatro nucleares (mioglobina exons 2 a 3 – *myo*, ornitina decarboxylase exons 6 a 8 – *odc*, e genes codificantes das proteínas ativadoras de recombinação 1 e 2 – *rag1*, *rag2*). Em todos os casos em que mais de uma sequência estava disponível para um mesmo gene, prevaleceu aquela com maior número de nucleotídeos (maior comprimento). Devido ao imenso tamanho da lista final de gêneros e seus respectivos números de acesso para cada um dos nove *loci* (360 páginas), seria inviável imprimí-las como apêndice

deste estudo. Por este motivo, este material estará disponível no acervo digital da Pós Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, juntamente a uma cópia digitalizada desta dissertação. O alinhamento final pode ser requerido a qualquer momento com um contato direto com o autor. A Tabela 1 exibe de forma resumida os marcadores utilizados e o número de gêneros em cada um, e informações sobre o comprimento médio das sequências e o índice de similaridade par a par entre elas.

Tabela 1: Resumo das informações contidas em cada *locus* e no alinhamento final concatenado (colunas). Linhas indicam as seguintes informações por *locus*: número de sequências ou gêneros distintos; comprimentos mínimo e máximo da menor e maior sequência, respectivamente; e índice de identidade das sequências calculado par a par.

	ND2	CYTB	COX1	12S	16S	RAG1	RAG2	ODC	MYO	Concatenadas
Número de sequências	842	812	460	253	204	592	444	530	685	1123
Comprimento mínimo	199	224	309	147	371	331	315	169	380	307
Comprimento Máximo	1041	1143	1551	1035	586	2932	1152	741	987	10315
Identidade par a par (%)	74.6	82.1	84.3	87.4	88.6	93.9	93.5	77.4	88.5	47.7

Diferentes sequências de diferentes genes podem ocasionalmente se alinhar, caso apresentem um número muito grande de substituições (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). O alinhamento individualizado gene a gene impede que isto aconteça, além de maximizar a performance dos algoritmos em detectar os padrões gerais no alinhamento de um único gene. Portanto, cada gene foi tratado individualmente, editado e alinhado para então proceder com a inferência filogenética. O procedimento de edição das sequências consiste na adequação do quadro de leitura correto (*Open Reading Frame – ORF*). Após serem convertidas para aminoácidos, é possível detectar se as sequências de fato são traduzidas em proteínas ou se apresentam códons de parada ao longo de suas cadeias. Neste último caso, é preciso adequá-las ao respectivo *ORF*. Sequências que não se adequaram ao *ORF* mesmo após edições manuais foram eliminadas antes do alinhamento final, pois provavelmente sofreram erros durante o

sequenciamento original ou representavam pseudo-genes ao invés do gene codificante. Após os quadros de leitura terem sido devidamente corrigidos, a etapa seguinte para a reconstrução filogenética foi o próprio alinhamento das sequências.

O alinhamento foi calculado com o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004), recomendado por sua alta performance e precisão nos cálculos para conjuntos de dados com mais de 500 sequências (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). O algoritmo de alinhamento foi realizado com base na sequência de aminoácidos para todos os genes codificantes, gerando assim uma maior robustez das hipóteses de homologia. Isto se deve à maior taxa de substituição de nucleotídeos em comparação com a substituição de aminoácidos, a qual ocorre mais lentamente dada à propriedade de degeneração do código genético (NEI; KUMAR, 2000; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Ou seja, proteínas funcionais são mais conservadas que os genes que as codificam, pois diferentes códon podem ser traduzidos no mesmo aminoácido. O alinhamento feito deste modo torna-se mais robusto e confiável (NEI; KUMAR, 2000). Após o alinhamento criterioso de cada gene, todos foram concatenados usando o programa SeaView 4 (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010).

O alinhamento final conteve em 12.575 nucleotídeos e 1118 gêneros Passeriformes, com ~63% de *gaps*. A densidade da matriz final pode ser visualizada na Figura 3. Tal como esperado, nem todos os gêneros incluíram todos os loci, porém os marcadores se encontraram distribuídos homogeneamente entre as famílias e superfamílias, otimizando as análises para as linhagens de interesse deste estudo.

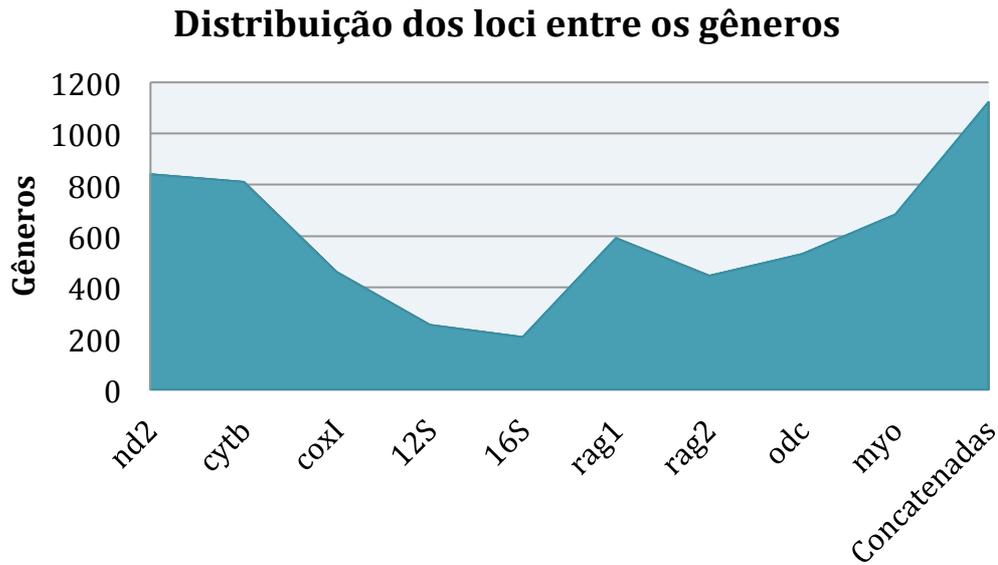


Figura 3: Gráfico representativo da diversidade genérica para cada marcador. A densidade do alinhamento de cada *locus* individual e da matriz final é representada na área escura. A matriz final (concatenada) incluiu aproximadamente 12.600 nucleotídeos e 1118 gêneros Passeriformes, com ~63% de *gaps*. É possível verificar que há uma grande representatividade de gêneros (cerca de 70%) tanto para os *loci* mitocondriais (*nd2*, *cytb* e *cox1*) quanto para os nucleares (*rag1*, *rag2*, *odc* e *myo*).

Análise Filogenética

Escolha do Método para Reconstrução

Os métodos de reconstrução filogenética podem ser divididos entre aqueles *baseados* em distância, como UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) (SNEATH; SOKAL, 1963) e Neighbour Joining (SAITOU; NEI, 1987) e aqueles baseados em *caracteres*, como Máxima Parcimônia (*Maximum Parsimony*) (FITCH, 1971), Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) (FELSENSTEIN, 1981) e Inferência bayesiana (*bayesian Inference*) (RANNALA; YANG, 1996). Nos métodos baseados em distância, a distância entre as sequências é calculada par a par e sumariada numa tabela de distâncias (YANG, 2006). Em

seguida, um algoritmo de agrupamento (*clustering*) é usado para converter a matriz de distância numa árvore filogenética (EVERITT; LANDAU; LEESE, 2001).

A reconstrução filogenética através dos métodos de distância é impossível quando há sequências que não se sobrepõem de modo algum. A não sobreposição de todas as sequências são extremamente problemáticos para as reconstruções baseadas em distância (YANG; RANNALA, 2012). Diferentemente, se fossem escolhidos métodos baseados em otimização dos caracteres como MP e bayesiana, ainda seria possível fazer com que os programas rodassem e fornecessem uma filogenia, mesmo com um desempenho sub-ótimo dos mesmos ao lidar com grandes conjuntos de sequências. A inviabilidade de utilizar inferências baseadas em métodos de distância no presente estudo são limitações inerentes aos próprios métodos, que necessitam que absolutamente todas as sequências no alinhamento apresentem sobreposição (ou seja, não admite colunas inteiras vazias) (NEI; KUMAR, 2000; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Mesmo assumindo o monofiletismo de gêneros, a matriz apresentou uma quantidade considerável de *gaps*, cerca de 63% do alinhamento (Figura 3), e como esperado, nem todas as sequências de todos os gêneros compartilhavam algum tipo de sobreposição (*overlap*) (Tabela 1). Métodos de distância são grandes compactadores de informação, reduzindo drasticamente o sinal filogenético contido nas sequências para basicamente o valor obtido da comparação par a par (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; YANG, 2006). As sequências nucleotídicas, ainda que curtas, contém informação relevante em seus sítios individuais, e com a compactação obtida na comparação par a par, a informação já escassa passa a ser insignificante em comparações posteriores. Por fim, justamente devido às comparações par a par, caso uma sequência não apresente determinado *locus*, ou seja, a ausência de uma sobreposição compartilhada entre todas as sequências do alinhamento, nem que seja de forma parcial, é terminantemente impeditiva para reconstrução baseada em distância (NEI; KUMAR, 2000; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012).

Os métodos baseados em caracteres, por outro lado, buscam adequar os caracteres (nucleotídeos e aminoácidos) observados em todos os sítios de todas as sequências em uma árvore filogenética ideal. Nesta categoria, os algoritmos utilizam critérios matemáticos, geralmente uma função objetiva, para medir a correlação entre as árvores estimadas e os dados (alinhamento). A melhor árvore, neste caso, é aquela cujo resultado da função atinge o valor ótimo (segundo sua função objetiva) quando comparado com as demais árvores estimadas (FELSENSTEIN, 2004; YANG, 2006). Os critérios utilizados para escolha desta “melhor árvore” são característicos de cada método desta classe. Uma vantagem clara destes métodos é que não requerem necessariamente que haja sobreposição de todas as sequências, e que analisam todos os sítios de todas as sequências, aproveitando a informação completa do alinhamento ao invés de comprimi-la.

Para o método de Máxima Parcimônia, o critério de otimização é minimizar o número de mudanças de caracteres para uma árvore, portanto, a árvore mais parcimoniosa é aquela com o menor número de substituições (FITCH, 1971; YANG, 2006). Em inferências baseadas em Máxima Verossimilhança, o valor da verossimilhança (fornecido em escala logarítmica devido aos valores extremamente baixos obtidos do cálculo da função) da árvore é usado para medir o ajuste (*fit*) de determinada árvore aos dados, e a árvore de máxima verossimilhança é aquela com o maior valor obtido no cálculo da função e portanto escolhida como a melhor árvore (YANG, 2006). A inferência por máxima verossimilhança resume-se no cálculo probabilístico entre árvore e alinhamento, ou seja, aquela árvore (topologia e comprimento de ramos) com maior probabilidade de explicar a evolução das sequências observadas. A inferência bayesiana, por fim, escolhe a melhor árvore baseada em sua probabilidade posterior, que significa a probabilidade daquela árvore ser a mais próxima do real dado o alinhamento (YANG, 2006). Análises bayesianas foram desenvolvidas a partir da função de Máxima Verossimilhança, portanto diferem quanto à utilização de *priors* na primeira. O *prior* é uma informação *a priori*

da distribuição probabilística de um parâmetro (YANG, 2006; 2008). Assim, as inferências bayesianas incluem a incerteza relacionada a um determinado parâmetro (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; SOARES, 2012; YANG, 2006; 2008).

Apesar de lidarem bem com grandes conjuntos de dados, métodos de Máxima Parcimônia apresentam um problema capital: a inferência não se baseia em um modelo explícito de evolução molecular a não ser a pesagem de caracteres (YANG, 2006). Por isso as topologias estimadas com MP estão sujeitas a artefatos na topologia que também ocorrem em inferências estatísticas (ML ou bayesiana) que utilizam modelos simplistas de evolução (YANG, 2006). Por outro lado, tendo-se uma matriz incluindo mais de mil terminais e ultrapassando 12 mil pares de base, abordagens bayesianas para a inferência filogenética são proibitivas com os programas atuais (IZQUIERDO-CARRASCO; SMITH; STAMATAKIS, 2011; STAMATAKIS, 2006; STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008). O principal obstáculo encontrado pelos métodos bayesianos ao lidarem com a escala do presente alinhamento é a extrema dificuldade de convergência e mistura das cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) (MILLER et al., 2002; YANG; RANNALA, 2012). Ainda não existem meios para inferir uma grande filogenia de forma confiável utilizando os programas atuais baseados em análises bayesianas, e por isso a abordagem não foi usada para inferir a topologia. No entanto, como será explicado adiante, análises bayesianas são ideais para cálculos do tempo de divergência, pois são capazes de acomodar a incerteza dos parâmetros e das datas adotadas como calibrações (ver Datação Molecular adiante para detalhes).

Portanto, a partir dos critérios descritos acima, a Máxima Verossimilhança foi escolhida como melhor método para a reconstrução filogenética dos gêneros de Passeriformes nesta dissertação, por apresentar vantagens metodológicas e computacionais. Esta escolha buscou primeiramente adequar o método de reconstrução à magnitude do conjunto de dados gerado no alinhamento final. Métodos de ML são notórios por lidarem facilmente com centenas de

taxa em tempo e performance computacionais relativamente rápidos, garantindo excelentes resultados tanto com dados simulados quanto reais (IZQUIERDO-CARRASCO; SMITH; STAMATAKIS, 2011; STAMATAKIS, 2006; 2006; STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008; YANG, 2006). Em termos absolutos, o método ideal de reconstrução seria aquele que rodaria o mais rápido de todos, e algumas análises com ML podem durar semanas, como a do presente trabalho. No entanto, apesar de esta ser uma afirmação verdadeira, não considera a performance do método na recuperação da melhor árvore. Os algoritmos de ML estão cada vez mais rápidos e eficientes com os meios de paralelização, que são formas de contornar a demanda computacional de um simples processador para a inferência, distribuindo uma mesma inferência em múltiplos processadores, acelerando a obtenção dos resultados sem perturbar a performance do método. As vantagens computacionais da ML, portanto, consistem no alto poder de resolução do método quando se trata de grandes alinhamentos, dispondo de excelentes recursos computacionais como os algoritmos de paralelização, garantindo um tempo relativamente rápido de performance para análises computacionalmente intensas (STAMATAKIS, 2006). Vantagens metodológicas consistem no poder do método em incorporar complexos modelos de substituição, de forma a aproximar de forma mais eficaz a inferência à realidade biológica (YANG, 2006; YANG; RANNALA, 2012). Os métodos de ML atuais também possuem estrutura poderosa para estimar os parâmetros dos modelos mais complexos e testar hipóteses, fornecendo uma topologia robusta, especialmente em casos de grandes alinhamentos (YANG; RANNALA, 2012).

O Método de Máxima Verossimilhança

Desde o primeiro estudo que aplicou um algoritmo baseado em máxima verossimilhança em sequências nucleotídicas para fins filogenéticos (FELSENSTEIN, 1981), o método tem sido

amplamente utilizado, devido à sua robustez em inferir a árvore correta mesmo quando há violação dos pressupostos utilizados em seus modelos (YANG, 1994). Estudos com simulação de YANG et al. (1994) verificaram que a inferência por ML frequentemente produzia a mesma árvore para um mesmo alinhamento, mesmo sob diferentes modelos evolutivos.

A verossimilhança é definida como a probabilidade condicional de se observar os dados (alinhamento), quando uma hipótese é apresentada (topologia), a partir dos parâmetros fornecidos (modelo evolutivo) (YANG, 2006). Mutações são eventos ao acaso, cuja probabilidade de ocorrência ao longo de um ramo pode ser calculada utilizando os princípios de máxima verossimilhança (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Assim, cada sítio é tratado individualmente, assumindo que sua evolução tenha sido de forma totalmente independente dos demais (YANG, 2006). Para uma única sequência, todo e cada sítio contribui para o cálculo final da função de ML, portanto o método aproveita de fato toda a informação disponível na sequência, dispensando compactações como métodos de distância (NEI; KUMAR, 2000; YANG; RANNALA, 2012).

A ideia principal por trás da inferência por ML é estimar a topologia, os comprimentos de ramos e os parâmetros do modelo evolutivo (*e.g.* taxas de transição/transversão, frequência de bases e variações nas taxas de substituição entre os sítios), que juntos maximizam a probabilidade de se observar as sequências fornecidas no alinhamento. Uma fórmula simplificada do cálculo de verossimilhança seria:

$$L(\text{alinhamento} \mid \text{árvore, modelo evolutivo})$$

Onde L é o valor da verossimilhança para a probabilidade de encontrar o alinhamento condicionada a uma topologia (“árvore”) e os comprimentos de ramos e parâmetros de substituição (“modelo evolutivo”). Os valores encontrados para “árvore” e parâmetros do “modelo evolutivo” que maximizarem o valor de L são tidos como a estimativa da máxima

verossimilhança (*Maximum Likelihood Estimate* – MLE). Isto significa que os valores estimados para topologia, comprimento de ramo e parâmetros de substituição nucleotídica em uma MLE representam a maior probabilidade de se explicar as sequências do alinhamento observado em um contexto evolutivo (FELSENSTEIN, 2004; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; YANG, 2006). Portanto, a árvore que apresentar os valores estimados na MLE é tida como a melhor árvore conhecida de máxima verossimilhança (*Best-Known Likelihood Tree*).

Vale observar que a função de máxima verossimilhança não deve ser confundida com uma probabilidade *per se* (FELSENSTEIN, 2004; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Apesar de ser definida em termos de probabilidade, a função é a probabilidade do evento observado (alinhamento), e não a probabilidade dos parâmetros desconhecidos. Os parâmetros não têm probabilidade porque eles não dependem do acaso mas sim são calculados diretamente a partir do alinhamento (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012).

Maximizar a verossimilhança de uma única árvore, entretanto, não é o maior desafio da reconstrução filogenética por ML. A tarefa mais complexa é encontrar a “melhor árvore”, aquela dentre todas as topologias possíveis que maximiza a verossimilhança global (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). O número de topologias possíveis aumenta astronômicamente ao se inserir mais *taxa*, chegando a superar o número de átomos no universo para meros 50 *taxa* (STAMATAKIS, 2006). Os parâmetros do modelo e os tamanhos de ramo precisam ser calculados para cada árvore e em seguida, a árvore que fornecer a maior verossimilhança é selecionada. Devido ao imenso número de topologias, testar individualmente cada árvore para seu valor de verossimilhança (busca exaustiva) é computacionalmente impossível (IZQUIERDO-CARRASCO; SMITH; STAMATAKIS, 2011; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; STAMATAKIS, 2006). Assim, métodos de busca heurística são utilizados, os quais exploram parcialmente o espaço amostral implementando diferentes estratégias, para sugerir as melhores árvores obtidas em tais buscas (YANG, 2006).

A maior desvantagem da necessidade de usar métodos heurísticos é que não existem formas dos algoritmos de busca garantirem a localização da melhor árvore no enorme espaço de todas as topologias possíveis (YANG, 2006). Como consequência de não explorar completamente o espaço amostral, o algoritmo de busca pode ficar preso nos ótimos locais ou ilhas, que consistem em regiões do espaço de árvores que apresentam valores relativamente altos de verossimilhança, porém não representam o máximo global. Isto se agrava à medida que se acrescentam mais *taxa* à reconstrução (YANG, 2006).

Máxima Verossimilhança no Programa Raxml

Os ótimos locais são uma preocupação fundamental de desenvolvedores de programas para reconstrução filogenética por ML, e atualmente métodos de heurística são extremamente eficientes em lidar bem com as ilhas. O método de heurística mais utilizado é o *Full-Tree Rearrangement*, que consiste na geração de uma árvore inicial (que pode variar de acordo com o programa, no caso do RAxML, a árvore inicial é uma árvore de MP), e um número n de árvores a partir de modificações estruturais na árvore inicial, seguindo um conjunto de regras específico. Para cada árvore modificada a partir da original sua verossimilhança é calculada, e quando o programa não consegue mais identificar melhorias no valor de verossimilhança dentre todas as analisadas, a melhor árvore (aquela com maior valor de verossimilhança) é escolhida. Um programa desenvolvido em 2006, RAxML (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (STAMATAKIS, 2006), emprega uma estratégia de busca onde a probabilidade de ficar preso em ótimos locais foi muito reduzida em relação a programas anteriores.

Até recentemente, os desenvolvedores do RaxML recomendavam realizar múltiplas inferências ou “corridas” independentes com o programa, para garantir que o programa não ficou em um ótimo local muito distante do ótimo global. Certamente, múltiplas inferências consistem

basicamente em testes de topologia, que iniciam a busca pela melhor árvore a partir de diferentes pontos, pois cada corrida gera sua própria árvore inicial, a qual sofrerá rearranjos internos independente das outras corridas. No entanto, recentemente o programa RaxML recebeu implementações ainda mais complexas para lidar com os ótimos locais em árvores muito grandes (muitos *taxa*), utilizando o algoritmo de *rapid bootstrapping* (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008). Nesta implementação, os autores desenvolveram um método extremamente rápido para a tarefa mais árdua nas análises filogenéticas, o bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) e o aliaram a uma eficiente exploração do espaço amostral na busca pela árvore de ML.

O bootstrap é uma técnica padrão para avaliar estabilidade topológica de uma árvore com pequenas alterações dos dados de entrada (alinhamento) (FELSENSTEIN, 1985). Na técnica tradicional de bootstrap, são geradas pseudo-réplicas do alinhamento original a partir da amostragem aleatória com reposição de colunas de sítios, e com isso são criadas novas matrizes do mesmo tamanho (comprimento e número de *taxa*) da original. Em cada matriz réplica algumas colunas do alinhamento podem se repetir e outras sequer serem amostradas, uma vez que a amostragem, além de ser aleatória, repõe as colunas amostradas novamente na matriz original. Assim, enquanto algumas colunas podem constar repetidas vezes em uma réplica, outras podem não fazer parte dela, modificando os dados originais no alinhamento réplica (FELSENSTEIN, 1985). Para cada réplica de alinhamento, uma árvore-réplica é reconstruída sob os mesmos parâmetros fornecidos para a reconstrução filogenética do alinhamento original. A frequência que cada ramo é encontrado nas árvores-réplica é a proporção do bootstrap. Assim, o bootstrap é um indicativo da consistência dos ramos internos para grupamentos filogenéticos. O valor de bootstrap nos ramos mede a repetição dos ramos dentro do conjunto de réplicas construídas, mas é frequentemente interpretada como a confiabilidade dos ramos na árvore de ML (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; YANG, 2006).

No algoritmo de *rapid bootstrapping* (RBS) (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008), os autores conseguiram reduzir em mais de uma ordem de magnitude a demanda computacional e o tempo de performance do bootstrap tradicional. Os autores também desenvolveram uma forma de associar, em uma única análise, os resultados obtidos do RBS à busca pela árvore de ML de uma forma mais rápida e ainda mais otimizada, chamada pelos autores de *fast ML search* (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008). Ambos serão descritos brevemente dada à sua complexidade, e para detalhes, consultar o trabalho original (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008). O funcionamento do algoritmo RBS começa gerando uma árvore inicial a partir do alinhamento original, otimizando-a sob a função de ML. Em seguida, a cada dez árvores-réplica de bootstrap, o algoritmo retorna ao alinhamento original e gera uma nova árvore inicial aleatória e repete o procedimento de otimização até a nona réplica. Este procedimento visa evitar ao máximo que o programa fique preso em ótimos locais. Após otimizar a árvore inicial sob os parâmetros da função ML, esta árvore é usada como árvore inicial da inferência-réplica seguinte, e assim sucessivamente para todas as nove réplicas. Assim, o intervalo de nove réplicas entre uma nova árvore inicial e a próxima é otimizado em série. As otimizações das árvores-réplica são sequenciais, ou seja, a primeira árvore otimizada sob ML serve como árvore inicial para otimização da segunda réplica ML, e assim sucessivamente até a nona réplica, onde o programa retorna novamente ao alinhamento original e gera uma nova árvore inicial. O procedimento se repete até satisfazer o número de réplicas indicado pelo usuário para a análise de RBS na linha de comando do programa.

Por fim, como mencionado, o algoritmo RBS pode ser combinado com uma inferência de ML em uma única análise através de uma linha de comando específica (ver manual RaxML, 2006). O método chamado *rapid* ou *accelerated ML search* (STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008) é feito após todo o procedimento de RBS descrito acima, e se diz *accelerated* porque sua busca é orientada a partir das árvores já otimizadas pelo procedimento

anterior, reduzindo o tempo de busca em relação às análises tradicionais que começam do zero.

Assim, o novo algoritmo proposto por Stamatakis e colaboradores (2008) permite uma inferência filogenética em um tempo computável para alinhamentos como o deste trabalho, e por isso foi escolhido. O método de RBS, em suma, faz múltiplas buscas a partir de diferentes pontos em uma única corrida, retornando a cada dez réplicas ao alinhamento original e gerando uma nova árvore inicial. A cada nova árvore gerada, as nove réplicas seguintes são consecutivamente otimizadas, e em seguida, o processo de busca pela melhor árvore se inicia a partir das árvores obtidas do RBS. Este procedimento acrescenta uma etapa adicional de robustez na inferência, pois a otimização da árvore final é baseada em inferências otimizadas do alinhamento na forma de réplicas de bootstrap.

Portanto, o algoritmo do RAxML é veloz, diminuindo do tempo computacional da busca heurística e ao mesmo tempo mantendo extrema eficiência em obter árvores bem resolvidas. O RAxML é capaz de encontrar melhores árvores com menor consumo de memória e redução do tempo computacional (Stamatakis, 2006), e sua heurística explora uma fração maior do espaço amostral em relação a outros programas. Isso permite uma inferência filogenética robusta mesmo com grandes quantidades de terminais taxonômicos (STAMATAKIS, 2006; STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008).

Ao utilizar a abordagem de ML como método de reconstrução filogenética, um modelo do processo evolutivo que explique as diferenças entre as sequências observadas deve ser especificado. Como dito anteriormente, a inferência por ML calcula a probabilidade de o modelo evolutivo escolhido ter gerado as sequências nucleotídicas observadas em uma determinada topologia; e a filogenia de máxima verossimilhança é aquela cuja probabilidade final destes cálculos é a maior dado o alinhamento (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Com efeito, a escolha do modelo evolutivo é de grande impacto na inferência por ML.

Modelos evolutivos são um conjunto de pressupostos acerca do processo de substituição nucleotídica nas sequências (NEI; KUMAR, 2000; YANG, 2006). Eles irão descrever as diferentes probabilidades de mudança de um nucleotídeo para outro ao longo da filogenia, permitindo testar diferentes hipóteses para explicar os dados observados e escolher a melhor delas. De uma maneira geral, modelos mais complexos se adequarão melhor aos dados do que os mais simples, pois quanto mais complexo, maior é o número de parâmetros a serem inferidos pelo modelo (NEI; KUMAR, 2000). Entretanto, um alto número de parâmetros não somente torna a inferência computacionalmente difícil, mas também aumenta o erro (variância) para cada parâmetro (NEI; KUMAR, 2000). Isto é particularmente problemático para métodos de distância, que por comprimirem muito a informação filogenética em simples valores de distância média entre sequências, são incapazes de detectar mudanças mais sutis que aquelas sequências podem ter sofrido ao longo do tempo, como diferenças nas taxas de transcrição e transversão e reversões (YANG, 2006; YANG; RANNALA, 2012).

Métodos de ML são capazes de lidar bem com as limitações impostas em modelos baseados em distância, e apresentam baixa sensibilidade à variância gerada para muitos parâmetros (NEI; KUMAR, 2000). Na verdade, é recomendado que métodos atuais de ML utilizem modelos complexos, especialmente para grandes conjuntos de dados onde a divergência genética entre as espécies tende a ser alta (YANG, 2006; YANG; RANNALA, 2012). Esta é a razão pela qual os desenvolvedores do RAxML disponibilizam somente o modelo mais paramétrico existente, o *General Time Reversible* (GTR) (LANAVE et al., 1984). No GTR, um total de oito parâmetros (seis possibilidades de mudança de uma base em outra; frequência de bases diferente de 1 e diferenças entre transições de transversões) são estimados a partir do alinhamento e não apresentam restrições (como uma proporção fixa de nucleotídeos), por isso todos os parâmetros são chamados livres (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). O GTR estima diferentes probabilidades de transições e transversões, diferentes frequências nucleotídicas e

seis taxas distintas de substituição (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012).

Um fenômeno bem-estabelecido em evolução molecular é que a taxa de substituição pode variar não somente entre sequências (computado pelo modelo evolutivo *per se*), mas também entre os sítios de uma mesma sequência (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; YANG, 2006). Diferentes regiões de um mesmo gene ou posições de um códon podem apresentar taxas distintas de substituição, o que pode ser explicado pela presença de diferentes forças evolutivas para os sítios em questão (STAMATAKIS, 2006; YANG, 1994). Uma abordagem comum para considerar a heterogeneidade de taxas entre sítios é utilizar a distribuição gamma (YANG, 1994), categorizando as diferentes taxas de substituição estimadas no alinhamento e associando os sítios às respectivas taxas. Entretanto, assim como no bootstrap, calcular a distribuição gamma para todos os sítios é extremamente árduo e complexo, e impossível de ser computado com mais de quatro categorias em grandes alinhamentos (STAMATAKIS, 2006). No RAxML esta limitação é claramente expressa pelos autores, que alertam no próprio manual do programa ser impossível de modificar o número de categorias gamma pelo usuário (STAMATAKIS, 2006; 2006).

Para contornar as limitações no número de categorias, porém estimar maiores categorias de heterogeneidade de sítios, os desenvolvedores do RAxML propuseram a aproximação CAT (STAMATAKIS, 2006). CAT é chamado aproximação ao invés de modelo, pois ela depende em última análise do modelo gamma. A ideia básica de CAT é acomodar a heterogeneidade de taxas durante a busca pela árvore ML, navegando rapidamente pelo espaço topológico somente onde as árvores apresentam altos valores otimizados pela função gamma (STAMATAKIS, 2006; STAMATAKIS; HOOVER; ROUGEMONT, 2008). Alexandros Stamatakis, ao publicar a aproximação CAT (STAMATAKIS, 2006), fez rigorosos testes com simulações para verificar o quão confiável era a inferência da heterogeneidade das taxas entre CAT e gamma, e concluiu que as árvores CAT não somente eram equivalentes à inferência gamma, mas que

frequentemente geravam valores de verossimilhança maiores em grandes alinhamentos. É necessário enfatizar que as árvores obtidas por CAT e gamma não são comparáveis a não ser que a função $-z$ implementada no RAxML seja utilizada (IZQUIERDO-CARRASCO; SMITH; STAMATAKIS, 2011). Isto se dá pois quanto mais categorias, mais parâmetros são estimados e consequentemente maior é a verossimilhança, e essa função corrige os valores CAT-gamma para devidas comparações. Portanto, a aproximação CAT é fortemente recomendada para inferências com conjuntos de dados com mais de 1.000 *taxa*, e portanto foi adotado neste estudo (IZQUIERDO-CARRASCO; SMITH; STAMATAKIS, 2011; STAMATAKIS, 2006).

A escolha das abordagens para a reconstrução filogenética, como programa, modelo e tipo de bootstrap, foi primariamente favorecida por fornecerem atualmente o ambiente computacional ideal para grandes alinhamentos. No entanto, mesmo com argumentos sólidos e teóricos de base para utilizar estes métodos, fiz um teste final para verificar estatisticamente o melhor modelo para o presente alinhamento, além de também testar possíveis esquemas de partição e os melhores modelos para cada esquema. Partições são ocasionalmente necessárias caso haja uma diferença exorbitante entre as taxas evolutivas dos diferentes genes ou sítios no alinhamento. Porém, partições não devem ser feitas indiscriminadamente por aumentarem em demasia o número de parâmetros a serem estimados (cada partição precisará ter todos os parâmetros GTR estimados, por exemplo), o que por sua vez aumenta de forma desnecessária a demanda computacional. Frequentemente esquemas excessivos de partição fornecem estimativas piores caso o alinhamento não as requeira (LANFEAR et al., 2012). O programa PartitionFinder 1.0.1 (LANFEAR et al., 2012) foi utilizado para verificar os possíveis esquemas de partição. O PartitionFinder não possui uma versão capaz de lidar com todo conjunto de dados deste trabalho, assim como os programas para inferência do tempo de divergência (ver adiante). Logo, tanto para verificar esquemas de partição quanto para a datação molecular, um

alinhamento reduzido foi construído para tornar possíveis estas análises (ver adiante para critérios adotados para a redução).

O melhor esquema de partição foi identificado pelo critério de informação bayesiana (*Bayesian Information Criterion - BIC*), pois é capaz de acomodar a incerteza na estimativa dos parâmetros (SULLIVAN; JOYCE, 2005). Além disso, o algoritmo evita a super-parametrização, penalizando o ajuste excessivo do modelo aos dados (RANNALA, 2002), sendo portanto o método mais conservador para selecionar modelos evolutivos e a necessidade de se particionar o alinhamento (SULLIVAN; JOYCE, 2005). O PartitionFinder rejeitou partições adicionais ao alinhamento, estimando o melhor modelo para toda a matriz em GTR+GAMMA com sítios invariáveis, uma categoria de heterogeneidade que aloca aqueles sítios com probabilidade nula de terem sofrido qualquer substituição. Como isto é muito improvável, especialmente para grandes sequências e um grande número de *taxa* (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; YANG, 2006), preferi adotar neste trabalho o aumento das categorias possíveis de heterogeneidade a assumir probabilidades nulas de substituição.

Todas as análises filogenéticas foram feitas no servidor online CIPRES Science Gateway (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2012). Para inferência da topologia sob ML foi usada a versão 7.3.2 do programa RaxML-HPC (STAMATAKIS, 2006).

Refinamento Amostral para a Análise Final de Máxima Verossimilhança

Em toda análise filogenética que se baseie em sequências de diferentes comprimentos, é comum que a proporção de sítios informativos entre as sequências mais longas e as mais curtas seja muito grande (WIENS, 2003; 2005). Com esta desproporção, as sequências mais curtas acabam por não fornecer sinal filogenético suficiente, gerando o fenômeno conhecido como *rogue taxa* (ou taxa “desonestos”) (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013; ABERER;

STAMATAKIS, 2011). *Rogue taxa* (“*rogues*”) são aqueles terminais da árvore cujas sequências são muito curtas ou pouco informativas (WILKINSON, 1996), e frequentemente se inserem em pontos aleatórios na árvore a cada reconstrução.

Isto é particularmente problemático quando se deseja inferir quais ramos são bem suportados na análise. *Rogues*, por assumirem posições variadas em cada reconstrução, podem resultar em topologias conflitantes entre diferentes réplicas de bootstrap, o que em última análise gera uma árvore-consenso de baixa resolução (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013). *Rogues* são responsáveis por reduções, frequentemente drásticas, nos valores de suporte de ramo, sendo particularmente perigosas quando a reconstrução filogenética se baseia nas próprias réplicas de bootstrap, como é o caso do RBS+ *fast ML search* (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013).

Com grandes alinhamentos, os efeitos de *rogues* são mais frequentes, e atualmente algoritmos são capazes de identificar as sequências redutoras dos valores de suporte, permitindo uma resolução maior para a árvore filogenética como um todo (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013). O algoritmo RogueNaRok, disponível no servidor online <http://exelixis-lab.org/roguenarok.html> (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013), é capaz de identificar os *rogues* a partir da árvore de ML e do conjunto de réplicas de bootstrap obtidos no RAxML. Cada taxon recebe então um valor numérico, que age como um índice qualitativo que define “o quão *rogue* é determinado taxon”. Na verdade, este índice mostra o quanto melhoraria a resolução geral da árvore e dos valores de bootstrap se aquele taxon fosse removido (ABERER; KROMPASS; STAMATAKIS, 2013). O limite (*threshold*) para considerar um taxon como *rogue* depende da perspectiva do pesquisador (Aberer, comunicação pessoal). Ou seja, o RogueNaRok identifica os potenciais *rogues* presentes na análise, cabendo ao pesquisador estabelecer o valor de corte para considerar um taxon como um *rogue* de fato. Isto

é uma vantagem do método de identificação e remoção de *rogues*, pois permite definir o tamanho amostral taxonômico de acordo com o objetivo da análise.

Como a intenção deste trabalho é apresentar a maior filogenia de Passeriformes em nível de gêneros até momento, optei por manter a maior diversidade possível, estabelecendo um valor de corte conservador de 0,5. O usuário também pode fazer o programa ignorar *taxa* em particular na identificação de *rogue*, forçando sua presença na árvore. Dezesesseis *taxa*, Passeriformes *incertae sedis* (GILL; DONSKER, 2012), constaram na lista de “ignored” no RogueNaRok com intuito de tentar resolver sua posição filogenética. Um total de 58 *taxa* foram removidos do alinhamento original, restando 1061 gêneros.

Este alinhamento foi rodado no RAxML sob exatamente os mesmos parâmetros usados para o primeiro alinhamento (1119 gêneros), exibindo uma topologia praticamente idêntica. Como o aumento nos valores de bootstrap foi notável por toda a árvore, o alinhamento de 1061 *taxa* (*rogues* excluídos) foi o utilizado para gerar a árvore filogenética final deste trabalho, sumariada na Figura 1. De forma a fornecer uma noção detalhada da composição das famílias, todos os gêneros-tipo estiveram presentes. A única exceção foi a exclusão do gênero tipo da família Cotingidae (Tyrannides, Suboscines), para a qual o gênero *Cotinga* foi identificado como *rogue*. Na topologia primária, porém, *Cotinga* se inseriu dentro de Cotingidae, não afetando seu monofiletismo de forma alguma quando removido.

Datação Molecular

Um Breve Histórico do Relógio Molecular

Na década de 1960, a descoberta de que proteínas (e posteriormente, moléculas de DNA) apresentavam uma taxa constante de substituição ao longo do tempo iniciou um novo paradigma em biologia evolutiva (KUMAR, 2005). A teoria do relógio molecular (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965) mostrou que era possível estimar o tempo de divergência entre os diferentes ramos na filogenia, e em consequência, identificar quando as linhagens divergiram a partir de um ancestral na escala geológica. Atualmente a teoria do relógio molecular é um dos principais pilares que sustentam toda a área de evolução molecular (HO; PHILLIPS, 2009; KUMAR, 2005).

No entanto, algumas décadas depois da grande descoberta do relógio em 1965, diferentes autores começaram a se questionar sobre o caráter estrito do relógio proposto por Zuckerkandl e Pauling. No início da década de 1990, estudos começavam a evidenciar que as taxas de substituição poderiam não ser verdadeiramente constantes, como foi originalmente proposto, mas sim variavam consideravelmente entre as linhagens e entre diferentes marcadores (KUMAR, 2005). O termo “relógio molecular relaxado” foi cunhado por volta desta época, para descaracterizar o aspecto estrito da abordagem, pois até então todas as análises baseadas na teoria do relógio molecular só permitiam o uso de marcadores que apresentavam uma taxa de mutação constante (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Portanto todos os marcadores precisavam passar por testes de taxa relativa ou testes de verossimilhança relativa (*likelihood ratio test*) (FELSENSTEIN, 1981; 1985), que estimavam o quanto as sequências se adequavam ao modelo de relógio estrito. Somente era possível estimar os tempos de divergência com os marcadores que passavam nos testes de verossimilhança relativa,

comportando-se como um verdadeiro “relógio”, sofrendo mutações a intervalos regulares no tempo e proporcionais à distância filogenética dos organismos analisados (KUMAR, 2005; NEI; KUMAR, 2000; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012). Dessa forma, poucos marcadores se encontravam disponíveis para as datações moleculares, e cada marcador só podia ser analisado individualmente, pois já havia fortes evidências de que cada marcador possuía um relógio próprio (KUMAR, 2005; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; YANG, 2006). Os testes de consistência de taxas (FELSENSTEIN, 1985), além de verificar se as sequências se encaixavam no modelo de mutações regulares, calculavam também esta própria taxa. (KUMAR, 2005). Esta taxa geral do alinhamento era utilizada para calibrar as datações com o relógio estrito, representando o número de diferenças esperadas por unidade de tempo (HEDGES et al., 1996; SIBLEY; AHLQUIST, 1990). A calibração é um pressuposto fundamental na reoria do relógio, pois informava de quanto em quanto tempo as sequências sofriam mutações esperadas pela sua *taxa relativa*. Posteriormente, métodos relaxadores do relógio molecular foram essenciais para acomodar as diferentes taxas de mutação ao longo da evolução de genes e linhagens, o que permitiu o uso de múltiplos loci e um maior tamanho amostral taxonômico nas inferências de tempo de divergência (KUMAR, 2005; NEI; KUMAR, 2000). Além disso, com esses métodos foi possível calibrar o relógio molecular em uma escala temporal absoluta e não dependente de taxa relativa, fixando a data de um ou mais nós na filogenia com base nas informações geológicas (geralmente fósseis) (YANG; RANNALA, 2006; YANG; YODER, 2003).

As primeiras formas propostas para relaxar o relógio representaram, na verdade, formas de reduzir o caráter estrito do relógio global de Zuckerkandl e Pauling (1965), pois somente nas abordagens bayesianas o relógio molecular foi de fato “relaxado” por algoritmos específicos (KUMAR, 2005; SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; THORNE; KISHINO; PAINTER, 1998). Os primeiros relógios relaxados, portanto, mais reduziram o rigor do relógio estrito do que propriamente o relaxaram. Tais métodos foram de extrema importância para a ascensão

das análises bayesianas com o mesmo propósito (KUMAR, 2005; YANG, 2006). O relógio molecular local (RAMBAUT; BROMHAM, 1998; YODER; YANG, 2000) permitia a existência de diferentes taxas para os ramos, porém ainda assumia que as taxas permaneciam constantes ao longo do ramo. O método de verossimilhança penalizada foi inspirado no relógio local, porém avaliava explicitamente através de uma função de verossimilhança as possíveis taxas entre os ramos, mantendo taxas semelhantes para ramos mais próximos e vice-versa (SANDERSON, 1997; 2002). Os relógios locais e a verossimilhança penalizada foram os grandes representantes da primeira geração de relógio molecular relaxado (HO, 2009).

Em seguida, a abordagem bayesiana permitiu relaxar de fato os pressupostos do relógio molecular (THORNE; KISHINO; PAINTER, 1998). Duas principais abordagens existem atualmente. A primeira, o relógio auto-correlacionado (THORNE; KISHINO, 2005; THORNE; KISHINO; PAINTER, 1998) possibilitou pela primeira vez incorporar a variação das taxas ao longo do tempo em um ramo, porém estas taxas estariam necessariamente relacionadas à taxa do ramo ancestral. A segunda abordagem consiste no relógio não correlacionado (DRUMMOND et al., 2006), que como o nome indica, não assume nenhum tipo de correlação entre o ramo ancestral e o descendente. Neste modelo de relógio relaxado, as taxas de substituição variam livremente para cada ramo seguindo uma distribuição probabilística subjacente (*e.g.* funções normal, lognormal, ou gamma).

O segundo importante avanço trazido com o relógio molecular relaxado foi a possibilidade do uso de calibrações temporais em vez de calibrações por taxa de evolução (KUMAR, 2005). Logo os primeiros métodos de relógio molecular relaxado permitiam calibrar a inferência temporal com datas geológicas para um ou mais nós da filogenia, tipicamente através do registro fóssil. Os comprimentos de ramos estimados a partir das sequências eram então convertidos em tempo geológico, permitindo inferir a idade absoluta das linhagens (SANDERSON, 1997; YANG; RANNALA, 2006). Assim, era possível estimar os tempos de

divergência em uma filogenia usando não somente múltiplos *loci* com diferentes taxas evolutivas, mas também fornecer uma escala temporal absoluta *a priori* para estimar os comprimentos de ramos relativos ao tempo geológico.

As abordagens bayesianas novamente forneceram outro avanço quanto às calibrações temporais, pois são capazes de incorporar *a priori* a incerteza temporal das datas de fósseis e eventos geológicos na análise, através de *bounds*, ou limites para idades mínima e máxima de um fóssil (YANG; RANNALA, 2006; YANG; YODER, 2003). A incorporação *a priori* da informação é explicitada nas análises bayesianas como uma distribuição probabilística adjacente ao parâmetro a ser estimado (*e.g.* data de um nó utilizando um ponto de calibração). Essa incorporação *a priori* da informação é comumente chamada de *prior*, e os *priors* podem ser explorados com diversas abordagens estatísticas (HO, 2009; PARHAM et al., 2012; YANG; RANNALA, 2006). Os *priors* são ideais para calibrações fósseis, pois permitem acomodar diferentes densidades de probabilidade para um determinado parâmetro. Por exemplo, para um determinado fóssil de 15 Ma pode-se associar um *prior* para esta data com uma distribuição probabilística em particular. Essa distribuição pode ser explicitada, por exemplo, numa curva normal, onde há um intervalo de confiança em torno da idade média do fóssil. Os valores próximos à média apresentariam maior probabilidade de serem a idade do nó em particular, enquanto os valores mais distantes da média apresentariam probabilidades menores, porém não-nulas (Figura 4).

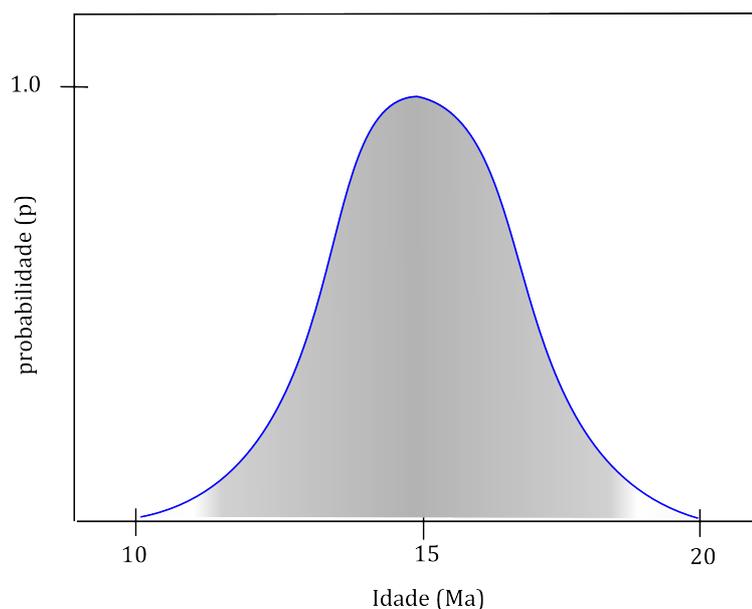


Figura 4: Distribuição probabilística do tipo Normal, gerada para acomodar a informação *a priori* (*prior*) sobre a incerteza da data de uma calibração fóssil em um nó em particular (exemplo do texto). Neste tipo de distribuição, os valores com maior probabilidade da data correta do determinado fóssil se distribuem ao redor da data média (15 Ma), e os valores mais distantes têm menores probabilidades. A vantagem dessa distribuição para fósseis, além de acomodar uma densidade probabilística para a idade correta, permite estabelecer limites (*bounds*) não-nulos tanto para mais quanto para menos em relação à idade fornecida. Isto permite que o programa de inferência não se restrinja exclusivamente na área fornecida para o *prior*, mas vasculhe valores mais verossímeis mais jovens ou mais antigos para a data do nó em questão, caso os valores fornecidos para o *prior* sejam sub-ótimos nos cálculos realizados pelo programa. A área cinza indica a densidade da distribuição para os valores com 95% de confiança.

Calibrações Fósseis

O registro fóssil em Aves é reconhecidamente fraco em fornecer detalhes acerca da evolução geral do grupo, por ser extremamente raro e fragmentado (CRACRAFT, 1973; VAN TUINEN; HEDGES, 2001). O esqueleto pneumático dificulta o processo de fossilização quando comparados aos ossos densos de mamíferos. Em Passeriformes esta dificuldade se acentua ainda mais, pois os membros da ordem são em geral muito pequenos e sempre foram majoritariamente associados a florestas, onde a fossilização é ainda mais rara (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003; MAYR, 1958). No entanto, nas últimas décadas publicações com fósseis de vários grupos de aves, inclusive Passeriformes, têm formado um acervo notável e extremamente útil para utilização dessa informação em análises de datação molecular.

A escolha de fósseis como ponto de calibração requer muita atenção do pesquisador. Tais escolhas precisam seguir um conjunto de critérios para avaliar não somente a data e a posição do fóssil na filogenia, mas também são fundamentais para determinar a forma e a densidade do *prior* na calibração (PARHAM et al., 2012). Estes autores propuseram uma forma extremamente criteriosa para a validação de fósseis para seu uso como calibrações em datações moleculares, sugerindo uma abordagem baseada em espécimes para justificar pontos de calibração baseados em dados paleontológicos (PARHAM et al., 2012).

As principais preocupações de PARHAM et al. (2012) foram levadas em consideração na presente dissertação: 1) número de acesso do espécime depositado em coleção de museu; 2) descrição suficientemente detalhada dos caracteres relevantes para o taxon; 3) uma diagnose baseada em alguma apomorfia para o grupo associado ao fóssil ou uma análise filogenética explícita; 4) descrição geográfica e geológica detalhadas de onde o fóssil foi encontrado e 5) uma referência explícita à data do fóssil e ao método com que ela foi obtida (datação de radioisótopos por exemplo). Certamente nem todas as descrições de fósseis anteriores ao estudo de PARHAM et al. (2012) se preocuparam em fornecer todos os detalhes propostos, ou mesmo o próprio fóssil descrito impõe limitações para o aprofundamento da descrição ou associação sistemática refinada. Ainda sim, todos os fósseis utilizados nesta análise satisfaziam todos ou grande quantidade dos requisitos, resumidos na Tabela 2.

A partir destes critérios, foi possível reunir um total de 16 calibrações fósseis internas a Passeriformes, representando todos os grandes grupos da ordem, incluindo Suboscines (BALLMANN, 1969) e todas as grandes linhagens Oscines como Menuræ (BOLES, 1995), Meliphagoidea (BOLES, 2005), Corvoidea, Sylvioidea, Muscicapoidea e Passeroidea (JENŌ; JÁNOS, 2012) (ver Figura 6). As datas descritas nos artigos originais foram todas padronizadas a partir da Geologic Time Scale 2012 (GRADSTEIN et al., 2012). Algumas descrições fósseis, em especial as mais antigas, não forneciam datas numéricas, mas sim o período geológico (*e.g.*

Mioceno). A partir desses períodos, as datas medianas foram padronizadas para tais calibrações.

Tabela 1: Síntese das informações obtidas para cada fóssil utilizado como ponto de calibração para os cálculos do tempo de divergência em Passeriformes. A seleção dos fósseis seguiu os critérios do método baseado em espécimes sugerido por Parham et al., 2012 (ver texto). As informações são organizadas por colunas, especificando exatamente o nó calibrado; onde se insere o nó em termos de grandes grupos de Passeriformes; os limites (em milhões de anos) usados para a data do fóssil, representando os limites mínimo e máximo da calibração (curva normal); uma breve descrição do fragmento diagnóstico do fóssil, que permitiu sua associação com confiança ao clado datado; número do espécime registrado em seu respectivo Museu; localidade-tipo de onde o fóssil foi extraído e a publicação original com a descrição do fóssil. Quando o clado irmão do fóssil incluía muitas espécies sem um nome formal, somente um nome foi registrado para aquele nó (e.g. o fóssil de Meliphagidae calibra um nó cujo grupo irmão inclui todos os Oscines menos duas linhagens, e o fóssil Emberiza se encontra no meio da diversidade de Passeroidea). Quando havia mais de um fóssil para um mesmo gênero no trabalho de Jenó e Janos (2012), foi dada preferência ao fóssil mais antigo. O asterisco indica o nó de maior interesse deste estudo, e nas análises finais foi completamente excluído para verificar se a primeira divergência em Passeriformes ocorreu no Cretáceo ou no Paleógeno (para maiores detalhes, ver Introdução).

Divergência	Clado inclusivo	Limites (<i>bounds</i>) das datas inferiores e superiores (Ma)	Espécime Fóssil (descrição original)	Número de Registro em Museu	Localidade-tipo	Referências
Acanthisittia-Eupasserres *	Primeira divergência em Passeriformes entre Acanthisittia e demais Passeriformes	55-52	Passeriformes gen. sp. indet carpometacarpus et tibiotarsus	QM F20688, QM F24685	Murgon - Queensland - Australia	Boles 1995a, 1997, Worthy 2010
Eurylaimidae-Pittidae	Suboscines do Velho Mundo	20-16.9	Eurylaimidae gen. sp. indet tarsometatarsus, humerus et ulna	Wi-We II (1937) 18189, 18188, 18191	Wintershof (West) - Bavaria	Ballman 1969
<i>Atrichornis-Menura</i>	Menurae - Oscines Basais	23-16	<i>Menura tyawanoides</i> metacarpus	QM F.20887 (AR 11466)	Riversleigh - Queensland - Australia	Boles 1995b
Meliphagidae	Meliphagoidea - Oscines Basais	16-7	Meliphagidae gen. sp. indet	QM F24684	Riversleigh - Queensland - Australia	Boles 2005
<i>Galerida-Alauda</i>	Alaudidae - Sylvioidea	23-15.97	<i>Galerida cserhatensis</i> tibiotarsus, ulna	Litke 2, P 2010.5/1		
<i>Anthus-Macronyx</i>	Motacillidae - Núcleo Passeroidea	15.97-11.63	<i>Anthus antecedens</i> phalanga alae	Felsőtárkány, P 2006.352/1		
<i>Cinclus</i> -(Turdidae,Muscicapidae)	Núcleo Muscicapoides	23-15.97	<i>Cinclus major</i> carpometacarpus	Litke 2, P 2010.6		
<i>Muscicapa</i>	Muscicapidae - Núcleo Muscicapoides	15.97-11.63	<i>Muscicapa leganyii</i> coracoid	Felsőtárkány–Felnémet 2/3, P 2010.23		
<i>Erithacus-Aethe</i>	Muscicapidae - Núcleo Muscicapoides	15.97-11.63	<i>Erithacus horusitzkyi</i> ulna	Mátraszőlős 1, P 2008.335/1		
<i>Luscinia-Brachypteryx</i>	Muscicapidae - Núcleo Muscicapoides	23-15.97	<i>Luscinia praeluscinia</i> coracoid	Litke 2, P 2010.8.		
<i>Certhia-Tichodroma</i>	Certhioidea - Núcleo Muscicapoides	11.63-5.33	<i>Certhia janossyi</i> coracoid	Rudabánya 2, MÁFI V. 11.130.1; V. 29205	North Hungary	Jenó & Janos 2012
<i>Phylloscopus-Seicercus</i>	Phylloscopidae - Sylvioidea	15.97-11.63	<i>Phylloscopus miocaenicus</i> phalanga alae	Felsőtárkány, P 2006.352.2		
<i>Lanius-Corvinella</i>	Laniidae - Corvoidea	15.97-11.63	<i>Lanius schreteri</i> scapula	Felsőtárkány–Felnémet, P 2010.30		
<i>Bombycilla</i>	Bombycilloidea - Muscicapoides	23-15.97	<i>Bombycilla hamori</i> tibiotarsus	Litke 2, P 2010.9/1		
<i>Sturnus</i>	Sturnidae - Núcleo Muscicapoides	11.63-5.33	<i>Sturnus kretzoi</i> carpometacarpus	Rudabánya 2, MÁFI V. 11.131.1; V. 29206		
<i>Emberiza</i>	Emberizidae - Núcleo Passeroidea	23-15.97	<i>Emberiza bartkoi</i> humerus	Litke 2, P 2010.11/1		

Inferência dos Tempos de Divergência com o Programa BEAST

Como dito anteriormente, a ideia básica da abordagem bayesiana é a distribuição da probabilidade dos parâmetros, incorporando a incerteza acerca de seus possíveis valores (YANG, 2006). Esta distribuição *a priori* dos parâmetros a serem estimados é chamada *prior distribution*, e é obtida a partir da avaliação objetiva de evidências prévias ou pela opinião subjetiva do pesquisador (YANG, 2006).

A inferência bayesiana é na verdade uma modificação da função de verossimilhança, sendo igualmente dependente da amostra (alinhamento) (SALEMI; VANDAMME; LEMEY, 2012; YANG, 2006). Depois de fornecida a distribuição do *prior*, o algoritmo calcula a distribuição posterior do parâmetro condicionada ao alinhamento (YANG, 2006). Todas as inferências relativas ao parâmetro são baseadas na distribuição posterior (YANG, 2006).

Neste trabalho, utilizei a inferência pelo relógio molecular relaxado não correlacionado com o algoritmo implementado no programa BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees*) (DRUMMOND et al., 2006; 2012), que utiliza uma integração MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) para inferir tanto a topologia quanto o tempo de divergência em filogenias. No caso deste estudo, a topologia foi estimada a partir de um alinhamento reduzido no RAxML e fixada como árvore inicial para o BEAST, para que o programa estimasse somente o comprimento dos ramos e sua idade absoluta. Como comentado anteriormente, este procedimento foi necessário devido às limitações dos programas atuais de inferência bayesiana, pois devido aos problemas de mixagem e convergência das cadeias MCMC (YANG; RANNALA, 2012), os programas atuais não apresentam uma boa performance em inferências filogenéticas de grandes *taxa*, gerando resultados pouco confiáveis (REIS; YANG, 2011; YANG; RANNALA, 2012). Para de fato testar este pressuposto, tentei rodar o alinhamento completo para datação em dois programas muito usados em inferência bayesiana, BEAST (DRUMMOND

et al., 2012) e MCMCTREE (YANG, 2007). Ambos os programas falharam em convergir suas análises, comprovando a necessidade de reduzir o alinhamento para uma datação molecular confiável.

A redução do alinhamento consistiu em incluir somente de duas a três das maiores sequências por família monofilética. Em famílias não recuperadas como clados, inclui também os gêneros responsáveis por violar o monofiletismo das famílias (árvore final, 1.061 gêneros). Além disso inclui também o primeiro nó de um clado endêmico do Novo Mundo, possibilitando inferir de forma mais precisa a data do início da diversificação daquele clado no continente. Todos os gêneros *incertae sedis* também foram mantidos para manter a topologia o mais próximo possível da original. O alinhamento para a datação molecular compreendeu 329 gêneros, e todas as 122 famílias presentes no alinhamento original estiveram presentes na versão reduzida. A topologia foi estimada no RAxML com os mesmos parâmetros usados no alinhamentos completos, apresentando mínimas diferenças topológicas quando comparada com a árvore de 1119 e 1061 gêneros, e tais diferenças serão comentadas ao longo do texto quando necessário.

Baseado nas justificativas acima, análises de tempo de divergência foram inferidas no programa BEAST 1.7.4 (DRUMMOND et al., 2012) com o alinhamento reduzido no servidor CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2012). O BEAST na verdade é um pacote de programas interdependentes que realizam diferentes etapas da reconstrução filogenética/temporal, onde o arquivo de saída de um programa é usado como entrada de outro. Fazem parte do pacote BEAST programas como BEAUTi, Tracer e TreeAnnotator, e serão explicados em cada etapa em que foram utilizados.

Análises no BEAST requerem como entrada um arquivo *.xml* gerado na interface BEAUTi 1.7.4 (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*) (DRUMMOND et al., 2012). O arquivo *.xml* gerado pelo BEAUTi contém todas as informações necessárias para as inferências, desde o

alinhamento, a árvore inicial (ou, no caso deste estudo, a topologia fixada para estimativa somente do tempo de divergência) e a distribuição probabilística dos *priors*.

Após inserir o arquivo *.xml* como entrada no BEAST, os parâmetros para a análise de datação foram especificados neste. A opção para o tipo de relógio foi “relógio molecular relaxado não correlacionado log-normal” (*Uncorrelated Lognormal clock*). O modelo de substituição nucleotídica selecionado foi GTR+ Γ (com 5 categorias). O *prior* escolhido para a árvore foi o modelo de especiação seguindo o processo de Yule (*Speciation: Yule Process*) (GERNHARD, 2008). Este *prior* assume uma taxa de especiação constante por linhagem, e seu único parâmetro, o “yule.birthRate”, representa a taxa média do nascimento de uma linhagem (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007)

Os outros *priors* utilizados foram para as calibrações fósseis dos nós e da raiz (Tabela 2). Estes *priors* seguiram uma distribuição normal (Figura 4), pois como mencionado, este tipo de curva permite a incorporação da incerteza dos dados de forma mais conservadora, podendo variar tanto para mais quanto para menos em relação à média (HO; PHILLIPS, 2009). Para todas as distribuições destes *priors*, a média da curva normal foi um cálculo simples da média entre a data mínima e máxima do fóssil (Tabela 2).

O *prior* configurado para a primeira calibração foi referente à raiz da árvore, incluindo Passeriformes e seu grupo irmão Psittaciformes (clado Psittacopasserae) (SUH et al., 2011; WANG; BRAUN; KIMBALL, 2012). A densidade para a calibração deste nó teve uma média de 82 Ma (WRIGHT et al., 2008) com um desvio padrão de 2 Ma. Em seguida, foi configurado o *prior* da primeira divergência de Passeriformes, que tem sua idade mínima sustentada pelo fóssil mais antigo da ordem, achado nos depósitos australianos do início do Eoceno (55 Ma) (BOLES, 1995; 1997). Adicionalmente, 15 fósseis, grande parte descrita na última década, fornecem uma oportunidade inédita de se utilizar múltiplos pontos de calibração na datação de Passeriformes (Tabela 2). A densidade da curva normal para estes 15 outros *priors* foi

calculada com a média entre as datas mínima e máxima obtidas na Tabela 2 e um desvio padrão variando entre um e dois milhões de anos, de forma a acomodar o intervalo de 95% de credibilidade para cada caso.

Como um dos principais objetivos deste trabalho foi testar a data da primeira divergência de Passeriformes viventes, foram rodadas duas análises independentes no BEAST, uma contendo a calibração Acanthisittia-Eupasseres e outra sem nenhum *prior* para este nó. Desta forma, os parâmetros puderam variar livremente, funcionando como um teste de validação da calibração do nó de interesse. As diferentes corridas do BEAST não geraram datas com mais de 6 Ma de diferença. A separação de Acanthisittia de Eupasseres foi inferida em 54 Ma com o nó calibrado e 60 Ma sem o *prior* para o nó, ou seja, a origem do grupo no Paleoceno foi recuperada mesmo sem nenhuma restrição *a priori*. Portanto, com o objetivo de discutir a origem da ordem de forma mais conservadora, as datas obtidas na análise sem a calibração para o nó Acanthisittia-Eupasseres foram utilizadas como finais para este estudo (Tabela 3).

Cinco cadeias MCMC foram rodadas no servidor CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2012) para cada uma das duas análises, com e sem a calibração. Para cada uma das duas corridas foram rodadas 140×10^6 gerações, amostrando a cada intervalo de 1000 gerações. O período de *burn-in* é referente ao início das cadeias MCMC, apresentando as árvores iniciais geradas pelo programa rumo à convergência dos parâmetros. O valor de descarte das árvores como *burn-in* é verificado no Tracer. O *burn-in* padrão (10%) foi suficiente para a convergência de todos os parâmetros.

O arquivo de saída do BEAST *.log* contém as informações estatísticas da corrida pós *burn-in*, e foi analisado no programa Tracer 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2007), que permite visualizar o panorama geral da corrida, exibindo os valores médios do tamanho de amostra efetivo (*Effective Sample Size* ou *ESS*). O ESS é o número de amostras independentes que equivalem às amostras auto correlacionadas produzidas pelo MCMC (DRUMMOND et al.,

2006). Estes valores fornecem uma medida para verificar se as cadeias correram por um tempo suficiente, cujo valor ideal é superior a 200 (DRUMMOND et al., 2006). Quando os valores de ESS são superiores a 200, dizemos que os parâmetros para aquele *prior* convergiram. Todos os priors na presente análise convergiram após descartadas as árvores do período de aquecimento (*burn-in*), equivalente a 5×10^6 gerações (aproximadamente 10%, como o valor padrão recomendado pelo desenvolvedor do programa).

As árvores (saída *.trees* do BEAST) foram sumariadas no programa TreeAnnotator, que condensa todas as estimativas posteriores e de idade dos nós em uma árvore final. Após removido o *burn-in*, as árvores restantes foram sumariadas usando a opção *Maximum Clade Credibility*, que baseia a soma das estatísticas na árvore que apresentar maior valor de probabilidade posterior nos nós.

Testes de Consistência

Testes envolvendo reconstruções filogenéticas utilizando diferentes estratégias de amostragem taxonômica e molecular são reconhecidos por aferir a robustez dos resultados (CHESSER; HAVE, 2007). Até aqui, neste trabalho, foram geradas três topologias por ML. A primeira representa a inferência do alinhamento original (1.119 gêneros), sendo as outras duas reorganizações deste, variando somente o tamanho amostral taxonômico, mantendo todos os nove loci. A topologia final deste estudo, feita após a exclusão dos *rogues* (1.061 gêneros) e a topologia reduzida para inferência do tempo de divergência (329 gêneros), se mostraram-se extremamente similares ao primeiro resultado quanto às relações familiares, e idênticas para o monofiletismo e relações e dos grandes grupos.

Adicionalmente, outros dois testes com foco na variação da amostragem de caracteres foram conduzidos. O primeiro deles consistiu em remover todas as sequências que não se

apresentavam sobreposição no alinhamento, de modo a permitir plena comparação entre todos os *taxa*. Esta verificação foi feita estimando as distâncias genéticas no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011), e para todo par de sequências cuja distância não pôde ser calculada por ausência de sobreposição, a menor sequência foi removida. Isto resultou em um subconjunto de 816 gêneros com pelo menos alguma sobreposição entre si. Em seguida, este alinhamento foi submetido a uma análise de ML no RAxML, utilizando exatamente os mesmos parâmetros deste estudo descritos anteriormente. O segundo teste envolveu uma reconstrução por ML sob os mesmo parâmetros anteriores, utilizando um subconjunto reduzido de marcadores. Somente seis dos mais diversos loci (*nd2*, *cytb*, *cox1*, *rag1*, *odc*, *myo*) foram utilizados para este teste, os quais concentravam cerca de 80% de todos os gêneros presentes na análise original. Ambos os testes resultaram em topologias praticamente idênticas às anteriores, com todos os grandes clados e suas relações recuperados.

Portanto, um total de cinco testes diferentes, variando o tamanho amostral genético e taxonômico, geraram resultados extremamente similares para o foco deste estudo. Testes como estes de fato corroboram os resultados filogenéticos a serem apresentados a seguir, e sustentam de forma robusta a discussão neles baseada.

Resultados & Discussão

Aspectos Gerais da Ordem Passeriformes

Dada a magnitude dos resultados finais deste estudo, uma versão resumida da árvore final de ML é exibida na Figura 5. Esta árvore foi gerada a partir de nove *loci* (cinco mitocondriais e quatro nucleares) e 1061 gêneros Passeriformes, para testar o monofiletismo das famílias e suas relações filogenéticas em larga escala. A Figura 5 exhibe as relações filogenéticas entre as 122 famílias presentes neste estudo. Famílias monofiléticas são exibidas como uma única linhagem.

De todas as famílias amostradas, 34 são monogenéricas de acordo com a classificação utilizada (GILL; DONSKER, 2012), e somente a família Pomatostomidae teve somente um de seus dois gêneros amostrados. Todas as 87 famílias restantes, no entanto, puderam ser formalmente testadas quanto ao seu monofiletismo, pois incluíam pelo menos dois gêneros representantes. Gêneros responsáveis por violar o monofiletismo das famílias e gêneros classificados *incertae sedis* também são exibidos na Figura 1.

Somente 12 famílias, dentre as 87 testadas, não foram recuperadas como grupos monofiléticos e são destacadas com asteriscos na Figura 5. Em todos estes casos, no entanto, somente um único gênero foi responsável pelo parafiletismo de sua família original, mantendo todo o resto da diversidade desta num grupo monofilético. Para detalhes, ver a seção dedicada aos Casos de Parafiletismo adiante. Os resultados obtidos nesta análise, portanto, mostram que a classificação atual para as famílias de Passeriformes são fortemente coerentes com sua história evolutiva, refletindo em grande parte grupos naturais. Ademais, grande parte das relações filogenéticas propostas na presente topologia se mostraram bem resolvidas e altamente suportadas, ao contrário das politomias esperadas para as divergências mais profundas em grupos de intensa radiação adaptativa como Passeriformes.

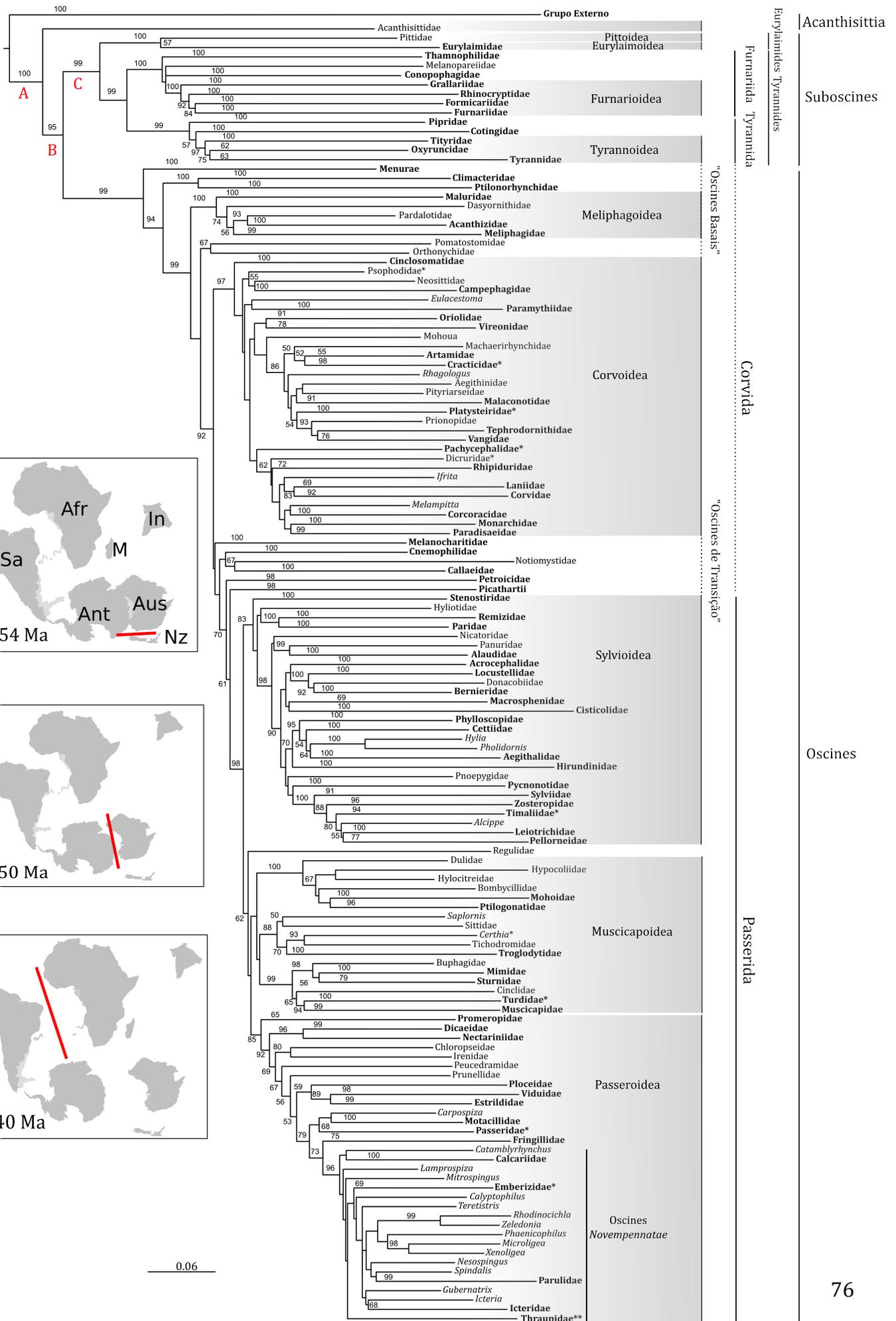


Figura 5: Relações filogenéticas entre as 122 famílias presentes neste estudo, gerada com nove *loci* (cinco mitocondriais e quatro nucleares) e 1061 gêneros Passeriformes. Famílias monofiléticas são exibidas como uma única linhagem. Asteriscos indicam famílias parafiléticas, dois asteriscos foram marcados em Thraupidae pois tanto esta quanto Cardinalidae não foram recuperadas (ver Casos de Parafiletismo para detalhes). Famílias em negrito estão representadas por mais de um gênero Somente valores de bootstrap maiores que 50 são exibidos. A linha horizontal indica o número de mudanças ao longo do ramo. Nomes para os grandes grupos seguem Sibley & Ahlquist. Letras vermelhas representam os nós cuja divergência provavelmente estaria ligada aos principais eventos de quebra da Gondwana: (A) Separação de Acanthisittia-Eupasseres; (B) Isolamento de Oscines na placa australiana e (C) Rompimento da conexão entre África e América do Sul, isolando os dois grandes grupos de Suboscines Tyrannides e Eurylaimides. Mapas representam a configuração das placas continentais durante a ruptura da Gondwana durante os intervalos de tempo estimados para os respectivos nós A, B e C. Abreviações para as placas continentais seguem América do Sul (Sa); África (Afr); Índia (In); Madagascar (M); Antártica (Ant); Austrália (Aus) e Nova Zelândia (NZ).

Devido a limitações espaciais, os grandes grupos tradicionalmente monofiléticos em Passeriformes serão indicados ao longo do texto pelo número de gêneros constituintes do clado e valor de bootstrap (BP) em parênteses. Como mencionado anteriormente, as inferências dos tempos de divergência basearam-se em um alinhamento reduzido (329 gêneros), contendo todas as 122 famílias e as principais linhagens discutidas no texto. Como este alinhamento reduzido foi gerado somente para tornar possível a inferência no BEAST (ver Métodos para detalhes) a topologia deste alinhamento não será discutida, por apresentar menos sinal filogenético em relação às reconstruções anteriores. No entanto, a árvore deste alinhamento reduzido é exibida de forma simplificada na Figura 6, somente para fornecer um panorama geral do tempo de divergência entre os grandes grupos de Passeriformes, bem como a distribuição das calibrações fósseis ao longo da topologia. As datas dos principais nós discutidos no texto se encontram sumariadas nas Tabelas 3 e 4. Todos os conflitos entre a árvore reduzida e a final serão mencionados e discutidos ao longo do texto.

O estudo de Sibley & Ahlquist (1990) foi de fato o maior e mais abrangentes para as relações de Passeriformes desde os primeiros estudos com a ordem até o presente estudo (ver Introdução). Apesar de críticas ao método e alguns de seus resultados terem se mostrado insuficientes para resolver certos clados na árvore, nenhum estudo após Sibley e Ahlquist (1990) utilizou um tamanho amostral tão grande como o desses autores. Os grandes grupos

propostos pelos autores são de grande interesse para entender os padrões macroevolutivos da grande diversidade de Passeriformes, e esta dissertação é o primeiro estudo com uma amostragem satisfatória para estes fins.

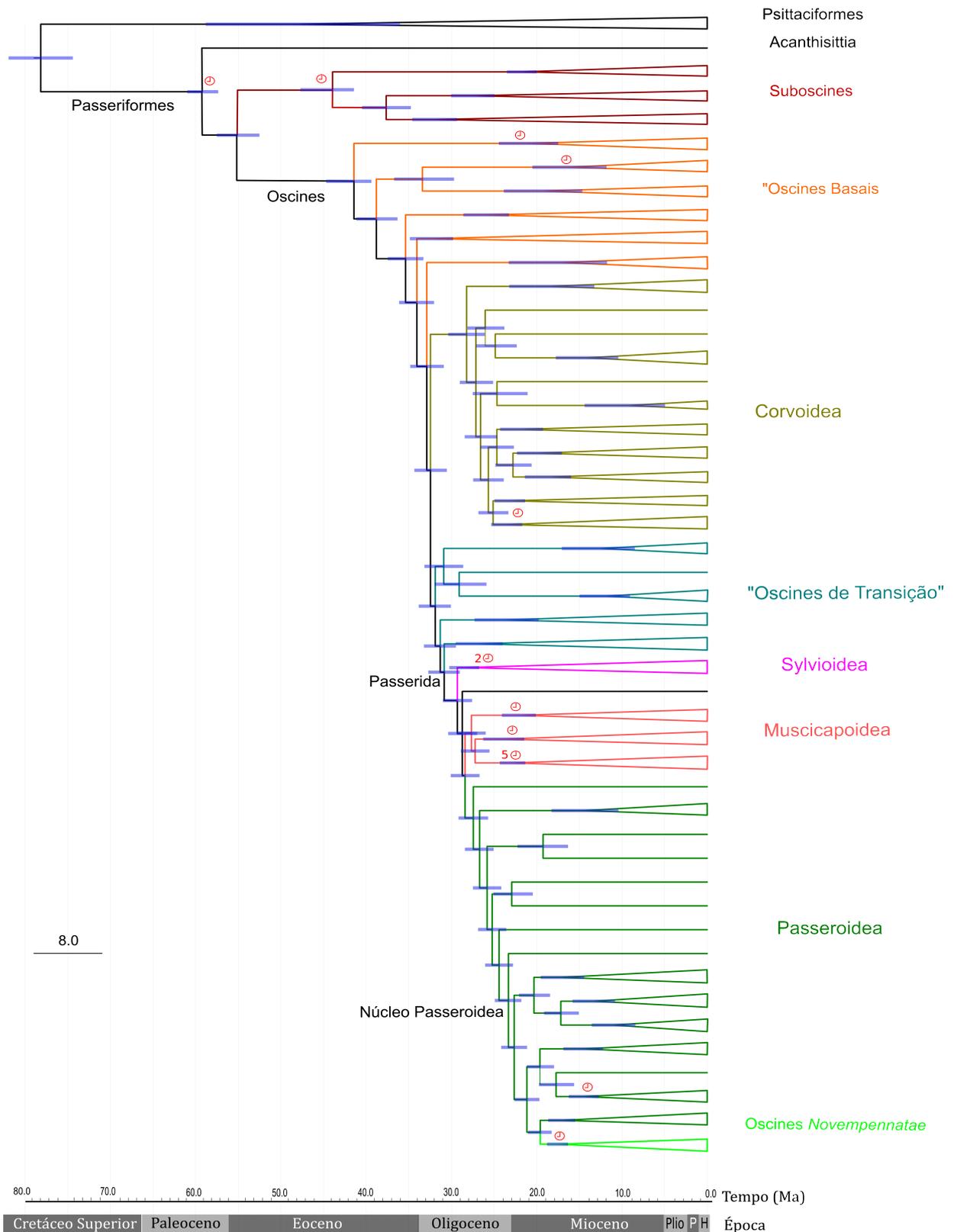


Figura 6: Escala temporal para Passeriformes. A árvore foi gerada com 329 gêneros e nove loci no programa RAxML e os tempos de divergência calculados com o pacote BEAST. Por apresentar menor resolução filogenética em relação à árvore final (1061 gêneros), esta árvore foi condensada para evidenciar somente o tempo de divergência dos grandes grupos de Passeriformes e suas principais linhagens e clados (triângulos). Os relógios vermelhos representam os pontos de calibração utilizados com base nos fósseis na Tabela 2. Idades e períodos seguem Gradstein et al. (2012).

Subordem Acanthisittia e a Primeira Divergência em Eupasseres

Em meus resultados, Passeriformes (1061 gêneros, 100 BP) foram divididos em três linhagens, representando as três subordens atualmente reconhecidas (Figura 5). A subordem Acanthisittia (um gênero) aparece como irmã de Eupasseres (1060 gêneros, 95 BP), contendo este clado as duas subordens restantes: Suboscines (ou Tyranni; 284 gêneros, 99 BP) e Oscines (ou Passeri; 776 gêneros, 99 BP). A primeira quebra no grande continente austral causou a separação da Gondwana Oeste (África e América do Sul) da porção Leste (Antártica, Austrália, Índia e Madagascar) no Cretáceo superior (cerca de 120 Ma) (ALI; AITCHISON, 2008; ALI; KRAUSE, 2011). A única conexão entre as duas massas continentais era uma tênue extensão da América do Sul com a Antártica que perdurou até meados do Eoceno (Figura 5a, b). Logo em seguida, o bloco formado por Índia e Madagascar se desprenderam da Gondwana Leste por volta de 99 Ma (ALI; AITCHISON, 2008; ALI; HUBER, 2010; CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2012). Posteriormente, a placa Neozelandesa iniciou seu longo processo de desprendimento da Gondwana Leste em 82 Ma (COOPER; MILLENER, 1993; GAINA et al., 1998; LAIRD; BRADSHAW, 2004). A primeira divergência em Passeriformes entre Acanthisittia e Eupasseres provavelmente está associada com este último evento, uma vez que Acanthisittia é endêmica da Nova Zelândia (DEL HOYO et al., 1992; ERICSON et al., 2002). Como a quebra entre Gondwana Leste-Oeste e entre o bloco Índia-Madagascar e a Gondwana Leste ocorreram muito antes do ancestral Passeriforme divergir, a separação da placa Neozelandesa da Antártica é tida como o evento inaugural da ruptura da Gondwana Leste (COOPER; MILLENER, 1993), e provavelmente isolou o ancestral Acanthisittia durante este processo (Figura 5a).

Minhas estimativas para a separação Acanthisittia-Eupasseres, durante o Paleoceno médio (61 Ma, Tabela 3), estão de acordo com a data para o registro fóssil mais antigo para Passeriformes, encontrado em estratos do Eoceno inferior de 54 Ma (BOLES, 1995). No

entanto, ao mesmo tempo esta data é irreconciliável com as calibrações utilizadas para este mesmo nó em estudos anteriores (BARKER et al., 2004; ERICSON et al., 2002), os quais assumiram que *Acanthisittia* divergiram de Eupasseres exatamente no início da separação Gondwana-Nova Zelândia, no Cretáceo superior (82 Ma) (COOPER; MILLENER, 1993). Meus resultados sugerem que ancestral de *Acanthisittia* e Eupasseres de fato foi capaz de manter fluxo gênico por toda Gondwana até o Paleoceno, cessando somente após a formação da passagem Cato (*Cato Trough*) (GAINA et al., 1998; SCHELLART; LISTER; TOY, 2006). Portanto, estimativas anteriores para o início da diversificação dos grupos Passeriformes viventes foram fortemente enviesadas em pelo menos 20 Ma.

Também de acordo com as datas obtidas neste estudo, durante a transição Paleoceno-Eoceno o ancestral Eupasseres deu origem às linhagens Oscines e Suboscines (55 Ma, Tabela 3). Novamente, esta data coincide com o próximo evento de ruptura gondwânico. Neste caso, o respectivo evento geológico responsável pela divergência Oscines-Suboscines provavelmente foi a cisão da conexão entre Austrália e Antártica (ALI; AITCHISON, 2008; HADDRATH; BAKER, 2012; WOODBURNE; CASE, 1996) (Figura 5b). Dados geológicos indicam que a deriva da placa australiana iniciou ainda no Cretáceo (WOODBURNE; CASE, 1996). Porém, dispersões terrestres e intercâmbio da fauna entre Austrália-Antártica ainda eram comuns até 55-52 Ma (TAMBUSSI; DEGRANGE, 2012; WOODBURNE; CASE, 1996). Por volta dessa época, um mar raso começou a se formar rapidamente entre os continentes, rompendo definitivamente qualquer conexão terrestre por volta de 42 Ma (LI; POWELL, 2001; WOODBURNE; CASE, 1996).

A formação de uma barreira marítima entre Austrália-Antártica é claramente concordante com minhas estimativas para a divergência Oscines-Suboscines no Eoceno médio (55 Ma), indicando que esta pode ter representado um evento vicariante que resultou na divergência dessas duas subordens. Este evento é corroborado em diferentes estudos com

diferentes *taxa*, cujas divergências foram estimadas por volta da mesma data. Entre Aves, a divergência entre as emas Sul-americanas e os casuares Australianos, foi inferida ter ocorrido no Eoceno médio (HÄRLID; JANKE; ARNASON, 1998). Em mamíferos, a separação da ordem monotípica Sul-americana Microbiotheria de um grande clado de marsupiais Australianos também foi estimada no Eoceno médio (45 Ma) (NILSSON et al., 2004). Estes estudos corroboram que a separação das faunas Australo-Americanas ocorreu até a primeira metade do Eoceno, e reforçam a possibilidade de um processo vicariante na separação das duas maiores subordens de Passeriformes. Este evento isolou o ancestral dos Oscines na placa australiana, deixando o ancestral dos Clamatores restrito aos últimos fragmentos gondwânicos ainda conectados, Antártica e América do Sul (Figura 5b).

Deste momento em diante, as duas subordens de Eupasseres iniciaram um processo de diversificação incomparável a qualquer outro grupo de Aves (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003). Após o isolamento, os Oscines se diversificavam timidamente na placa australiana, e posteriormente iriam ocupar todos os nichos possíveis em basicamente todas as regiões do mundo assim que a Austrália se conectasse a qualquer outro continente (BEECHER, 1953; BERESFORD et al., 2005). Paralelamente, os Suboscines se especializavam em uma igual infinidade de nichos, florestais e de áreas abertas, apresentando uma das maiores radiações autóctones de Aves no continente Americano (CLARAMUNT, 2010; OHLSON et al., 2013) e colonizando com sucesso florestas tropicais do Velho Mundo como África, Madagascar e Sudeste Asiático (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003).

Suboscines (Subordem Tyranni)

A subordem Tyranni é tradicionalmente dividida em duas infraordens, ambas recuperadas em meus estudos. Os Tyrannides (272 gêneros, 99 BP) são endêmicos do Novo Mundo, concentrados no Neotrópico. O segundo clado corresponde aos Eurylaimides (12 gêneros 100 BP), que são distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo. As histórias de vida para estes dois clados de Suboscines são muito diferentes desde sua separação do ancestral.

Tyrannides (Suboscines do Novo Mundo)

Os descendentes de Tyrannides sofreram uma incrível radiação pelo Novo Mundo, contendo hoje cerca de 1.200 espécies viventes (MOYLE et al., 2009; OHLSON et al., 2013; TELLO et al., 2009). Contrastando com seu enorme sucesso em número de espécies, grande parte da diversidade de Tyrannides está restrita à região Neotropical (Américas Central e do Sul) (DEL HOYO et al., 1992). Na verdade, somente seis gêneros viventes (quatro linhagens da família Tyrannidae) foram capazes de estender sua ocorrência à América do Norte (DEL HOYO et al., 1992), sugerindo que o ancestral Tyrannides possivelmente apresentava pouca habilidade em dispersões ou adaptação a climas mais frios. O registro fóssil para esta infraordem é escasso, e consiste em um único espécime não identificado do Mioceno inferior encontrado em depósitos da Patagônia, Argentina (NORIEGA; CHIAPPE, 1993). Este único fóssil, portanto, não estende a distribuição do grupo para além do Neotrópico, sustentando a ideia de baixa capacidade dispersiva do grupo.

Os Tyrannides são atualmente divididos nas parvordens Furnariida (131 gêneros, 100 BP) e Tyrannida (141 gêneros, 99 BP) (OHLSON et al., 2013), também recuperadas em meus

resultados (Figura 5). Em sequência, Furnariida é tradicionalmente separada em duas superfamílias, Thamnophiloidea e Furnarioidea (OHLSON et al., 2013), porém meus resultados questionam em parte essa classificação. Na Figura 5 é possível verificar que Thamnophiloidea sensu Ohlson et al. (2013) se mostrou parafilética, incluindo Furnarioidea (86 gêneros, 100 BP) em sua diversidade e deixando a família Thamnophilidae (42 gêneros, 100 BP) como grupo irmão dos demais Furnariida (89 gêneros, 22 BP). Especificamente, o clado responsável por romper o monofiletismo de Thamnophiloidea (Melanopareiidae-Conopophagidae) é frequentemente tido como problemático e de posição incerta (MOYLE et al., 2009). Estudos anteriores encontraram resultados contraditórios para essa relação dentro de Furnariida. Ohlson e colaboradores (2013) utilizaram 98 gêneros para inferir as relações deste clado, recuperando tanto Thamnophiloidea quanto Furnarioidea monofiléticas. Por outro lado, Moyle e colaboradores (2009) apresentaram um tamanho amostral muito maior (124 gêneros), e seus resultados estiveram de acordo com os meus quanto ao posicionamento de Thamnophilidae como grupo irmão do restante de Furnariida.

Tabela 3: Principais nós em Passeriformes e seus respectivos tempos de divergência calculados com o programa BEAST. A idade média estimada para o nó é apresentada junto ao intervalo de credibilidade ou *high posterior density* (HPD). Nomes separados pela barra indicam as duas linhagens que compartilham um mesmo nó. O termo “Linhagem” antes de um nome indica o início da radiação daquele clado.

Divergência	Idade do Nó	95% HPD
Acanthisittia/Eupasseres	60.9	54.9 - 67.8
Oscines/Suboscines	55.3	50.4 - 61
Eurylaimides/Tyrannides	44.2	40.1 - 48.2
<i>Sapayoa</i> /(<i>Eurylaimus</i> , <i>Philepitta</i>)	20.5	18.6 - 22.6
Furnariida/Tyrannida	39.8	36.3 - 43.5
Linhagem Furnariida	33.5	30.3 - 43.5
Linhagem Tyrannida	28.5	25.6 - 31.3
Linhagem Oscines	43.8	40.4 - 47.5
Linhagem Corvoidea	29.5	27 - 32
Passerida/Petroicidae	32.2	30.1 - 34.3
Linhagem Sylvioidea	29.7	27.8 - 31.7
Linhagem Muscicapoidea	28.8	27 - 30.7
Linhagem Bombycilloidea	22.8	20.7 - 25
Linhagem Certhioidea	24.9	22.5 - 27.5
Linhagem Núcleo Muscicapoidea	23.4	21.8 - 25.1
Linhagem Passeroidea	28.6	26.7 - 30.6
<i>Prunella</i> /Núcleo Passeroidea	24.3	22.6 - 26.1
Fringillidae/Oscines <i>Novempennatae</i>	20.4	18.9 - 22

A partir dos resultados obtidos neste estudo para os tempos de divergência, é possível verificar que os Furnariida começaram a diversificar relativamente cedo, antes de seu grupo irmão Tyrannida. Entretanto, mesmo essa diversificação adiantada de Furnariida ao final do Eoceno não parece ter restringido a radiação subsequente de Tyrannida, iniciada somente no Oligoceno médio (Tabela 3). Isto é ainda mais intrigante ao verificar que suas áreas de ocorrência apresentam elevado grau de sobreposição (DEL HOYO et al., 1992).

Uma possível explicação para este padrão seria uma imediata delimitação de nichos desde o ancestral das duas infraordens, aliada às dinâmicas climáticas do Paleógeno médio-

superior. Os Furnariida são aves preferencialmente de florestas densas, enquanto a grande maioria dos Tyrannida ocorre em áreas abertas, de baixa vegetação e em bordas de mata (WILLIS, 1976). É bem documentado na literatura que a fauna entomológica reduz consideravelmente em períodos de resfriamento ambiental (SINCLAIR et al., 2003; WILLIS, 1976). Portanto, o período de forte resfriamento no início do Oligoceno (ZACHOS et al., 2001) pode ter confinado os Furnariida, que são exclusivamente insetívoros (WILLIS, 1976), em ambientes capazes de manter as temperaturas mais altas e estáveis, como florestas tropicais (SINCLAIR et al., 2003). Estes ambientes, por sua vez, possivelmente conseguiam manter uma maior fauna entomológica. Isto pode ter permitido os Furnariida se diversificarem independentemente da baixa de temperatura global (ZACHOS et al., 2001), o que por sua vez pode ter restringido as taxas de especiação em Tyrannida, que também apresentam grande preferência por insetivoria.

Logo em seguida, a subida dos Andes ao fim do Oligoceno (HOORN et al., 2010) contribuiu para a elevação das temperaturas no Neotrópico (ZACHOS et al., 2001), intensificando o processo de desertificação na região. A exposição de áreas cada vez maiores de savana ofereceu melhores condições para a expansão de Tyrannida. As altas temperaturas também podem ter contribuído para a proliferação e diversificação não somente de insetos, mas de plantas frutíferas nas áreas abertas, oferecendo uma maior variedade de nichos para Tyrannida explorarem.

A parvordem Tyrannida em minha árvore (Figura 5) compreendeu três linhagens, Cotingidae (23 gêneros, 100 BP), Pipridae (15 gêneros, 100 BP) e a superfamília Tyrannoidea (103 gêneros, 97 BP). Nesta parte da árvore houve um conflito entre a árvores final (1061 gêneros) e a reduzida (329 gêneros), sendo nesta última Tyrannida dividida em dois clados somente, um contendo Cotingidae e Pipridae (4 gêneros, 97 BP) e outro com Tyrannoidea. Na árvore final (Figura 5), é possível verificar que, com maior tamanho amostral taxonômico,

Cotingidae separou-se de Pipridae, sendo esta irmã de todos os outros Tyrannida com 57 BP. Este resultado reforça novamente, como em Thamnophiloidea, a importância de se utilizar uma grande diversidade taxonômica para se resolver relações entre grandes grupos. Neste estudo, um clado com alto suporte em um tamanho amostral reduzido foi quebrado com o aumento do tamanho amostral taxonômico.

Eurylaimides (Suboscines do Velho Mundo)

No Velho Mundo, os Eurylaimides passaram por uma história evolutiva completamente diferente em relação ao seu grupo irmão, os Suboscines do Novo Mundo. Atualmente, a diversidade de Eurylaimides representa somente 4% dos Suboscines, porém sua distribuição é muito mais ampla, corroborada pelo seu registro fóssil. Ao contrário de Tyrannides, que estão basicamente restritos ao Neotrópico, os Eurylaimides se encontram distribuídos extensamente em regiões florestais da África, Madagascar e Sudeste Asiático (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003; MOYLE et al., 2006). Registros paleontológicos de camadas geológicas do Mioceno localizadas em West Wintershof (Bavaria, Alemanha central) (BALLMANN, 1969) fornecem evidências de uma distribuição ainda maior para Eurylaimides no passado, superando os limites gondwânicos e chegando até as regiões centrais da Europa (MANEGOLD; MAYR; MOURER-CHAUVIRÉ, 2004; MOURER-CHAUVIRÉ, 1995). Com esta vasta distribuição, não é surpreendente que as hipóteses levantadas para explicar sua tímida e incrivelmente extensa diversificação permaneçam controversas.

A atual hipótese levantada para explicar a origem e diversificação de Suboscines do Velho Mundo (MOYLE et al., 2006) se inicia com uma longa dispersão do ancestral Eurylaimides a partir da Gondwana rumo à placa Indiana no Cretáceo tardio (70 Ma). Nesta época, a Índia já se encontrava consideravelmente isolada da Gondwana, e o proto-Oceano

Índico já consistia em mais de 2.000 km de mar aberto entre as duas massas continentais (ALI; AITCHISON, 2008; CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTese, 2012). Em seguida, de acordo com a mesma hipótese, a diversificação principal dos Eurylaimides se deu após o contato da placa Indiana com a Asiática. Portanto, Moyle e colaboradores (2006) inferiram a origem de Eurylaimides na Ásia, com posteriores invasões na África e Madagascar. Toda a hipótese de Moyle e colaboradores (2006) foi baseada na mesma calibração enviesada de *Acanthisittia-Eupasser* de outros trabalhos (BARKER et al., 2004; ERICSON et al., 2002). Minhas estimativas para a divergência de Eurylaimides foram muito mais recentes, no Eoceno (44 Ma, Tabela 3). Isso torna as minhas datas irreconciliáveis com qualquer parte da hipótese atual para Eurylaimides. Por volta de 44 Ma, a Índia se encontrava já bem isolada da Gondwana (ALI; AITCHISON, 2008), sendo improvável qualquer *Suboscines* chegar nela por dispersão, mesmo considerando a capacidade dispersiva de Eurylaimides ser relativamente maior que Tyrannides, a julgar pela presença daqueles em áreas de diferentes continentes. Portanto, a partir de meus resultados e com base na literatura, proponho uma hipótese alternativa para a diversificação de Eurylaimides desde o momento de sua divergência do ancestral comum com Tyrannides.

Minha topologia para Eurylaimides mostra respectivamente duas linhagens endêmicas de Madagascar (*Philetpitta*) e África (*Pseudocalyptomena*), sequencialmente posicionadas como grupos irmãos de um grande clado Asiático, apontando para uma origem africana para toda a infraordem (DEL HOYO et al., 1992). Como mencionado, a distribuição atual de Eurylaimides inclui África, Madagascar e Ásia, com o registro fóssil estendendo sua ocorrência até a Europa, enquanto seu grupo irmão Tyrannides é primariamente Sul-americano (ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003). Relações de linhagens irmãs entre África e América do Sul são frequentemente encontradas para diferentes grupos taxonômicos (OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009; SCHRAGO; RUSSO, 2003). Contudo, evidências geológicas apontam

para uma separação dos dois continentes durante o Cretáceo, há 100 Ma (ALI; KRAUSE, 2011; OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009), o que não se adequa com as minhas estimativas para a separação Tyrannides-Euryllaimides no Paleógeno (Tabela 3). Entretanto, estas estimativas são bem próximas de uma série de outras datas inferidas para a divergência de *taxa* de disjunção trans-Atlântica, como primatas do Novo Mundo (35-40 Ma) (SCHRAGO; RUSSO, 2003), roedores Caviomorpha (45.4 ± 4.1 Ma) (POUX et al., 2006) e anfisbenídeos (Amphisbaenia, Lepidosauria) (40 Ma) (MÜLLER et al., 2011; VIDAL et al., 2008).

Dados geológicos foram utilizados recentemente pra modelar as conexões entre África e América do Sul no Cenozóico, utilizando informações do movimento horizontal das placas tectônicas, flutuações no nível do Oceano Atlântico e sedimentação térmica da litosfera oceânica (OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009). Estes resultados de fato rejeitaram qualquer conexão terrestre contínua entre os continentes após 100 Ma, no entanto, os autores apresentam fortes evidências de que uma cadeia de ilhas oceânicas provavelmente se manteve exposta até meados do Eoceno (OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009) (Figura 7). Há 50 Ma, uma série de ilhas ligadas à costa africana se adentravam no Oceano Atlântico, ligando-se a um grande placa oceânica ao sul do Brasil chamada Rio Grande Rise, consolidando uma passagem terrestre quase ininterrupta entre os dois continentes. Há 40 Ma (Figura 7), esta cadeia começou a se fragmentar e tornou-se completamente submersa há menos de 30 Ma (OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009). Estas evidências geológicas estão plenamente de acordo com as estimativas obtidas no presente trabalho.

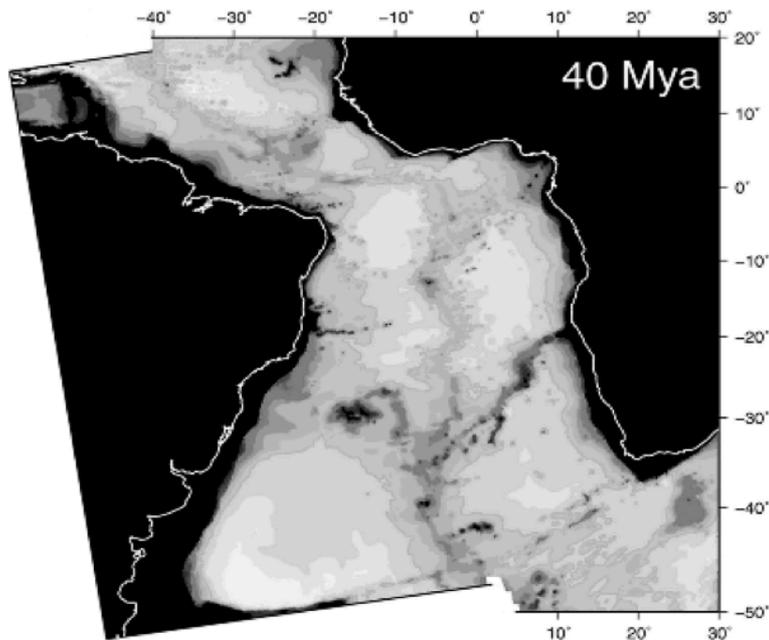


Figura 7: Reconstrução da conexão trans-Atlântica entre África e América do Sul no Cenozóico, baseada em informações do movimento horizontal das placas tectônicas, flutuações no nível do Oceano Atlântico e sedimentação térmica da litosfera oceânica (Oliveira et al. 2009). Esta imagem mostra o momento em que a cadeia de ilhas entre África e América do Sul começa a se fragmentar há 40 Ma, data que coincide com uma grande diversidade de divergências entre *taxa* irmãos em cada um dos continentes (ver texto para detalhes).

Assim, proponho uma origem Africana para Eurylaimides, cuja divergência está relacionada à quebra da conexão África-América do Sul durante o Eoceno, com uma posterior dispersão de suas linhagens para a região Oriental. Esta hipótese é corroborada por importante estudo com a morfologia de Eurylaimides (PRUM, 1993) que através de caracteres osteológicos e da siringe, também sugeriu uma origem Africana para o grupo.

Por fim, um ponto crucial precisa ser explicado para satisfazer completamente minha proposta, a ocorrência de fósseis Europeus de Eurylaimides, que estendem a distribuição do grupo para além de territórios da Gondwana. Em uma análise de biogeografia cladística em larga escala, um estudo recente testou possíveis conexões faunísticas entre territórios da Europa e Gondwana durante o Paleoceno (EZCURRA; AGNOLIN, 2012). Neste estudo, os autores encontraram fortes evidências para a formação da Eurogondwana durante fim do Cretáceo até meados do Eoceno. Neste período, a Europa se encontrava isolada da Laurásia por grandes extensões de mar, separada da América do Norte a leste pelo Oceano Atlântico e a

oeste pelo Oceano de Thetis (EZCURRA; AGNOLIN, 2012). Entretanto, ao sul, a Europa formou uma conexão com o Norte da África possivelmente pela redução do nível do Mediterrâneo no Paleógeno inferior (MILLER, 2005), permitindo muitos *taxa* gondwânicos migrarem em direção à Europa (EZCURRA; AGNOLIN, 2012). Posteriormente a Eurogondwana se desfez, conectando a Europa à Asiamérica, restabelecendo a conformação da Laurásia original (EZCURRA; AGNOLIN, 2012). A hipótese Eurogondwana foi proposta por Ezcurra e Agnolín (2012) para explicar a ocorrência de uma série de vertebrados tipicamente gondwânicos na Laurásia e não o contrário, e fornece suporte para a hipótese apresentada no presente trabalho sobre a expansão de Eurylaimides da Gondwana para a Europa.

O Enigmático Gênero Sapayoa

A única exceção para a consistência geográfica do isolamento dos Tyrannides no Novo Mundo e Eurylaimides no Velho Mundo é o peculiar taxon *Sapayoa aenigma*. Este gênero monotípico habita as florestas tropicais da América Central e Noroeste da América do Sul, porém foi recuperado em minha análise dentro do clado Eurylaimides (42 BP). *Sapayoa* sempre foi associado a Tyrannides, o que não é de surpreender devido à sua distribuição geográfica. Entretanto, essa associação consistia mais em uma convenção geográfica, pois *Sapayoa* não apresentava nenhuma sinapomorfia típica dos Suboscines do Novo Mundo (FJELDSA et al., 2003). Os detalhes da origem de *Sapayoa* no Novo Mundo, entretanto, permanecem sob dúvidas.

A afinidade de *Sapayoa* com os Eurylaimides foi evidenciada pela primeira vez por Fjelsda e colaboradores (2003), e neste mesmo estudo os autores propuseram que *Sapayoa* consistia em uma segunda linhagem de Suboscines nas Américas vinda diretamente da Gondwana (a primeira, como já mencionado, seriam os Tyrannides).

Admitindo a proposta desta dissertação para origem e diversificação de Eurylaimides na África após a separação do ancestral Sul-americano, uma invasão das Américas por *Sapayoa* diretamente da Gondwana seria improvável. O principal argumento contra esta hipótese baseia-se na data inferida para a divergência de *Sapayoa* (20 Ma, Tabela 3) nesta dissertação, muito recente para qualquer tipo de comunicação África-América do Sul (OLIVEIRA; MOLINA; MARROIG, 2009). Portanto, os resultados obtidos na presente análise estariam mais de acordo com a origem Laurasiática de *Sapayoa* proposta por Moyle e colaboradores (2006).

Após ter surgido na Laurásia, *Sapayoa* possivelmente adentrou as Américas a partir da Europa, território sabidamente habitado por eurylaimídeos do Paleógeno (BALLMANN, 1969; MANEGOLD; MAYR; MOURER-CHAUVIRÉ, 2004; MOURER-CHAUVIRÉ, 1995). Esta travessia teria sido promovida por uma conexão entre América do Norte e Europa no Atlântico Norte até o fim do Paleoceno, conhecida como *North Atlantic Land Bridge* (NALB) (DENK; GRIMSSON; ZETTER, 2010; ERICSON, 2011). O registro fóssil para mamíferos de ambos os lados da NALB são extremamente semelhantes (MCKENNA, 1983), e algumas aves atualmente consideradas endêmicas do Novo Mundo como beija-flores (Trochilidae) têm fósseis identificados em estratos do Paleógeno da Europa (MANEGOLD, 2008; MAYR, 2005). Por volta do Eoceno superior (por volta de 40 Ma), porém, o registro de mamaliformes dos lados opostos à NALB já apresenta consideráveis diferenciações morfológicas, o que levou autores a sugerir que, nessa época, a conexão terrestre no Atlântico Norte já não mais existia (DENK; GRIMSSON; ZETTER, 2010; MCKENNA, 1983). Isto impediria também uma reconciliação com as datas estimadas no presente trabalho para *Sapayoa*, no Mioceno inferior (20 Ma).

Estudos recentes com abordagens geológicas mais detalhadas, no entanto, indicam que algumas partes da NALB podem ter permanecido exposta por mais tempo. Investigações da porção Leste da NALB, que conecta a Europa à Groenlândia conhecida como *Greenland-Iceland-Faroe ridge*, pode ter fornecido conexões terrestres por todo o Paleógeno (DENK et al., 2011; DENK; GRIMSSON; ZETTER, 2010; ERICSON, 2011) e possivelmente até o Neógeno (18-15 Ma) (MILNE, 2004; POORE et al., 2006). Isso explicaria a ruptura mais recente do fluxo gênico entre *Sapayoa* e os demais Eurylaimides com o fim da NALB.

Contudo, infelizmente os argumentos para o fim efetivo da NALB com base em divergências moleculares varia tremendamente, dependendo do grupo taxonômico em cada estudo (DENK; GRIMSSON; ZETTER, 2010). A outra alternativa para a conexão de faunas Eurasiáticas e Americanas é via Bering (muitas vezes também chamado *Beringia land bridge*). Neste caso, a ruptura desta conexão é bem-estabelecida de ter ocorrido no Plioceno (5 Ma) (MARINCOVICH; GLADENKOV, 1999; MILNE, 2004). Neste caso, esta rota seria menos provável de ter gerado um evento vicariante para a separação de *Sapayoa*.

Oscines (Subordem Passeri)

O grupo irmão de Suboscines inclui cerca de 80% de toda a diversidade de Passeriformes, os Oscines (776 gêneros, 99 BP; Figura 5). Como mencionado, o trabalho de Sibley e Ahlquist (1990) representou um grande paradigma para a classificação de Passeriformes e seus grandes grupos. Seu principal resultado foi a distinção de um grande grupo de Oscines originado e centrado na região Australo-Papuásia, a parvordem Corvida, irmã

da segunda parvordem, Passerida, originada na Eurásia e posteriormente diversificando-se nas porções continentais do Novo e Velho Mundos (BARKER, 2011; SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Análises moleculares mais recentes verificaram que Corvida é na verdade, um grupo parafilético com Passerida inserido em sua diversidade (BARKER et al., 2004; BARKER; BARROWCLOUGH; GROTH, 2002; ERICSON et al., 2002) (ver Introdução para detalhes). Esta nova proposta alterou a hipótese original de Sibley e Ahlquist (1990), na qual os autores sugeriram duas diversificações paralelas entre Corvida (hemisfério Sul) e Passerida (hemisfério Norte) em suas respectivas regiões de origem. Com efeito, a posição de Passerida dentro de Corvida aponta toda a diversidade de Oscines para uma origem australiana.

A Parafilética Linhagem Corvida

Meus resultados corroboram a origem australiana de Oscines, pois recuperei o parafiletismo de Corvida com Passerida inserido em sua diversidade (Figura 5). O parafiletismo de Corvida é evidente não só pela inserção de Passerida, mas por um conjunto de outras relações entre os grandes grupos. A quebra de Menuroidea, já indicada por estudos com hibridação DNA-DNA (CHRISTIDIS; SCHODDE, 1991) foi outro grande responsável pelo parafiletismo de Corvida, também confirmada em minhas análises. Nestas, Menuroidea se dividiu em dois clados, Menurae (2 gêneros, 100 BP), como grupo irmão de todos os outros Oscines, e o restante de Menuroidea no clado seguinte (Ptilonorhynchidae-Climacteridae; cinco gêneros, 100 BP). A siringe de Menurae é considerada distinta em relação aos demais Oscines desde Garrod (1876) (Figura 1, 5), e, portanto, condiz com sua posição filogenética recuperada no presente estudo (Figura 5). A ocorrência de Menurae somente na costa Leste Australiana e sua posição como grupo irmão de todos os demais Oscines reforçam o papel da placa Australiana em ter sido o ambiente primário do ancestral Oscines (ERICSON et al., 2002).

De acordo com meus resultados, os primeiros Oscines iniciaram uma tímida diversificação na placa Australiana, durante a deriva desta rumo ao Norte durante a primeira metade do Eoceno (Tabela 3, Figura 6). O parafiletismo de Corvida em meus resultados, além dos mencionados parafiletismo de Menuroidea e inserção de Passerida na diversidade de Corvida, resulta na separação de Oscines em três grandes grupos: os parafiléticos Oscines Basais; a superfamília monofilética Corvoidea e os parafiléticos Oscines de Transição, que incluem o grupo irmão de toda a radiação Passerida (Figura 5).

Os Oscines Basais foram divididos em quatro clados, com uma considerável diversificação em relação a Menurae, porém ainda muito menor do que os próximos clados passeriformes. Os Oscines Basais atualmente são restritos às regiões Australiana e Oceania (DEL HOYO et al., 1992), e isto pode estar diretamente relacionado à complexa formação do arquipélago Malaio (Figura 8). A porção marginal das placas tectônicas está sujeita a processos típicos de esfacelamento e desintegração, pois está diretamente relacionada aos atritos gerados com o movimento das placas (CHATTERJEE; GOSWAMI; SCOTSE, 2012; GRADSTEIN et al., 2012). De forma contrária, as porções interiores das placas, os Crátons, por não sofrerem as mesmas dinâmicas das margens, são muito mais estáveis e, em consequência, mais antigas (GRADSTEIN et al., 2012). A porção Norte do Cráton Australiano forma um único bloco com a atual porção Sul da Nova Guiné, geologicamente conectados pela da plataforma Sahul (Figura 8). Por volta do Oligoceno inferior (35-30 Ma), o movimento para o Norte da placa Australiana encontrou o movimento para Sudoeste da imensa placa do Pacífico, provocando o soerguimento da atual porção Sul da Nova Guiné (CHARLES, 1991; HALL, 2002; VAN UFFORD; CLOOS, 2005). Juntamente a este importante evento tectônico, uma drástica redução do nível do mar ocorreu por volta dessa mesma época (ALI; AITCHISON, 2008; MILLER, 2005), expondo grandes porções de solo oceânico ao ambiente aéreo (ofiólitos) (CHARLES, 1991; HALL, 1998). Pela primeira vez as linhagens Oscines puderam expandir sua distribuição para fora da

Austrália. De fato, as datas obtidas nesta dissertação para o início da diversificação de Climacteridae e Ptilonorhynchidae, os Oscines mais basais com ocorrência fora da Austrália (DEL HOYO et al., 1992) coincidem exatamente com a conformação geológica descrita para o Oligoceno inferior.



Figura 8: Mapa simplificado de Hall (1998, 2002) da conformação atual da Australásia, que inclui o Sudeste Asiático, sua expansão tectônica conhecida como Plataforma Sunda e suas ilhas; o arquipélago oceânico Wallacea (Sulawesi e ilhas adjacentes) e a região Australo-Papuásia. As cores representam a origem cratônica dos territórios que formam as principais províncias biogeográficas da região: vináceo para Austrália e a porção Sul da Nova Guiné; vermelho para a Melanésia, que originou com o contato entre a placa Australo-Papuásia e a grande placa do Pacífico e verde para os territórios de origem Asiática. A complexidade que gerou a Australásia é evidente nesta figura, mostrando que as terras de ilhas como Nova Guiné, Wallacea e Filipinas são de origem composta, formadas a partir de fusões de territórios de outras placas, como a Nova Guiné sendo tais ilhas. De acordo com a geologia da região, é possível verificar que a Nova Guiné compõe a parte Norte da placa Australiana, tendo sido soerguida do fundo marinho durante o Oligoceno inferior (35-30 Ma), permitindo a primeira expansão de Oscines para fora da Austrália. Em seguida, com o aumento da tensão entre as placas Australo-Papuásia e do Pacífico no fim do Oligoceno (25 Ma), a Nova Guiné conectou-se com a cadeia de ilhas da Melanésia, permitindo que as linhagens Oscines expandissem ainda mais sua distribuição, adentrando-se no Pacífico Oeste. Por fim, no início do Mioceno (20 Ma), a aproximação final da placa Australiana da Ásia elevou a plataforma Sunda, expondo numerosas porções de terra de origem marinha (ofiólitos), por onde Corvoidea e Passerida se expandiram e diversificaram rumo ao Velho Mundo continental e posteriormente, o Novo Mundo. A linha azul representa a Linha de Wallace, uma clássica divisão biogeográfica na Australásia que separa as biotas Leste e Oeste, que corresponde à história geológica apresentada.

A contínua tensão entre a placa Australo-Papuásia, que inclui o Cráton Australiano e a sua porção Norte recentemente soerguida (Nova Guiné), e a placa do Pacífico ao fim do Oligoceno (25 Ma) intensificou o soerguimento do sistema de Arcos da Melanésia, expondo uma grande quantidade de pequenos ofiólitos Pacífico adentro (Figura 8) (HALL, 2002). Esta data coincide com minhas estimativas para a próxima diversificação Oscines, e a maior radiação encontrada nos Oscines Basais, a superfamília Meliphagoidea (53 gêneros, 100 BP) (Figura 5) (GARDNER et al., 2010). A exposição dos ofiólitos na Melanésia pode ter contribuído para a grande diversificação de Meliphagoidea em relação às linhagens Oscines anteriores, permitindo-os ocupar regiões da Austrália, Nova Guiné e grande parte dos arquipélagos do Pacífico (DEL HOYO et al., 1992; GARDNER et al., 2010). Em minha escala temporal, Meliphagoidea divergiu do ancestral Oscines ao final do Eoceno (37 Ma), porém suas numerosas linhagens só surgiram no Oligoceno inferior (26 Ma), exatamente quando as regiões mencionadas acima já se encontravam expostas. Entretanto, esta mesma configuração geológica pode ter sido responsável por limitar a radiação de Meliphagoidea e os demais Oscines Basais a leste da Linha de Wallace. Esta linha imaginária, traçada na região das Wallacea (Sulawesi e ilhas adjacentes, Figura 8) é uma clássica divisão biogeográfica da Australásia, que divide faunas e floras marcadamente distintas em ambos os seus lados Leste (Australo-Papua e Melanésia) e Oeste (Plataforma Sunda e suas grandes ilhas e Sudeste Asiático) (Figura 8) (HOLT et al., 2013). Este cenário descrito para a primeira metade do Oligoceno, no qual somente as porções a leste da Linha de Wallace emergiram antes da porção a oeste. Isso explicaria a ocorrência de todos os Oscines Basais, inclusive os numerosos Meliphagoidea, somente no lado Leste da Australásia.

A porção oeste da Linha de Wallace só surgiu no fim do Oligoceno e início do Mioceno (20-15 Ma), quando a placa Australo-Papuásia colidiu-se com os sistemas de Arcos das Filipinas e a placa Sulawesi (Figura 8) (HALL, 2002)¹⁹. Esta colisão conectou a Nova Guiné ao

Sudeste Asiático através da plataforma Sunda, uma extensão subaérea do Cráton Asiático (Figura 8). Durante o início do Mioceno, como mencionado em Suboscines, os níveis marinhos sofreram uma grande redução (ALI; AITCHISON, 2008; GRADSTEIN et al., 2012; MILLER, 2005), o que certamente levou também a plataforma Sunda a expor grandes porções de terra, que futuramente formariam as ilhas chamadas de *Greater Sunda* (Borneo, Java e Sumatra), as maiores ilhas do Arquipélago Australásio depois da Nova Guiné (Figura 8) (HALL, 2002). Portanto, desde o fim do Oligoceno a conformação da Australásia permitia uma conexão da região primária dos Oscines (Australo-Papua) com as ilhas da Melanésia a leste e a região Indo-Malaia a oeste, e mais importante: durante o baixo nível do mar, estas regiões ligaram-se à Ásia continental.

A quarta e última linhagem de Oscines Basais foi o clado com as famílias Orthonychidae e Pomatostomidae, originalmente situado em Corvoidea por Sibley e Ahlquist (1990). Este clado é irmão da imensa diversidade restante de Oscines, um clado chamado frequentemente de *Crown Oscines* (BARKER; BARROWCLOUGH; GROTH, 2002). Estes podem ser divididos em dois grandes grupos (Figura 5). O primeiro consiste basicamente na superfamília Corvoidea (127 gêneros, 97 BP) de Sibley e Ahlquist (1990), que inclui mais linhagens que o clado recuperado em estudos anteriores como “núcleo Corvoidea” (BARKER; BARROWCLOUGH; GROTH, 2002; JONSSON et al., 2011). A diversificação de Corvoidea marca a primeira grande expansão Oscines em continentes como Eurásia e África, chegando até o Novo Mundo (Figura 9). Minhas estimativas estiveram de acordo com os modelos de reconstrução da Australásia 19 (HALL, 2002), pois a grande explosão de diversidade de Corvoidea se deu na transição Oligoceno-Mioceno (20-15 Ma) (Figura 6), logo após a conexão com a Plataforma Sunda ter se estabelecido, permitindo expansões fora da Australásia.

Em Corvida, no entanto, a colonização do Novo Mundo é a mais tímida dentre todos os Oscines (Figura 9). Somente duas linhagens, 12 gêneros no total, são endêmicos do continente

Americano, o clado das gralhas (sete gêneros, 89 BP, uma linhagem da família cosmopolita Corvidae) e a família Vireonidae (seis gêneros, 78 BP) (Figuras 5 e 9). Vireonidae é na verdade a única família não Passerida endêmica das Américas (DEL HOYO et al., 1992; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008), e parece ter chegado ao continente relativamente cedo no final do Oligoceno (22 Ma), em comparação às gralhas no Mioceno médio (13 Ma) (Tabela 4).

O segundo grande grupo dos *Crown Oscines* compreende os Oscines de Transição (JONSSON et al., 2011), que contém linhagem irmã da parvordem Passerida (563 gêneros, 98 BP) (SIBLEY; AHLQUIST, 1990). Os Oscines de Transição foram primariamente classificados como Corvoidea sensu Sibley e Ahlquist (1990), porém estudos recentes revelaram sua maior afinidade com Passerida (BERESFORD et al., 2005; JONSSON et al., 2007; 2011), formando um clado com esta de 587 gêneros (13 BP) em meus resultados. A distribuição restrita dos Oscines de Transição a Leste da Linha de Wallace combinada com minhas estimativas, indica que esta linhagem tenha iniciado a diversificação na Australo-Papua antes da formação da Plataforma Sunda. Porém, o grupo irmão de Passerida permanece um tópico controverso (BARKER, 2011; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008; JONSSON et al., 2007), com duas propostas conflitantes que implicam em uma origem geográfica de Passerida completamente diferentes.

A Parvordem Passerida

A primeira hipótese para a origem de Passerida foi proposta por Barker e colaboradores (2004), baseada na posição da família Petroicidae como seu grupo irmão (BARKER et al., 2004; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008). Petroicidae são muito conhecidos por seu nome em inglês *Australasian robins* (DEL HOYO et al., 1992), referente à sua distribuição restrita ao leste da linha de Wallace (DEL HOYO et al., 1992). A partir disso, Barker e colaboradores (2004) foram os primeiros a sustentar a ideia na qual a saída de Passerida da Australásia seguiu

primeiro em direção à Ásia, posteriormente se expandindo para a África e o Novo Mundo (BARKER et al., 2004; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008). A hipótese biogeográfica alternativa parte de um arranjo diferente para o grupo irmão de Passerida, neste caso o clado Picathartii. Picathartii é um grupo extremamente peculiar, com três famílias monogenéricas que apresentam uma enorme descontinuidade geográfica em suas distribuições, respectivamente florestas tropicais do Noroeste Africano (Picathartidae), savanas do extremo Sul Africano (Chaetopidae) e florestas densas da península Malaia, Sudeste Asiático (Eupetidae) (BERESFORD et al., 2005; DEL HOYO et al., 1992; JONSSON et al., 2007). A presença de duas linhagens Africanas levou Jonsson e Fjeldsa (2006) a propor uma origem Africana para Passerida, na qual o ancestral atravessou o Oceano Índico a partir da Australásia rumo à África, auxiliado por ventos e ilhas expostas em períodos em que o Oceano Índico se encontrava menor que o atual (JONSSON; FJELDSA, 2006). Meus resultados não foram capazes de apontar com precisão o grupo irmão de Passerida. Na árvore final (Figura 5), Picathartii compartilha um ancestral exclusivo com Passerida (61 BP), no entanto, na árvore reduzida, Petroicidae ocuparam esta posição (cinco gêneros, 79 BP).

Ainda que os presentes resultados topológicos não tenham resolvido o grupo irmão de Passerida, para melhor corroborar uma das duas hipóteses, minhas estimativas para a origem de Passerida (30 Ma) tendem a refutar a hipótese Africana de Jonsson e Fjeldsa (2006). Por volta dessa época, a placa Indiana já estava em pleno contato com a Ásia (ALI; AITCHISON, 2008), e como consequência o Oceano Índico se encontrava completamente formado, compreendendo uma vasta extensão de água muito improvável de qualquer passeriforme atravessar. Portanto, uma origem Asiática de Passerida se adequa melhor às minhas estimativas, concordando também com a data de exposição da Plataforma Sunda (HALL, 2002). Por fim, Barker (2011) recentemente indicou que a hipótese de origem Asiática é perfeitamente reconciliável com a posição de Picathartii como grupo irmão de Passerida (como

em minha topologia final), além de demonstrar que a evidência para a hipótese Africana ainda é fracamente suportada até o momento (BARKER, 2011).

Imediatamente após a exposição das terras Sunda, o ancestral Passerida adentrou-se na Eurásia e divergiu rapidamente nas superfamílias Sylvioidea (172 gêneros, 83 BP), Muscicapoidea (123 gêneros, 33 BP), e Passeroidea (267 gêneros, 85 BP), com algumas diferenças de sua delimitação original (SIBLEY; AHLQUIST, 1990; SIBLEY; AHLQUIST; MONROE, 1988). No caso de Passeroidea, análises moleculares mais recentes têm encontrado topologias muito semelhantes aos resultados de Sibley e Ahlquist (1990), com apenas mínimas alterações (ERICSON; JOHANSSON, 2003; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008). Entretanto, Sylvioidea, e em menor grau Muscicapoidea, têm sido considerados os grupos mais problemáticos em Passeriformes desde a circunscrição original (ALSTROM et al., 2006; ERICSON et al., 2002; FREGIN et al., 2012; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008; SHELDON; GILL, 1996; SPELLMAN et al., 2008). Curiosamente, meus resultados indicam que a diversificação das principais linhagens em cada uma das três superfamílias foi praticamente simultânea, ocorrendo durante o Oligoceno médio e Mioceno inferior (29-20 Ma) (Figura 6, Tabela 3). Esta sobreposição indica que de fato Passerida provavelmente sofreu uma intensa e rápida radiação adaptativa assim que chegou às porções continentais do Velho Mundo (Eurásia e África).

O resultado mais importante em toda a minha topologia foi o monofiletismo da superfamília Sylvioidea (Figura 5). Este clado, em minhas análises, incluiu todos os gêneros (exceto *Regulus*) que Sibley e Ahlquist (1990) originalmente incluíram no grupo e, mais importante, todos os gêneros das famílias apontadas por estudos anteriores como não pertencentes a Sylvioidea, como Hyliotidae, Paridae, Remizidae e Stenostiridae, foram incluídos neste clado com alto suporte (83 BP) (Figura 5) (ALSTROM et al., 2006; ERICSON; JOHANSSON, 2003; FREGIN et al., 2012; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008; SHELDON; GILL,

1996). Os membros de Sylvioidea são extremamente diversos e distribuídos em áreas da África e Eurásia, porém somente uma pequena porção de seus gêneros é endêmica do Novo Mundo. Desta pequena parcela de gêneros endêmicos, a grande maioria só ocorre na América do Norte, e uma única família monotípica (Donacobiidae) é endêmica à América do Sul (ALSTROM et al., 2006; DEL HOYO et al., 1992). De acordo com meus resultados, Sylvioidea se diversificou rapidamente, antes mesmo das duas outras superfamílias Passerida, tendo suas principais linhagens já estabelecidas no Velho Mundo pela segunda metade do Oligoceno (29-25 Ma).

A topologia recuperada para Muscicapoidea também é inovadora em relação aos estudos anteriores, que frequentemente excluía o clado Bombycilloidea da delimitação original e mantinham o nome de Núcleo Muscicapoidea para a diversidade restante (ERICSON; JOHANSSON, 2003; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008; SPELLMAN et al., 2008). Neste trabalho, recuperei Muscicapoidea com mais linhagens do que qualquer outra proposta anterior, incluindo Bombycilloidea (SPELLMAN et al., 2008) e o clado Certhioidea (JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008). Após estudos alterarem a conformação original de Muscicapoidea *sensu* Sibley e Ahlquist (1990), estes grupos foram inseridos em lugares aleatórios na diversidade Passerida (CIBOIS; CRACRAFT, 2004; ERICSON; JOHANSSON, 2003; SPELLMAN et al., 2008), e somente Certhioidea era tentativamente associado a Muscicapoidea em algumas propostas (JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008). A topologia do presente estudo (Figura 5) mostra Muscicapoidea com três grandes clados: Bombycilloidea (9 gêneros, 100 BP), Certhioidea (18 gêneros, 88 BP) e Núcleo Muscicapoidea (Buphagidae, Mimidae, Sturnidae, Turdidae, Muscipidae e Cinclidae) (96 gêneros, 99 BP *sensu* Barker et al. 2002).

A terceira superfamília de Passerida, Passeroidea, apresenta uma pequena diversidade endêmica do Velho Mundo, como África e Eurásia, porém sua imensa diversidade se encontra exclusivamente no Novo Mundo (Figura 9). Curiosamente, tal impressionante diversidade nas Américas é fruto do menor número de invasões no continente quando comparada às demais

superfamílias (Figura 9). A grande maioria dessas invasões ocorreram no Oligoceno médio, por volta de 17-16 Ma (Tabela 4).

A grande diversidade de Passeroidea no Novo Mundo consiste em um clado tradicionalmente nomeado *Oscines novempennatae* ou ainda *New World Nine-primaried Oscines* (Figuras 5, 6, 9) (EDWARDS; JENNINGS; SHEDLOCK, 2005; KLICKA; JOHNSON; LANYON, 2000; SICK, 1997). Este nome é em alusão a uma característica morfológica encontrada em todos os membros deste grupo, a redução acentuada (e na grande maioria, perda total) da décima rêmige primária (rêmiges primárias são as dez primeiras penas mais externas das asas) (SICK, 1997). Entretanto, algumas outras linhagens passeriformes, por vezes muito distantes de Passeroidea e até mesmo fora de Passerida, possuem redução da décima primária. Um exemplo interessante é Vireonidae (Corvida), que por também ser endêmica ao Novo Mundo era frequentemente incluída na classificação dos *novempennatae* (SICK, 1997). Tendo em mente estas possíveis exceções convergentes, os “verdadeiros” *Oscines novempennatae* são descendentes de um ancestral exclusivo, apresentando forte afinidade evolutiva (177 gêneros; 96 BP). Apesar de massivamente distribuídos nas Américas, há um pequeno grupo parafilético de seis gêneros endêmicos do Velho Mundo, todos da família Emberizidae (Figura 9). Os *novempennatae* são tradicionalmente divididos em cinco famílias: Emberizidae, Icteridae, Parulidae, Thraupidae e Cardinalidae (BARKER et al., 2012). Em meus resultados, os *novempennatae* consistiram em um grupo parafilético de quatro linhagens classificadas como Thraupidae (GILL; DONSKER, 2012) e dois grandes clados, um contendo Emberizidae (26 gêneros, 69 BP), Icteridae (27 gêneros, 68 BP) e Parulidae (19 gêneros, 99 BP) e o outro com Cardinalidae inserida no meio da grande diversidade Thraupidae (89 gêneros, 10 BP) (Figura 5). O primeiro desses clados é consistente com outros estudos bem amostrados que focaram exclusivamente nas relações dos *novempennatae* (BARKER et al.,

2012), entretanto, não foi possível recuperar Thraupidae ou Cardinalidae como monofiléticas (ver Casos de Parafiletismo adiante).

A siringe complexa em Oscines lhes garante alta complexidade de vocalização e modulação do canto, o que pode ter providenciado uma grande vantagem na diversificação do grupo (CLAYTON; BALAKRISHNAN; LONDON, 2009; JARVIS, 2004; WARREN et al., 2010). Esta vantagem deve ter sido particularmente crítica na colonização das Américas, uma vez que o continente já se encontrava fervilhando com alta diversidade dos Suboscines quando os primeiros Oscines chegaram (Tabelas 3, 4) A seguir, darei ênfase nas chegadas ao continente Americano pelos Oscines e as possíveis interações com a fauna nativa. Tais interações podem estar associadas à geração dos padrões encontrados para as linhagens Oscines endêmicas ao Novo Mundo na Figura 9.

Tabela 4: Linhagens Oscines endêmicas do Novo Mundo. A data de divergência entre a linhagem do Novo Mundo e seu grupo irmão é assumida como a data de invasão daquela no continente Americano. Cores e siglas de acordo com a legenda. É possível notar os padrões apresentados na Figura 9, onde somente duas linhagens não-Passerida (Corvoidea) são exclusivas ao Novo Mundo. Passeroidea, Sylvioidea e Muscicapoidea apresentam também padrões marcantes entre si de endemismo no Novo Mundo. O número de linhagens endêmicas e sua diversidade no Novo Mundo (Figura 9) podem estar diretamente relacionados à ordem de chegada e às possíveis interações ecológicas (como competição) com a fauna autóctone (Suboscines).

Linhagens Oscines Endêmicas do Novo Mundo	Idade	95% HPD	Clado	Período	
Vireonidae/Oriolidae	23.8	21.5 - 26.2	Corvoidea	Mioc inf	
Gralhas do Novo Mundo	14	11.5 - 16.3		Mid-Mio	
<i>Auriparus/Remiz</i>	20.4	17 - 23.5	Sylvioidea	Mioc inf	
<i>Baeolophus/Parus</i>	10.5	8.1 - 13.3		Mioc sup	
<i>Psaltriparus/Aegithalos</i>	13	10.5 - 15.4		Mioc sup	
Andorinhas do Novo Mundo/Andorinhas cosmopolitas	15	12.4 - 17.5		Mioc med	
Donacobiidae/Bernieridae	19.1	16.9 - 21.4		Mioc inf	
<i>Chamaea/Chrysomma</i>	12.5	10. - 15.2		Mioc sup	
<i>Dulus/demais Bombycilloidea</i>	22.8	20.7 - 25	Muscicapoidea	Mioc inf	
(Ptilonotidae, Mohoidae)/Bombycillidae	20.2	18.2 - 22.1		Mioc inf	
Troglodytidae/(<i>Certhia</i> , Tichodromidae)	22.7	19.7 - 25.4		Mioc inf	
Mimidae/Sturnidae	17.8	15.7 - 19.9		Mioc inf	
<i>Sialia/(Myadestes, Necossyphus)</i>	17.4	15.5 - 19.3		Mioc med	
<i>Myadestes/Necossyphus</i>	14.8	12.5 - 16.9		Mioc med	
Clado <i>Ixoreus</i> /clado <i>Turdus</i>	14.2	12.3 - 16		Mioc sup	
Clado <i>Cichlherminia/Turdus</i>	6.1	3.6 - 6.1		Plio	
<i>Peucedramus/(Prunella, Núcleo Passeroidea)</i>	25.4	23.6 - 27.3	Passeroidea	Oligo-Mio	
(<i>Chlorophonia, Euphonia</i>)/Demais Fringillidae Velho Mundo	16.5	14.8 - 18.2		Mioc med	Legenda
Clado Fringillidae Novo Mundo/(<i>Carduelis, Loxia</i>)	12.2	10.4 - 14.1		Mioc sup	Transição Oligoceno-Mioceno
<i>Lamprospiza</i> /Demais <i>novempennatae</i>	17.7	16.4 - 19.2		Mioc med	Mioceno inferior
Emberizidae Novo Mundo/Emberizidae Velho Mundo	15.4	14.1 - 16.8		Mioc med	Mioceno médio
(Parulidae, Icteridae)/Emberizidae	16.6	15.3 - 17.9		Mioc med	Mioceno superior
(Thraupidae+clado Cardinalidae)/(Icteridae, Parulidae, Emberizidae)	17.5	16.1 - 18.9		Mioc med	Plioceno

As superfamílias de Passerida apresentam marcantes padrões na colonização do Novo Mundo (Figura 9). Em Muscicapoidea, apesar de ser a menor das três superfamílias, seus gêneros parecem estar quase igualmente distribuídos como endêmicos do Novo e Velho Mundos (Figura 9). Sylvioidea se encontrava diversificando intensa e rapidamente no Velho

Mundo logo no Oligoceno médio, apresentando mais gêneros endêmicos a essa região do que Muscicapoidea e Passeroidea combinados (Figura 9). O hábito generalista-insetívoro encontrado fortemente em Sylvioidea e Muscicapoidea (ALSTROM et al., 2006; CIBOIS; CRACRAFT, 2004; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003) sugere a possibilidade de ter havido uma competição direta entre os membros dessas duas linhagens no Velho Mundo. Logo, a antecipada diversificação de Sylvioidea no Velho Mundo pode ter dominado rapidamente os nichos de insetivoria, restringindo a diversificação de Muscicapoidea ali. Isto é visível na Figura 6 e Tabela 3, onde os três clados de Muscicapoidea somente radiaram no início do Mioceno (24-22 Ma). Esta competição pode ter estimulado as múltiplas entradas de Muscicapoidea no Novo Mundo (Figura 9). Isto é possível, pois ao mesmo tempo que Muscicapoidea apresenta o menor número absoluto de gêneros comparado a Sylvioidea e Passeroidea, é a superfamília com o maior número de linhagens independentes nas Américas.

Meus resultados indicam que as famílias Mimidae e Troglodytidae (Muscicapoidea) e Vireonidae (Corvoidea) foram os primeiros Oscines a chegar ao Novo Mundo, durante o Mioceno inferior (Tabela 4). Esta primeira chegada, aliada ao hábito generalista-insetívoro e um grande espectro de habitats (florestas densas e áreas abertas) dessas linhagens (BEECHER, 1953; CIBOIS; CRACRAFT, 2004; ERICSON; IRESTEDT; JOHANSSON, 2003) podem ter garantido seu limitado sucesso no continente, que já se encontrava fortemente dominado pelos Tyrannides desde o Eoceno (Tabela 3). Isto pode ter sido crucial para reduzir drasticamente a disponibilidade de nichos insetívoros para quaisquer outras linhagens Oscines, e provavelmente esta saturação foi a maior responsável por restringir os Sylvioidea, que chegaram somente ao fim do Mioceno (Figura 9, Tabela 4).

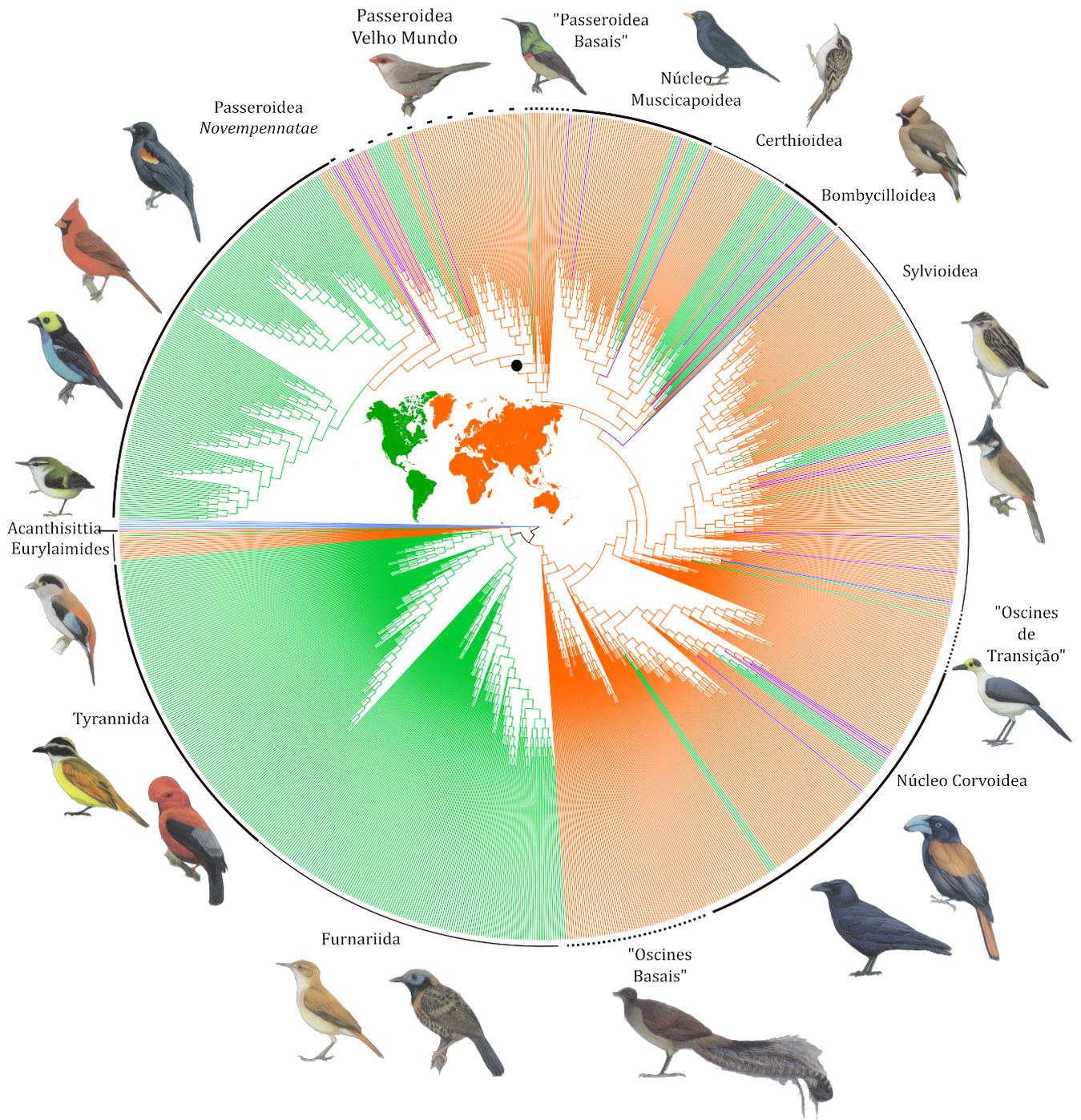


Figura 9: Distribuição geográfica para os gêneros Passeriformes, baseada na divisão Novo Mundo (verde) - Velho Mundo (laranja) traçada sobre a árvore de Máxima Verossimilhança construída no programa RAxML com nove loci e 1061 gêneros. Essas duas regiões são intimamente conectadas à história evolutiva de Passeriformes, o que é evidenciado pelo grande número de gêneros endêmicos em ambas as regiões. É possível notar a grande diversidade de Tyrannídeos, os passeriformes autóctones no Novo Mundo desde a quebra da Gondwana, e diferentes padrões de colonização e endemismo das linhagens Oscínes nesta região. Em gêneros não-Passerídeos, somente duas linhagens foram capazes de se estabelecer como endêmicas do Novo Mundo. Em Passerídeos, Sylvioidea apresenta o menor número de gêneros endêmicos ao Novo Mundo, e praticamente todos restritos à América do Norte. Muscicapoidea, apesar de ser a menor superfamília em número de gêneros, apresenta o maior número de entradas independentes no Novo Mundo quando comparada a qualquer outra. Passeroidea, por fim, contrasta o menor número de invasões com a maior diversidade de gêneros Passeriformes nas Américas. O maior grupo de Passeroidea do Novo Mundo são os tradicionalmente conhecidos como Oscínes *novempennatae*, e estes representam praticamente um terço de toda a diversidade Passerídeos. O círculo preto marca a possível transição do hábito nectarívoro de Passeroidea para hábitos granívoros-frugívoros, encontrados quase em todos os membros do Núcleo Passeroidea, a qual pode ter sido uma grande alavanca para a extrema diversificação deste grupo.

Os hábitos de forrageamento do ancestral Passeroidea podem ter guiado esta linhagem para um caminho evolutivo completamente diferente de Muscipoidea a Sylvioidea. Os primeiros ramos a divergir em Passeroidea são exclusivamente nectarívoros, o que pode indicar que esta tenha sido uma característica herdada do ancestral (DEL HOYO et al., 1992; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008) (Figura 9, “Passeroidea Basais”). Em minha topologia, a posição de Prunellidae como grupo irmão do Núcleo Passeroidea corrobora a hipótese de que neste nó houve uma importante mudança de hábito alimentar. Prunellidae ainda apresenta a morfologia do bico de um tipo plesiomórfico para o grupo, fino e adaptado à nectarivoria (JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008), enquanto que membros de Passeroidea apresentam, praticamente sem exceção, bicos fortes e robustos, adaptados à granivoria (DEL HOYO et al., 1992; JOHANSSON; FJELDSA; BOWIE, 2008) (Figura 9, círculo preto). Esta transição para o hábito granívoro-frugívoro, encontrado em todas as linhagens do Núcleo Passeroidea, pode ter sido fundamental para a explosão de sua diversidade (250 gêneros, 53 BP), e certamente foi responsável por enviar as grandes radiações rumo ao Novo Mundo.

Por fim, a exclusividade de hábitos nectarívoros e frugívoros em Passeroidea possivelmente permitiram que esta linhagem se diversificasse em uma imensa variedade de nichos com mínima sobreposição com Muscipoidea ou Sylvioidea. Particularmente, o sucesso inédito na diversificação de Passeroidea, em especial os Oscines *novempennatae*, durante sua chegada ao Novo Mundo na segunda metade do Mioceno (Tabela 4), pode ter sido uma combinação de fatores. Primeiramente, de modo semelhante ao que ocorreu com Muscipoidea e Sylvioidea, Passeroidea possivelmente não enfrentou qualquer tipo de competição com os Tyrannides, pois não há Suboscines granívoros, e os poucos que exploram o hábito de frugivoria ocupam principalmente o ambiente florestal (SICK, 1997). Como consequência, os Passeroidea tiveram uma imensa disponibilidade de nichos ao chegarem no Novo Mundo, onde as Angiospermas de frutos carnosos já haviam se estabelecido desde o

Paleógeno (BOLMGREN; ERIKSSON, 2010). Logo, a completa independência ecológica com a maior parte da fauna autóctone aliada à acumulada diversidade inexplorada de frutos e sementes podem ter sido os protagonistas na diversificação de Passeroidea no Novo Mundo. Outro fator importante documentado recentemente é a alta taxa de diversificação líquida dentre os *novempennatae* (BARKER et al., 2012), que pode ter acelerado o número de especiações de forma anômala às demais linhagens Oscines no continente.

Casos de Parafiletismo

Esta seção apresenta, de forma sucinta, os 12 casos em que as famílias Passeriformes, foco deste estudo, não foram recuperadas como clados de acordo com a classificação utilizada (GILL; DONSKER, 2012). Como mencionado em Resultados, estes casos de parafiletismo representam somente um ou poucos gêneros que saíram do restante da diversidade monofilética de sua família original, mostrando maior afinidade por outras linhagens. A grande maioria está de acordo com estudos recentes e praticamente todos constam nas “sugestões e comentários” da própria referência (GILL; DONSKER, 2012). Estes casos são de grande interesse para futuros estudos taxonômicos e nomenclaturais, pois fornecem evidências de quais gêneros merecem uma atenção especial quanto à sua atual classificação. Todas as 12 famílias parafiléticas foram situadas em Oscines, distribuídas em Corvoidea (5), Sylvioidea (1), Muscicapoidea (2) e Passeroidea (4) e estão indicadas na Figura 5 por um asterisco por caso.

Em Corvoidea, os gêneros *Cinclosoma* e *Ptilorhoa* foram separados da família Psophodidae, requerendo o nome próprio Cinclosomatidae, de acordo com NORMAN et al., (2009). Também de acordo com estes autores, o gênero *Peltops* (classificado em Cracticidae *sensu* Gill and Donsker 2012) inseriu-se em Artamidae; o gênero *Chaetorhynchus* (Dicruridae *sensu* Gill and Donsker 2012) agrupou-se com Rhipiduridae e o gênero *Rhagologus* foi excluído da família Pachycephalidae, inserindo-se no grande clado contendo as famílias Artamidae-

Cracticidae-Malaconotidae-Vaingidae. Por último em Corvoidea, minhas análises foram capazes de detectar que o gênero *Bias* de fato não possui afinidade filogenética com Platysteyridae, mas sim com Tephrodornithidae (MOYLE et al., 2006).

No único caso detectado em Sylvioidea, pude confirmar a exclusão do gênero *Alcippe* de Timaliidae (ALSTROM et al., 2006), entretanto, ao invés de agrupar-se com Pellorneidae como sugerido por estes autores, em minha topologia final *Alcippe* aparece como grupo irmão do clado Pelloerneidae-Leiotrichidae. Vale ressaltar que Alstrom e colaboradores não amostraram a família Leiotrichidae, portanto a proposta deles baseou-se em uma filogenia menos completa em relação aos meus resultados. Em Muscicapoidea ocorreu a separação da família de somente dois gêneros Certhiidae, onde o gênero *Saplornis* formou um clado com Sittidae e *Certhia* formou outro com Tichodromidae. O segundo caso em Muscicapoidea consistiu na exclusão de três gêneros tradicionalmente classificados como Turdidae (*Myophonus*, *Alethe*, *Brachypteryx*) e sua inserção em meio à diversidade de Muscicapidae, em acordo com SANGSTER et al., (2010).

Finalmente, em Passeroidea, os gêneros *Plocepasser* e *Philetairus* foram excluídos de Passeridae e aninhados em Ploceidae, e o gênero *Carpospiza*, também saiu de Passeridae agrupando como grupo irmão de Motacillidae. O gênero *Porphyrospiza* (Emberizidae) aninhou-se profundamente na diversidade Thraupidae, e *Parkerthraustes* não mostrou afinidade alguma com Cardinalidae, inserindo-se também dentre os demais Thraupidae. A família Thraupidae mostrou-se extremamente problemática, pois muitos de seus gêneros foram espalhados dentre os demais *novempennatae* como *Catamblyrhynchus*, *Lamprospiza*, *Mitrospingus*, *Calyptophilus*, *Rhodinocichla*, *Phaenicophilus*, *Nesospingus*, *Spindalis* e *Gubernatrix* (Figura 5). Por fim, o clado correspondente à família Cardinalidae (15 gêneros, 42 BP) inseriu-se profundamente na diversidade Thraupidae, colocando em questão o caráter monofilético de Thraupidae ainda mais.

Conclusões

A extensa amostragem do presente trabalho mostrou que as relações filogenéticas em Passeriformes são extremamente sensíveis à densidade taxonômica, mostrando-se mais crítica do que a técnica de análise. De um modo geral, meus resultados evidenciam que a Tapeçaria de Sibley e Ahlquist (1990) foi extremamente consistente em propor as principais linhagens de Passeriformes, mais do que se pensava anteriormente. A recuperação de clados como Sylvioidea e Muscicapoidea, praticamente idênticos ao apresentado na Tapeçaria, indica que os estudos anteriores que os consideraram “problemáticos” provavelmente estavam enviesados pelo baixo tamanho amostral utilizado.

Meus resultados também apontam para a necessidade de múltiplos pontos de calibração para se obter uma escala temporal confiável e robusta para grupos de extrema radiação como Passeriformes. Assim, pude, de certa forma, recuperar a hipótese inicial de Sibley e Ahlquist (1990) sobre a diversificação paralela de duas grandes linhagens Oscines, uma no Hemisfério Sul (i.e., Corvoidea) e a segunda no Hemisfério Norte (i.e., Passerida).

Estudos futuros que apliquem técnicas para reconstrução de interações ecológicas, como modelos de competição por nichos, certamente poderão testar e enriquecer as hipóteses propostas nesta dissertação. Com o avanço de modelos e softwares, também será possível inserir o conjunto de dados deste trabalho em contextos biogeográficos detalhados.

Grandes avanços têm ocorrido em estudos com Passeriformes na última década. Minhas expectativas são de que filogenias cada vez maiores e completas (nível de espécie) e o promissor campo da filogenômica irão contribuir ainda mais na elucidação da Árvore da Vida da maior radiação de aves viventes.

Referências

- ABERER, A. J.; KROMPASS, D.; STAMATAKIS, A. Pruning Rogue Taxa Improves Phylogenetic Accuracy: An Efficient Algorithm and Webservice. **Systematic Biology**, v. 62, n. 1, p. 162–166, 2013.
- ABERER, A. J.; STAMATAKIS, A. **A Simple and Accurate Method for Rogue Taxon Identification Anais...** In: IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICINE (BIBM). Atlanta, GA: IEEE, 2011
- ALFARO, M. E. et al. Nine exceptional radiations plus high turnover explain species diversity in jawed vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 32, p. 13410–13414, 2009.
- ALI, J. R.; AITCHISON, J. C. Gondwana to Asia: Plate tectonics, paleogeography and the biological connectivity of the Indian sub-continent from the Middle Jurassic through latest Eocene (166–35 Ma). **Earth-Science Reviews**, v. 88, p. 145–166, 2008.
- ALI, J. R.; HUBER, M. Mammalian biodiversity on Madagascar controlled by ocean currents. **Nature**, v. 463, n. 7281, p. 653–656, 2010.
- ALI, J. R.; KRAUSE, D. W. Late Cretaceous bioconnections between Indo-Madagascar and Antarctica: refutation of the Gunnerus Ridge causeway hypothesis. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 1855–1872, 2011.
- ALSTROM, P. et al. Phylogeny and classification of the avian superfamily Sylvioidea. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, n. 2, p. 381–397, 2006.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- AMES, P. L. **The Morphology of the Syrinx in Passerine Birds**. [s.l.] Peabody Museum of Natural History, Yale University, 1971.
- BALLMANN, P. Die Vögel aus der altburdigalen Spaltenfüllung von Wintershof (West) bei Eichstätt in Bayern. **Zitteliana**, v. 1, p. 5–60, 1969.
- BARKER, F. K. Phylogeny and Diversification of Modern Passerines. In: DYKE, G. J.; KAISER, G. W. (Eds.). **Living Dinosaurs: The Evolutionary History of Modern Birds**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 235–256.
- BARKER, F. K. et al. Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11040–11045, 2004.
- BARKER, F. K. et al. Going to Extremes: Contrasting Rates of Diversification in a Recent Radiation of New World Passerine Birds. **Systematic Biology**, v. 62, p. 298–320, 2012.
- BARKER, F. K.; BARROWCLOUGH, G. F.; GROTH, J. G. A phylogenetic hypothesis for passerine birds: taxonomic and biogeographic implications of an analysis of nuclear DNA sequence data. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 269, n. 1488, p. 295–308, 2002.
- BEECHER, W. J. A Phylogeny of the Oscines. **Auk**, v. 70, p. 270–333, 1953.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D46–D51, 2010.
- BERESFORD, P. et al. African endemics span the tree of songbirds (Passeri): molecular systematics of several evolutionary “enigmas”. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 272, n.

1565, p. 849–858, 2005.

BOLES, W. E. Preliminary analysis of the Passeriformes from Riversleigh, northwestern Queensland, Australia, with the description of a new species of lyrebird. **Cour. Forsch. Inst. Senckenberg**, v. 181, p. 163–170, 1995.

BOLES, W. E. The Worlds Oldest Songbird. **Nature**, v. 374, n. 6517, p. 21–22, 1995.

BOLES, W. E. Fossil songbirds (Passeriformes) from the Early Eocene of Australia. **Emu**, v. 97, p. 43–50, 1997.

BOLES, W. E. Fossil honeyeaters (Meliphagidae) from the Late Tertiary of Riversleigh, north-western Queensland. **Emu**, v. 105, n. 1, p. 21–26, 2005.

BOLMGREN, K.; ERIKSSON, O. Seed mass and the evolution of fleshy fruits in angiosperms - Bolmgren. **Oikos**, 2010.

BURNS, K. J.; HACKETT, S. J.; KLEIN, J. Phylogenetic relationships of Neotropical honeycreepers and the evolution of feeding morphology. **Journal of Avian Biology**, v. 34, n. 4, p. 360–370, 2003.

BURNS, K. J.; HACKETT, S. J.; KLEIN, N. K. Phylogenetic relationships and morphological diversity in Darwin's finches and their relatives. **Evolution**, v. 56, n. 6, p. 1240–1252, 2002.

CHARLES, M. A. Tectonics of the New Guinea area. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 19, p. 17–41, 1991.

CHATTERJEE, S.; GOSWAMI, A.; SCOTESE, C. R. The Longest Voyage: Tectonic, Magmatic, and Paleoclimatic Evolution of the Indian Plate During Its Northward Flight From Gondwana to Asia. **Gondwana Research**, v. 23, p. 238–267, 2012.

CHESSER, R. T.; HAVE, TEN, J. On the phylogenetic position of the scrub-birds (Passeriformes : Menurae : Atrichornithidae) of Australia. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. 4, p. 471–476, 2007.

CHRISTIDIS, L.; SCHODDE, R. Relationships of Australo-Papuan Songbirds Protein Evidence. **Ibis**, v. 133, n. 3, p. 277–285, 1991.

CIBOIS, A.; CRACRAFT, J. Assessing the passerine “Tapestry”: phylogenetic relationships of the Muscipoidea inferred from nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 264–273, 2004.

CLARAMUNT, S. Discovering Exceptional Diversifications at Continental Scales: The Case of the Endemic Families of Neotropical Suboscine Passerines. **Evolution**, v. 64, n. 7, p. 2004–2019, 2010.

CLARK, G. A. Toe Fusion in Oscines. **Wilson Bulletin**, v. 93, n. 1, p. 67–76, 1981.

CLAYTON, D. F.; BALAKRISHNAN, C. N.; LONDON, S. E. Integrating genomes, brain and behavior in the study of songbirds. **Current biology : CB**, v. 19, n. 18, p. R865–73, 2009.

COOPER, R. A.; MILLENER, P. R. The New Zealand biota: Historical background and new research. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 12, p. 429–433, 1993.

CRACRAFT, J. Continental drift, paleoclimatology, and the evolution and biogeography of birds. **Journal of Zoology**, v. 169, n. 4, p. 455–543, 1973.

CRACRAFT, J. Toward a Phylogenetic Classification of the Recent Birds of the World (Class Aves). **Auk**,

v. 98, n. 4, p. 681–714, 1981.

CRACRAFT, J. et al. Phylogenetic relationships among modern birds (Neornithes) - Toward an avian tree of life. **Assembling the Tree of Life**, p. 468–489, 2004.

DEL HOYO, J. et al. **Handbook of Birds of the World Vol. 1-16**. Barcelona: Lynx Edicions, 1992-2011. v. 1-16

DENK, T. et al. The Biogeographic History of Iceland – The North Atlantic Land Bridge Revisited. In: **Late Cainozoic Floras of** Topics in Geobiology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. v. 35p. 647–668.

DENK, T.; GRIMSSON, F.; ZETTER, R. Episodic migration of oaks to Iceland: Evidence for a North Atlantic “land bridge” in the latest Miocene. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 2, p. 276–287, 2010.

DERRYBERRY, E. P. et al. Lineage Diversification and Morphological Evolution in a Large-Scale Continental Radiation: the Neotropical Ovenbirds and Woodcreepers (Aves: Furnariidae). **Evolution**, v. 65, n. 10, p. 2973–2986, 2011.

DRUMMOND, A. J. et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **Plos Biology**, v. 4, n. 5, p. 699–710, 2006.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Mol Biol Evol**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 7, p. 7–214, 2007.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EDWARDS, S. V.; BOLES, W. E. Out of Gondwana: the origin of passerine birds. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 8, p. 347–349, 2002.

EDWARDS, S. V.; JENNINGS, W. B.; SHEDLOCK, A. M. Phylogenetics of modern birds in the era of genomics. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 272, n. 1567, p. 979–992, 2005.

ERICSON, P. G. P. Evolution of terrestrial birds in three continents: biogeography and parallel radiations. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 5, p. 813–824, 2011.

ERICSON, P. G. P. et al. A Gondwanan origin of passerine birds supported by DNA sequences of the endemic New Zealand wrens. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 269, n. 1488, p. 235–241, 2002.

ERICSON, P. G. P. et al. Systematic affinities of the lyrebirds (Passeriformes : Menura), with a novel classification of the major groups of passerine birds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, n. 1, p. 53–62, 2002.

ERICSON, P. G. P.; IRESTEDT, M.; JOHANSSON, U. S. Evolution, biogeography, and patterns of diversification in passerine birds. **Journal of Avian Biology**, v. 34, n. 1, p. 3–15, 2003.

ERICSON, P. G. P.; JOHANSSON, U. S. Phylogeny of Passerida (Aves : Passeriformes) based on nuclear and mitochondrial sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 1, p. 126–138, 2003.

- EVERITT, B. S.; LANDAU, S.; LEESE, M. Cluster Analysis. **Arnold**, 2001.
- EZCURRA, M. D.; AGNOLIN, F. L. A New Global Palaeobiogeographical Model for the Late Mesozoic and Early Tertiary. **Systematic Biology**, v. 61, n. 4, p. 553–566, 2012.
- FEDUCCIA, A. Morphology of Bony Stapes in New and Old World Suboscines - New Evidence for Common Ancestry. **Auk**, v. 91, n. 2, p. 427–429, 1974.
- FEDUCCIA, A. Morphology of Bony Stapes in Menuridae and Acanthisittidae - Evidence for Oscine Affinities. **Wilson Bulletin**, v. 87, n. 3, p. 418–420, 1975.
- FEDUCCIA, A. A Model for the Evolution of Perching Birds. **Systematic Biology**, v. 26, n. 1, p. 19–31, 1977.
- FEDUCCIA, A. **Comments on the phylogeny of perching birds Anais...** In: PROCEEDINGS OF THE BIOLOGICAL SOCIETY OF WASHINGTON. Washington, DC: 1979
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–376, 1981.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783–791, 1985.
- FELSENSTEIN, J. Inferring phylogenies. **Sunderland**, 2004.
- FITCH, W. M. Toward Defining the Course of Evolution: Minimum Change for a Specific Tree Topology. **Systematic Biology**, v. 20, n. 4, p. 406–416, 1 dez. 1971.
- FJELDSA, J. et al. Sapayoa aenigma: a New World representative of “Old World suboscines”. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 270, p. S238–S241, 2003.
- FREGIN, S. et al. New insights into family relationships within the avian superfamily Sylvioidea (Passeriformes) based on seven molecular markers. **Bmc Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 157, 25 2012.
- GAINA, C. et al. The Opening of the Tasman Sea: A Gravity Anomaly Animation. **Earth Interactions**, v. 2, p. 1–23, 1998.
- GARDNER, J. L. et al. Phylogeny and evolution of the Meliphagoidea, the largest radiation of Australasian songbirds. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1087–1102, 2010.
- GARROD, A. H. On certain muscles of the thigh of birds, and on their value in classification. **Proceedings of Zoological Society**, p. 626–644, 1873.
- GARROD, A. H. On some anatomical peculiarities which bear upon the major divisions of passerine birds. Part I. **Proceedings of Zoological Society**, p. 506–519, 1876.
- GARROD, A. H.; FORBES, W. A. **The collected scientific papers of the late Alfred Henry Garrod, M.A., F.R.S.** London: R.H. Porter, 1881.
- GERNHARD, T. The conditioned reconstructed process. **Journal of Theoretical Biology**, v. 253, n. 4, p. 769–778, 2008.
- GILL, F.; DONSKER, D. **IOC World Bird Names (v 3.2)**. Disponível em: <http://www.worldbirdnames.org>. Acesso em: nov. 2012.

- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–224, 2010.
- GRADSTEIN, F. M. et al. **The Geologic Time Scale 2012**. [s.l.] Elsevier Science Publishers, 2012.
- HADDRATH, O.; BAKER, A. J. Multiple nuclear genes and retroposons support vicariance and dispersal of the palaeognaths, and an Early Cretaceous origin of modern birds. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 279, n. 1747, p. 4617–4625, 22 2012.
- HALL, R. The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. **Biogeography and geological evolution of SE Asia**, p. 99–131, 1998.
- HALL, R. Cenozoic geological and plate tectonic evolution of SE Asia and the SW Pacific: computer-based reconstructions, model and animations. **Journal of Asian Earth Sciences**, v. 20, n. 4, p. 353–431, 2002.
- HARSHMAN, J. Reweaving the Tapestry - What Can We Learn from Sibley and Ahlquist (1990). **Auk**, v. 111, n. 2, p. 377–388, 1994.
- HÄRLID, A.; JANKE, A.; ARNASON, U. The complete mitochondrial genome of *Rhea americana* and early avian divergences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, n. 6, p. 669–679, 1998.
- HEDGES, S. B. et al. Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals. **Nature**, v. 381, n. 6579, p. 226–229, 1996.
- HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Calibrated tree priors for relaxed phylogenetics and divergence time estimation. **Systematic Biology**, v. 61, n. 1, p. 138–149, 2012.
- HENNIG, W. Phylogenetic systematics. **Annual Review of Entomology**, 1965.
- HO, S. Y. W. An examination of phylogenetic models of substitution rate variation among lineages. **Biology Letters**, v. 5, n. 3, p. 421–424, 2009.
- HO, S. Y. W.; PHILLIPS, M. J. Accounting for Calibration Uncertainty in Phylogenetic Estimation of Evolutionary Divergence Times. **Systematic Biology**, v. 58, n. 3, p. 367–380, 2009.
- HOLT, B. G. et al. An Update of Wallace's Zoogeographic Regions of the World. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 74–78, 2013.
- HOORN, C. et al. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**, v. 330, n. 6006, p. 927–931, 2010.
- IRESTEDT, M.; OHLSON, J. I. The division of the major songbird radiation into Passerida and “core Corvoidea” (Aves : Passeriformes) - the species tree vs. gene trees. **Zoologica Scripta**, v. 37, n. 3, p. 305–313, 2008.
- IZQUIERDO-CARRASCO, F.; SMITH, S. A.; STAMATAKIS, A. Algorithms, data structures, and numerics for likelihood-based phylogenetic inference of huge trees. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 470, 2011.
- JARVIS, E. D. Learned birdsong and the neurobiology of human language. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1016, p. 749–777, 2004.
- JENŐ, K.; JÁNOS, H. Észak-Magyarország madárvilága a miocénben. II. Rész – The avifauna in North Hungary during the Miocene. Part II. **Földtani Közlöni**, v. 142, n. 2, p. 149–168, 2012.

- JETZ, W. et al. The global diversity of birds in space and time. **Nature**, v. 491, p. 444–448, 2012.
- JOHANSSON, U. S.; FJELDSA, J.; BOWIE, R. C. K. Phylogenetic relationships within Passerida (Aves : Passeriformes): A review and a new molecular phylogeny based on three nuclear intron markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 3, p. 858–876, 2008.
- JONSSON, K. A. et al. Systematic placement of an enigmatic Southeast Asian taxon *Eupetes macrocerus* and implications for the biogeography of a main songbird radiation, the Passerida. **Biology Letters**, v. 3, n. 3, p. 323–326, 2007.
- JONSSON, K. A. et al. Major global radiation of corvid birds originated in the proto-Papuan archipelago. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 6, p. 2328–2333, 2011.
- JONSSON, K. A.; FJELDSA, J. Determining biogeographical patterns of dispersal and diversification in oscine passerine birds in Australia, Southeast Asia and Africa. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 7, p. 1155–1165, 2006.
- KLICKA, J.; JOHNSON, K. P.; LANYON, S. M. New world nine-primaried oscine relationships: Constructing a mitochondrial DNA framework. **Auk**, v. 117, n. 2, p. 321–336, 2000.
- KUMAR, S. Molecular clocks: four decades of evolution. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 8, p. 654–662, 2005.
- LAIRD, M. G.; BRADSHAW, J. D. The break-up of a long-term relationship: the Cretaceous separation of New Zealand from Gondwana. **Gondwana Research**, v. 7, n. 1, p. 273–286, 2004.
- LANAVE, C. et al. A New Method for Calculating Evolutionary Substitution Rates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 20, n. 1, p. 86–93, 1984.
- LANFEAR, R. et al. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 6, p. 1695–1701, 2012.
- LARTILLOT, N.; PHILIPPE, H. Improvement of molecular phylogenetic inference and the phylogeny of Bilateria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 363, n. 1496, p. 1463–1472, 27 2008.
- LI, Z. X.; POWELL, C. M. An outline of the palaeogeographic evolution of the Australasian region since the beginning of the Neoproterozoic. **Earth-Science Reviews**, v. 53, n. 3-4, p. 237–277, 2001.
- MADDISON, W. P. Gene Trees in Species Trees. **Systematic Biology**, v. 46, n. 3, p. 523–536, 1997.
- MADDISON, W. P.; KNOWLES, L. Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. **Systematic Biology**, v. 55, n. 1, p. 21–30, 2006.
- MANEGOLD, A. Earliest fossil record of the Certhioidea (treecreepers and allies) from the early Miocene of Germany. **Journal of Ornithology**, v. 149, n. 2, p. 223–228, 2008.
- MANEGOLD, A.; MAYR, G.; MOURER-CHAUVIRÉ, C. Miocene songbirds and the composition of the European Passeriform Avifauna. **Auk**, v. 121, n. 4, p. 1155–1160, 2004.
- MARINCOVICH, L.; GLADENKOV, A. Y. Evidence for an early opening of the Bering Strait. **Nature**, v. 397, n. 6715, p. 149–151, 1999.
- MAYR, E. The sequence of songbird families. **Condor**, v. 60, p. 194–195, 1958.

- MAYR, G. On the phylogenetic relationships of trogons (Aves, Trogonidae). **Journal of Avian Biology**, v. 34, n. 1, p. 81–88, 2003.
- MAYR, G. The Paleogene fossil record of birds in Europe. **Biological Reviews**, v. 80, n. 04, p. 515–542, 2005.
- MAYR, G. The age of the crown group of passerine birds and its evolutionary significance – molecular calibrations versus the fossil record. **Systematics and Biodiversity**, v. 11, n. 1, p. 7–13, 2013.
- MAYR, G.; MANEGOLD, A. The oldest European fossil songbird from the early Oligocene of Germany. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 4, p. 173–177, 2004.
- MCKENNA, M. C. Cenozoic Paleogeography of North Atlantic Land Bridges. In: BOTT, M. H. P. et al. (Eds.). **Structure and Development of the Greenland- Scotland Ridge**. New York: Plenum Press, 1983. p. 351–399.
- MILLER, K. G. The Phanerozoic Record of Global Sea-Level Change. **Science**, v. 310, n. 5752, p. 1293–1298, 2005.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. **The CIPRES science gateway: enabling high-impact science for phylogenetics researchers with limited resources Anais...** In: PROCEEDINGS OF THE 1ST CONFERENCE OF THE EXTREME SCIENCE AND ENGINEERING DISCOVERY ENVIRONMENT: BRIDGING FROM THE EXTREME TO THE CAMPUS AND BEYOND. Chicago, Illinois: ACM, 2012
- MILLER, R. E. et al. Potential Applications and Pitfalls of Bayesian Inference of Phylogeny. **Systematic Biology**, v. 51, n. 5, p. 673–688, 2002.
- MILNE, R. I. Phylogeny and biogeography of *Rhododendron* subsection *Pontica*, a group with a tertiary relict distribution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, n. 2, p. 389–401, 2004.
- MOURER-CHAUVIRÉ, C. Dynamics of the avifauna during the paleogene and the early neogene of France. Settling of the recent fauna. **Acta zoologica cracoviensia**, v. 38, p. 325–342, 1995.
- MOYLE, R. G. et al. Reconsideration of the phylogenetic relationships of the enigmatic Bornean Bristlehead (*Pityriasis gymnocephala*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, p. 893–898, 2006.
- MOYLE, R. G. et al. Phylogeny and evolutionary history of Old World suboscine birds (Aves : Eurylaimides). **American Museum Novitates**, n. 3544, p. 1–22, 2006.
- MOYLE, R. G. et al. Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariides). **Cladistics**, v. 25, n. 4, p. 386–405, 2009.
- MÜLLER, J. **Über die bisher unbekanntenen typischen Verschiedenheiten der Stimmorgane der Passerinen**. Berlin: Abhandlungen der königlichen Akademie der Wissenschaften, 1847. p. 1–87
- MÜLLER, J. et al. Eocene lizard from Germany reveals amphisbaenian origins. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 364–367, 2011.
- MÜLLER, J.; GARROD, A. H. **Johannes Müller on certain variations in the vocal organs of the Passeres that have hitherto escaped notice**. F J Bell. Oxford: Clarendon Press, 1858.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000.
- NILSSON, M. A. et al. Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana.

Gene, v. 340, n. 2, p. 189–196, 2004.

NORIEGA, J. I.; CHIAPPE, L. M. An Early Miocene Passeriform from Argentina. **Auk**, v. 110, n. 4, p. 936–938, 1993.

NORMAN, J. A. et al. A multi-gene phylogeny reveals novel relationships for aberrant genera of Australo-Papuan core Corvoidea and polyphyly of the Pachycephalidae and Psophodidae (Aves: Passeriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 488–497, 2009.

OHLSON, J. I. et al. Phylogeny and classification of the New World suboscines (Aves, Passeriformes). **Zootaxa**, v. 1, p. 1–35, 2013.

OLIVEIRA, F. B. DE; MOLINA, E. C.; MARROIG, G. Paleogeography of the South Atlantic: a Route for Primates and Rodents into the New World? In: GARBER, P. A.; ESTRADA, A.; STRIER, K. B. (Eds.). **South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York, NY: Springer, 2009. p. 55–68.

PARHAM, J. F. et al. Best Practices for Justifying Fossil Calibrations. **Systematic Biology**, v. 61, n. 2, p. 346–359, 2012.

PICK, K. S. et al. Improved Phylogenomic Taxon Sampling Noticeably Affects Nonbilaterian Relationships. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 9, p. 1983–1987, 2010.

POORE, H. R. et al. Neogene overflow of Northern Component Water at the Greenland-Scotland Ridge. **Geochemistry, Geophysics, Geosystems**, v. 7, p. 1–24, 2006.

POUX, C. et al. Arrival and diversification of caviomorph rodents and platyrrhine primates in South America. **Systematic Biology**, v. 55, n. 2, p. 228–244, 2006.

PRUM, R. O. Phylogeny, Biogeography, and Evolution of the Broadbills (Eurylaimidae) and Asities (Philepittidae) Based on Morphology. **The Auk**, v. 110, n. 2, p. 304–324, 1993.

RAIKOW, R. J. Monophyly of the Passeriformes - Test of a Phylogenetic Hypothesis. **Auk**, v. 99, n. 3, p. 431–445, 1982.

RAIKOW, R. J. **Hindlimb Myology and Evolution of the Old World Suboscine Passerine Birds (Acanthisittidae, Pittidae, Philepittidae, Eurylaimidae)**. Washington DC: American Ornithologists' Union, 1987.

RAIKOW, R. J.; BLEDSOE, A. H. Phylogeny and evolution of the passerine birds. **Bioscience**, v. 50, n. 6, p. 487–499, 2000.

RAMBAUT, A.; BROMHAM, L. Estimating divergence dates from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 4, p. 442–448, 1998.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. **Tracer v. 1.4**, 2007. Disponível em:
<<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>

RANNALA, B. Identifiability of parameters in MCMC Bayesian inference of phylogeny. **Systematic Biology**, v. 51, n. 5, p. 754–760, 2002.

RANNALA, B.; YANG, Z. H. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference - Springer. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, p. 304–311, 1996.

REIS, DOS, M.; YANG, Z. H. Approximate likelihood calculation on a phylogeny for Bayesian estimation of

- divergence times. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 7, p. 2161–2172, 2011.
- RICKLEFS, R. E. Small clades at the periphery of passerine morphological space. **American Naturalist**, v. 165, n. 6, p. 43–659, 2005.
- RICKLEFS, R. E. Species richness and morphological diversity of passerine birds. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2012.
- ROBINSON, W. D. et al. Diversification of Life Histories in New World Birds. **Auk**, v. 127, n. 2, p. 253–262, 2010.
- ROSENBERG, M. S.; KUMAR, S. Incomplete taxon sampling is not a problem for phylogenetic inference. **PNatl Acad Sci USA**, v. 98, n. 19, p. 10751–10756, 2001.
- ROURE, B.; BAURAIN, D.; PHILIPPE, H. Impact of missing data on phylogenies inferred from empirical phylogenomic data sets. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 1, p. 197–214, 2013.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SALEMI, M.; VANDAMME, A.-M.; LEMEY, P. **The Phylogenic Handbook: A Practical Approach Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. [s.l.] Cambridge University Press, 2012.
- SANDERSON, M. J. A Nonparametric Approach to Estimating Divergence Times in the Absence of Rate Constancy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 1218–1231, 1997.
- SANDERSON, M. J. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: A penalized likelihood approach. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 1, p. 101–109, 2002.
- SANDERSON, M. J. et al. The PhyLoTA browser: Processing GenBank for molecular phylogenetics research. **Systematic Biology**, v. 57, n. 3, p. 335–346, 2008.
- SANGSTER, G. et al. Multi-locus phylogenetic analysis of Old World chats and flycatchers reveals extensive paraphyly at family, subfamily and genus level (Aves: Muscicapidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 57, n. 1, p. 380–392, 2010.
- SCHELLART, W. P.; LISTER, G. S.; TOY, V. G. A Late Cretaceous and Cenozoic reconstruction of the Southwest Pacific region: Tectonics controlled by subduction and slab rollback processes. **Earth-Science Reviews**, p. 191–233, 2006.
- SCHRAGO, C. G.; RUSSO, C. A. M. Timing the Origin of New World Monkeys. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 10, p. 1620–1625, 2003.
- SHELDON, F. H.; GILL, F. B. A reconsideration of songbird phylogeny, with emphasis on the evolution of titmice and their sylvioid relatives. **Systematic Biology**, v. 45, n. 4, p. 473–495, 1996.
- SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J. E. **Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution**. [s.l.] Yale University Press, 1990.
- SIBLEY, C. G.; AHLQUIST, J. E.; MONROE, B. L., Jr. A Classification of the Living Birds of the World Based on Dna-Dna Hybridization Studies. **The Auk**, v. 105, p. 409–423, 1988.
- SIBLEY, C. G.; WILLIAMS, G. R.; AHLQUIST, J. E. The relationships of the New Zealand wrens (Acanthisittidae) as indicated by DNA-DNA hybridization. **Notornis**, v. 29, p. 113–130, 1982.

- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 1. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.
- SINCLAIR, B. J. et al. Insects at low temperatures: an ecological perspective. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 5, p. 257–262, 2003.
- SNEATH, P.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **W. H. Freeman and Co**, p. 39–42, 1963.
- SOARES, A. E. **Fatores Limitantes na Inferência dos Tempos de Divergência**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- SOARES, A. E.; SCHRAGO, C. G. The influence of taxon sampling and tree shape on molecular dating: an empirical example from Mammalian mitochondrial genomes. **Bioinform Biol Insights**, v. 6, p. 129–143, 2012.
- SPELLMAN, G. M. et al. Clarifying the systematics of an enigmatic avian lineage: What is a bombycillid? **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 3, p. 1036–1040, 2008.
- STAMATAKIS, A. **Phylogenetic Models of Rate Heterogeneity: A High Performance Computing Perspective Anais...** In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PARALLEL AND DISTRIBUTED PROCESSING SYMPOSIUM. Rhodes, Greece: 2006
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688–2690, 2006.
- STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. **Systematic Biology**, v. 57, n. 5, p. 758–771, 2008.
- SUH, A. et al. Mesozoic retroposons reveal parrots as the closest living relatives of passerine birds. **Nature Communications**, v. 2, p. 2–7, 2011.
- SULLIVAN, J.; JOYCE, P. Model Selection in Phylogenetics. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v. 36, p. 445–466, 2005.
- TAMBUSSI, C. P.; DEGRANGE, F. J. Bio-Connections Between Southern Continents: What is and What is Not Possible to Conclude. In: TAMBUSSI, C. P.; DEGRANGE, F. J. (Eds.). **South American and Antarctic Continental Cenozoic Birds**. SpringerBriefs in Earth System Sciences. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 5–13.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.
- TELLO, J. G. et al. Phylogeny and phylogenetic classification of the tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannides). **Cladistics**, v. 25, n. 5, p. 429–467, 2009.
- THORNE, J. L.; KISHINO, H. Estimation of divergence times from molecular sequence data. In: NIELSEN, R. (Ed.). **Statistical methods in molecular evolution**. New York: Springer, 2005. p. 234–256.
- THORNE, J. L.; KISHINO, H.; PAINTER, I. S. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. **Molecular Biology and Evolution**, p. 1647–1756, 1998.
- VAN TUINEN, M.; HEDGES, S. B. Calibration of avian molecular clocks. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 206–213, 2001.
- VAN UFFORD, A. Q.; CLOOS, M. Cenozoic tectonics of New Guinea. **AAPG Bulletin**, v. 89, n. 1, p. 119–140,

2005.

VIDAL, N. et al. Origin of tropical American burrowing reptiles by transatlantic rafting. **Biology Letters**, v. 4, n. 1, p. 115–118, 2008.

WANG, N.; BRAUN, E. L.; KIMBALL, R. T. Testing Hypotheses about the Sister Group of the Passeriformes Using an Independent 30-Locus Data Set. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 2, p. 737–750, 2012.

WARREN, W. C. et al. The genome of a songbird. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 757–762, 2010.

WIENS, J. J. Missing data, incomplete taxa, and phylogenetic accuracy. **Systematic Biology**, v. 52, n. 4, p. 528–538, 2003.

WIENS, J. J. Can incomplete taxa rescue phylogenetic analyses from long-branch attraction? **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 731–742, 2005.

WILKINSON, M. Majority-rule reduced consensus trees and their use in bootstrapping. **Molecular Biology and Evolution**, p. 437–444, 1996.

WILLIS, E. O. Effects of a cold wave on an Amazonian avifauna in the upper Paraguay drainage, Western Mato Grosso, and suggestions on Oscine-Suboscine relationships. **Acta Amazonica**, v. 3, p. 379–394, 1976.

WOODBURNE, M. O.; CASE, J. A. Dispersal, vicariance, and the Late Cretaceous to early tertiary land mammal biogeography from South America to Australia. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 3, n. 2, p. 121–161, 1996.

WORTHY, T. H. et al. Biogeographical and Phylogenetic Implications of an Early Miocene Wren (Aves: Passeriformes: Acanthisittidae) from New Zealand. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 30, n. 2, p. 479–498, 2010.

WRIGHT, T. F. et al. A multilocus molecular phylogeny of the parrots (Psittaciformes): support for a Gondwanan origin during the cretaceous. **Mol Biol Evol**, v. 25, n. 10, p. 2141–2156, 2008.

YANG, Z. H. Maximum-Likelihood Phylogenetic Estimation from DNA-Sequences with Variable Rates over Sites - Approximate Methods. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, n. 3, p. 306–314, 1994.

YANG, Z. H. **Computational Molecular Evolution**. Oxford: Oxford University Press, 2006.

YANG, Z. H. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1586–1591, 2007.

YANG, Z. H. Empirical evaluation of a prior for Bayesian phylogenetic inference. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 363, n. 1512, p. 4031–4039, 2008.

YANG, Z. H.; RANNALA, B. Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 212–226, 2006.

YANG, Z. H.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 5, p. 303–314, 2012.

YANG, Z. H.; YODER, A. D. Comparison of likelihood and Bayesian methods for estimating divergence times using multiple gene loci and calibration points, with application to a radiation of cute-looking

mouse lemur species. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 705–716, 2003.

YODER, A. D.; YANG, Z. H. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 7, p. 1081–1090, 2000.

ZACHOS, J. et al. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 686–693, 2001.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. **Evolving genes and proteins**, p. 97–166, 1965.