

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BRUNA BOIZONAVE ANDRIOLA

**Genômica populacional do complexo de populações de *Scytalopus speluncae*
(Passeriformes: Rhinocryptidae): Um estudo sobre diversificação intraespecífica**

Porto Alegre
2023

GRADUAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

BRUNA BOIZONAVE ANDRIOLA

**Genômica populacional do complexo de populações de *Scytalopus speluncae*
(Passeriformes: Rhinocryptidae): Um estudo sobre diversificação intraespecífica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas pela Escola
de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Luis Bonatto

Porto Alegre
2023

Lista de ilustrações

Figura 1: Mapa com a distribuição das espécies do gênero *Scytalopus* que ocorrem no leste da América do Sul. As espécies representadas no mapa são: *Scytalopus speluncae* (em rosa), *Scytalopus diamantinensis* (em laranja), *Scytalopus gonzagai* (em azul), *Scytalopus petrophilus* (em marrom), *Scytalopus pachecoi* (em verde), *Scytalopus iraiensis* (em vermelho) e *Scytalopus novacapitalis* (em amarelo). Mapa autoral.

Figura 2: Filogenia retirada do trabalho de Pulido-Santacruz et al. (2016). Relacionamento entre as populações de *Scytalopus speluncae* reconstruído com base em dois marcadores mitocondriais utilizando 108 amostras. (A) Distribuição geográfica das amostras utilizadas no estudo. (B) Árvore mitocondrial estimada com ND2 e Cyt *b*. (C) Resultado da análise de estrutura populacional baseada em 12 loci de microssatélites incluindo 93 indivíduos. O clado em laranja já é descrito como uma espécie independente do complexo (*Scytalopus gonzagai*).

Figura 3: Mapa com as amostras a serem utilizadas no presente trabalho. As populações de *Scytalopus speluncae* são representadas pelos triângulos rosas. As demais espécies pertencentes ao gênero e que serão inclusas no trabalho são: *Scytalopus diamantinensis* (círculo laranja), *Scytalopus gonzagai* (círculo azul), *Scytalopus petrophilus* (círculo marrom), *Scytalopus pachecoi* (círculo verde), *Scytalopus iraiensis* (círculo vermelho) e *Scytalopus novacapitalis* (círculo amarelo). Mapa autoral.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Especiação em altitude	7
1.2 Gênero <i>Scytalopus</i>	8
1.3 Clado leste do gênero <i>Scytalopus</i>	9
1.4 <i>Scytalopus speluncae</i>	12
1.5 Genômica.....	16
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Amostras e sequenciamento	17
4.2 Montagem dos genomas	18
4.3 Análises de estruturação genética e filogenômica.....	20
4.4 Análises de mistura genômica	22
4.5 Análises de diversidade genética.....	23
4.6 História demográfica	24
4.7 Análises de seleção.....	25
5. RESULTADOS ESPERADOS	25
6. CRONOGRAMA	26
7. ORÇAMENTO.....	27
REFERÊNCIAS	27
Apêndice I	36

1. INTRODUÇÃO

A variabilidade genética presente nas populações é regida por diversas forças evolutivas, que atuam em conjunto das constantes pressões ambientais (Barrow et al., 2015; Harvey & Brumfield, 2015; Thome et al., 2014; Yan et al., 2023). O surgimento de barreiras, como a formação de vales, montanhas e rios, juntamente com processos históricos, como a formação de refúgios e fragmentação de habitat, podem resultar no isolamento populacional, o qual, na ausência de fluxo gênico, pode ser crucial para o surgimento de novas linhagens (Luna et al., 2023; Musher et al., 2022). Organismos considerados complexos de espécies são bons exemplos para o estudo de diversificação por barreiras geográficas (Lavinia et al., 2015; Thome et al., 2014). Esses são caracterizados por apresentar diversas populações em distribuições disjuntas, a qual podem conter mais de uma espécie em sua conformidade. Contudo, devido a alta similaridade, a distinção entre elas é muitas vezes inexata, sendo essas bons modelos para compreensão dos processos envolvidos na diversificação intraespecífica e estudos de revalidação taxonômica (Bolívar-Leguizamón et al., 2020; Lees et al., 2022; Mata et al., 2009; Milá et al., 2012; Yan et al., 2023).

A região Neotropical é amplamente conhecida como uma das áreas mais ricas em biodiversidade da avifauna em todo o planeta (Stotz, 1996). Nas últimas décadas, o número de estudos buscando compreender a história evolutiva das espécies da região têm aumentado (Batalha-Filho et al., 2014; Bolívar-Leguizamón et al., 2020; Cadena et al., 2020; Harvey & Brumfield, 2015; Sedano & Burns, 2010; Thom et al., 2020;). Estudos envolvendo espécies cujas populações se encontram separadas por barreiras físicas contínuas (*e.g.* rios e montanhas) e influenciadas por processos biológicos temporários (*e.g.* ciclo glaciais) têm revelado uma diversidade de espécies ainda maior do que a estimada anteriormente (Lavinia et al., 2015; Mata et al., 2009; Maurício et al., 2008; Musher et al., 2022). Assim, estudos populacionais que envolvam espécies da região, com populações ocorrendo em localidades isoladas, podem auxiliar na compreensão de como o movimento tectônico, juntamente com os processos geológicos, impactam na conectividade das linhagens e a divergência intraespecífica.

O gênero *Scytalopus* (Gould, 1837) (Rhinocryptidae) é um grupo de aves neotropicais que habitam principalmente áreas de alta elevação em florestas no sul da América Central e cadeias montanhosas a oeste e leste da América do Sul, sendo considerado um dos grupos mais complexos da região (Krabbe & Schulenberg, 2003). Das 49 espécies descritas ao longo da sua distribuição,

sete espécies ocorrem no Brasil, sendo uma delas, *Scytalopus speluncae* Ménétries 1835. Esta espécie encontra-se distribuída ao longo da Mata Atlântica e é considerada um complexo de unidades evolutivas morfologicamente similares, mas geneticamente bem estruturadas (Pulido-Santacruz et al., 2016). Neste contexto, devido ao contínuo impacto antropogênico em sua distribuição, passa a ser importante um estudo taxonômico aplicando dados genômicos para uma melhor resolução da história por trás da divergência entre as populações de *S. speluncae*, seu status de conservação e a real classificação do táxon (Harvey & Brumfield, 2015; Pulido-Santacruz et al., 2016).

1.1 Especiação em altitude

Montanhas e vales são considerados locais como potenciais divisores de espécies, não apenas por questões de rearranjo geológico, mas também pelo surgimento de barreiras físicas temporárias, *e.g.* rios e fragmentação de habitat (Harvey & Brumfield, 2015; Leite et al., 2016; Thome et al., 2014). Apesar de comporem apenas 25% de toda a massa terrestre do planeta (Holt et al., 2013), esses locais apresentam alto grau de diversidade e endemismo, o qual pode ser explicado pela adaptabilidade local das espécies, regido por questões topográficas únicas, e eventos de separação temporária (Myers et al., 2000; Rahbek et al., 2019).

No trabalho desenvolvido por Rahbek et al. (2019), os autores levantaram dados sobre endemismo e diversidade das regiões de altitude ao redor do planeta. Observou-se que 87% de toda a biodiversidade de aves, mamíferos e anfíbios provém de montanhas e vales ao redor do planeta. Quando consideraram locais que apresentavam o maior número de espécies com pequena área de distribuição e áreas que demonstravam alto grau de endemismo, o norte dos Andes, assim como a região de Yungas, e a Mata Atlântica, foram as três regiões eleitas na América do Sul que continham ambas as características.

Duas principais teorias impulsionam a discussão sobre o surgimento e divergência de táxons nessas regiões: (i) isolamento geográfico por meio de processo de vicariância devido à elevação de cadeias montanhosas e (ii) isolamento populacional por fragmentação de habitat devido às oscilações climáticas (Cadena et al., 2020; Maurício et al., 2014; Thomé et al., 2014). Trabalhos na última década buscaram compreender esses padrões em táxons nas áreas de Mata Atlântica do Brasil. Uma das hipóteses é que um dos principais impulsionadores da diversidade no local seja a grande estabilidade histórica da mata após o surgimento das cadeias montanhosas

presentes no bioma (Cabanne et al., 2016; Thomé et al., 2014), tornando o ambiente propício para a diversificação de diversas linhagens (Carnaval & Moritz, 2008).

1.2 Gênero *Scytalopus*

O grupo das aves é repleto de bons exemplos para estudos que envolvam a investigação do surgimento de novas linhagens a partir de processos de especiação alopátrica (Lavinia et al., 2015; Musher et al., 2022; Pulido-Santacruz et al., 2016). O gênero *Scytalopus* (Gould, 1837) (Rhinocryptidae), popularmente conhecidos por tapaculos, são considerados o grupo de aves mais especioso na região neotropical (Bornschein et al., 1998; Krabbe & Schulenberg, 2003; Lees et al., 2022), e juntamente com os gêneros *Merylaxis* e *Eleoscytalopus*, é membro da subfamília Scytalopodinae Müller, 1846. Atualmente, apresenta 49 espécies distribuídas em cadeias montanhosas e campos de várzea com alta vegetação, desde o sul da América Central a oeste do continente sul-americano, nos Andes, e a leste do mesmo (Clements et al., 2023).

As espécies do gênero estão distribuídas em florestas e encostas úmidas de vegetação lenhosa em alta altitude (Krabbe & Schulenberg, 2003). Geralmente, habitam áreas acima de 700 metros, com populações na região andina ocupando localidades ainda mais altas, de mais de 3.000 metros (Areta & Monteleone, 2023). Das setes espécies que ocorrem no leste da América do Sul, *Scytalopus pachecoi* é a que ocorre em menores altitudes, de 100 a 600 metros (Maurício, 2005), enquanto as demais tendem a habitar regiões entre 700 e 2.100 metros (Bornschein et al., 2007; Cunha et al., 2020; Maurício et al., 2014; Vasconcelos et al., 2008; Whitney et al., 2010). Duas outras espécies (*Scytalopus novacapitalis* e *Scytalopus iraiensis*), diferentemente das demais, são encontradas em regiões de campo, próximo a várzeas (Bornschein et al., 1998; Cunha et al., 2020).

A grande similaridade morfológica do gênero é destaque devido a alta similaridade que as diferentes espécies apresentam. Geralmente, possuem uma coloração de plumagem que varia do preto ao marrom, um tamanho médio de 10-14 cm e formato corporal semelhante. Ademais, o nome do gênero deriva do grego *skutalon*, que significa vara, e *pous*, pé, remetendo aos longos tarsos e pés largos que os permitem percorrer a mata com rapidez, como ratos, correndo e se escondendo na vegetação (Krabbe & Schulenberg, 2003).

O relacionamento das espécies que compõem o gênero sugere o agrupamento do clado composto pelas espécies do sul dos Andes com o clado das espécies do leste da América do Sul, como uma maior proximidade filogenética entre as espécies da região Tropical dos Andes e da

América Central, com uma divergência estimada há pelo menos 10 milhões de anos entre eles (Cadena et al., 2020).

Devido a pouca habilidade de dispersão por grandes perímetros, as espécies estão mais propensas a serem impactadas pelos processos históricos que ocorrem em suas áreas de ocorrência (Cadena et al., 2020; Cadena & Céspedes, 2020; Krabbe & Schulenberg, 2003). A hipótese mais recente que diz respeito ao surgimento dos clados, envolve o surgimento das primeiras espécies no sul do continente e posterior colonização do norte com a ascensão da cadeia montanhosa dos Andes, possibilitando uma alta taxa de diversificação devido ao isolamento geográfico (Cadena et al., 2020). Por outro lado, a hipótese de formação de fragmentos, refúgios e expansão de ambientes, resultado de flutuações climáticas, também pode estar envolvida na diversificação de algumas espécies, como alguns táxons na distribuição ao leste do continente e espécies andinas em latitudes mais próximas da linha do Equador (Cadena & Céspedes, 2020; Mata et al., 2009).

Com o aumento dos estudos incluindo dados de vocalização e alguns marcadores genéticos, foi possível descrever quatro vezes mais o número de espécies anteriormente descritas, além da revalidação de outras (Avendaño et al., 2015; Coopmans et al., 2001; Cuervo et al., 2005; Donegan & Avendaño, 2008; Hosner et al., 2013; Krabbe & Schulenberg, 1997, 2003; Krabbe & Cadena, 2010; Krabbe et al., 2020; Lees et al., 2022). Muitas dessas inicialmente classificadas como parte de um complexo de populações crípticas agrupadas como sendo uma mesma espécie (Avendaño & Donegan, 2015; Krabbe et al., 2020; Maurício, 2005; Maurício et al., 2008; Maurício et al., 2014).

Ainda que a taxonomia atual do grupo esteja mais bem elucidada, a difícil diferenciação na coloração da plumagem e forma corporal torna o grupo um dos mais difíceis de resolução, com contínua necessidade de revisões taxonômicas que incluam cada vez mais informações, tanto morfológicas, mas principalmente genéticas e ecológicas (Cadena et al., 2020; Krabbe & Schulenberg, 2003; Lees et al., 2022).

1.3 Clado leste do gênero *Scytalopus*

No Brasil, eram reconhecidos dois principais complexos de espécies (*Scytalopus indigoticus* e *S. spenlucae*), uma espécie da região do estado da Bahia (*Scytalopus psychopompus*) e uma espécie descrita na construção da capital do país (*S. novacapitalis*) (Bornschein et al., 1998; Maurício, 2005).

Conhecida popularmente como tapaculo-de-brasília, *S. novacapitalis* possui uma pequena área de distribuição na região da Serra da Canastra nos estados de Goiás e Minas Gerais (MG). Devido à pequena distribuição e às constantes ameaças do desenvolvimento antropogênico na região, a espécie se encontra com status de conservação classificado como Em Perigo (BirdLife International, 2018; Cunha et al., 2020).

Enquanto a classificação taxonômica de *S. novacapitalis* não foi questionada até o momento, a classificação envolvendo as populações das espécies designadas *S. speluncae* e *S. indigoticus* levou a persistentes debates taxonômicos (de Moraes et al., 2018; Mata et al., 2009; Maurício & Bornschein, 2017; Nemésio et al., 2013; Raposo et al., 2008). Consideradas complexos de espécies por possuírem diversas populações com distribuições segmentadas ao longo do leste da costa brasileira, ambas sofreram mudanças em suas classificações taxonômicas desde suas descrições. O resultado desses trabalhos levou à descrição de um novo gênero e cinco novas espécies (Bornschein et al., 1998; Bornschein et al., 2007; Mata et al., 2009; Maurício 2005; Maurício et al., 2014; Nemésio et al., 2013; Pulido-Santacruz et al., 2016; Raposo et al., 2008; Whitney et al., 2010) (Figura 1).

Um dos primeiros trabalhos aplicando marcadores genéticos abordando o relacionamento entre as espécies do clado leste do gênero, evidenciou a não monofilia dos *Scytalopus* da região. Nesse trabalho (Maurício et al., 2008), os autores sugeriram a realocação das espécies anteriormente consideradas *Scytalopus indigoticus* e *Scytalopus psychopompus* no novo gênero descrito, *Eleoscytalopus*. Sendo assim, *Eleoscytalopus* formava o grupo irmão dos tapaculos verdadeiros, contendo uma espécie endêmica do sul da Bahia, *Eleoscytalopus psychopompus*, e *Eleoscytalopus indigoticus*, distribuída em menores altitudes na porção sudeste da costa brasileira.

Assim como a revisão das espécies do gênero *Eleoscytalopus*, o complexo de espécies anteriormente denominada *S. speluncae* também recebeu reformulações nas últimas décadas. Com o avanço dos estudos, cinco novas espécies foram descritas: *S. iraiensis*, *S. pachecoi*, *S. diamantinensis*, *Scytalopus petrophilus* e *Scytalopus gonzagai*, todas anteriormente associadas à nomenclatura do popularmente conhecido como tapaculo-preto (Bornschein et al., 1998; Bornschein et al., 2007; Maurício, 2005; Maurício et al., 2014; Whitney et al., 2010). Essas errôneas atribuições são justificadas pela extrema similaridade morfológica entre os indivíduos de populações isoladas. Recentes trabalhos possibilitaram uma melhor diferenciação das linhagens

por meio da aplicação de dados genéticos (Bornschein et al., 2007; Cadena et al., 2020; Mata et al., 2009; Maurício et al., 2008; Pulido-Santacruz et al., 2016).

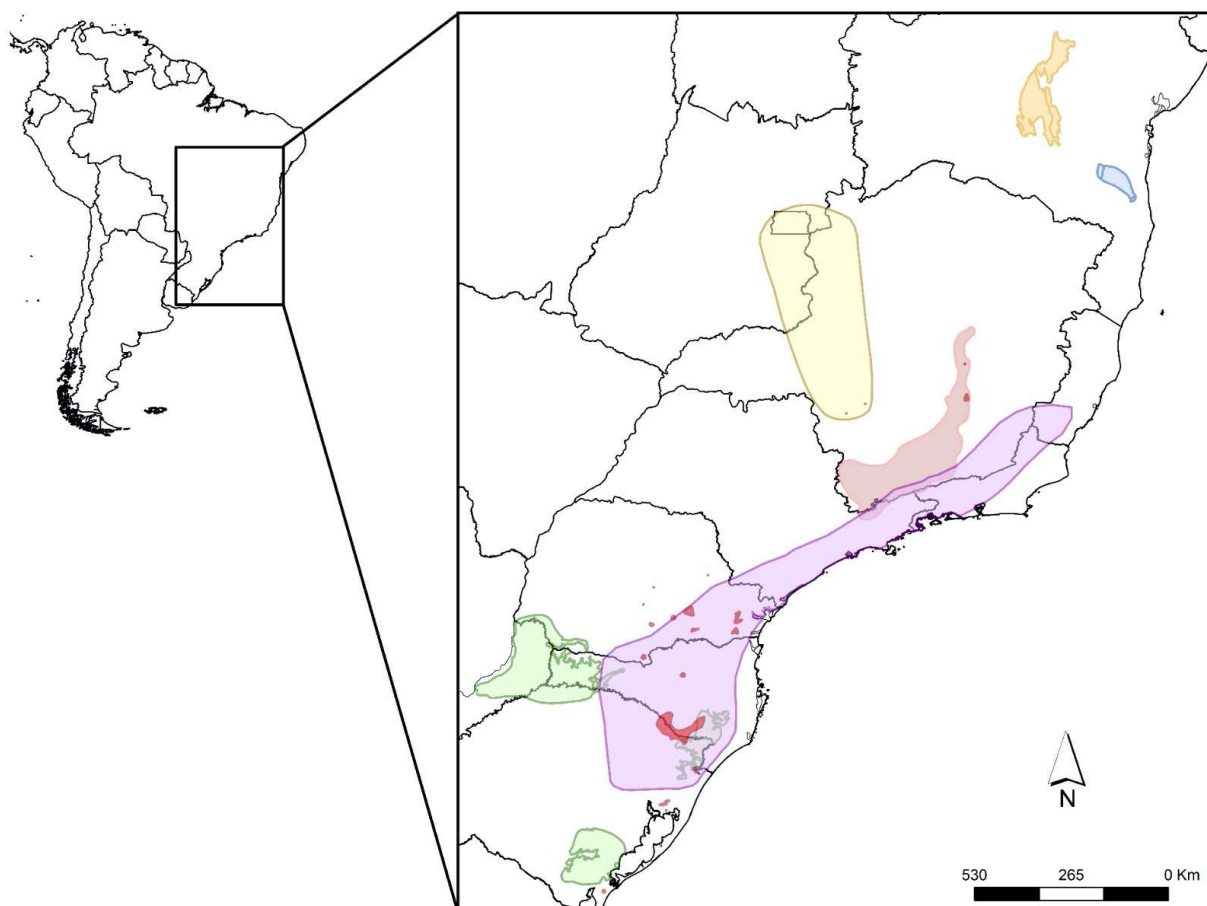


Figura 1: Mapa com a distribuição das espécies do gênero *Scytalopus* que ocorrem no leste da América do Sul. As espécies representadas no mapa são: *Scytalopus speluncae* (em roxo), *Scytalopus diamantinensis* (em laranja), *Scytalopus gonzagai* (em azul), *Scytalopus petrophilus* (em rosa), *Scytalopus pachecoi* (em verde), *Scytalopus iraiensis* (em vermelho) e *Scytalopus novacapitalis* (em amarelo). Mapa autoral.

A primeira espécie a ser separada do complexo de *S. speluncae* foi classificada como *S. iraiensis* Bornschein, Reinert & Pichorim 1998. Sua distribuição está relacionada a regiões de altitude de no máximo 900 metros, nas margens de rios e várzeas nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e Minas Gerais (MG). Apresentam menor tamanho corporal e caudal, além de uma coloração diferenciada quando comparada a *S. speluncae*, preta no dorso e cinza no ventre, sendo reconhecida como um táxon independente a partir da sua vocalização e informações morfológicas (Bornschein et al., 1998).

A descrição da espécie *S. pachecoi* Maurício 2005, foi definida a partir da análise da sua distinta vocalização e leve diferenciação de coloração, mais clara que a de *S. speluncae*. Sua distribuição compreende altitudes que variam de 100 a 1.200 metros, abrangendo a mesma área que o tapaculo-preto na Serra do Sudeste do RS e na região dos Campos de Cima da Serra, entre os estados do RS e SC, exceto no noroeste do estado do RS e norte da Argentina, na região definida como Província das Missões (Maurício, 2005; Maurício & Bornschein, 2017).

Em 2007 a primeira espécie endêmica de *Scytalopus* da Bahia (BA) foi descrita. Reconhecida como *S. diamantinensis* Bornschein, Maurício, Belmonte-Lopes, Mata & Bonatto 2007, a espécie está presente ao norte da Serra do Espinhoso na região da Chapada Diamantina. É a primeira espécie do gênero no Brasil a ser diagnosticada não só por caracteres vocais e plumagem, mas também por marcadores genéticos. Habitando regiões de 850 metros a 1.600 metros de altitude, a espécie é considerada com status de conservação Em Perigo (Bornschein et al., 2007; BirdLife International, 2022).

A partir do avanço das técnicas moleculares, Maurício et al. (2008), assim como outros autores, incluíram em seus trabalhos marcadores nucleares e mitocondriais, tendo assim, uma melhor resolução taxonômica (Mata et al., 2009; Maurício et al., 2014; Pulido-Santacruz et al., 2016). Consequentemente, outras espécies foram descritas, como *S. petrophilus* Whitney, Vasconcelos, Silveira & Pacheco 2010. A espécie é localizada na cadeia montanhosa da Serra do Espinhoso no estado de MG e ocorre em altitudes de 900 a 2.100 metros de elevação (Marta et al., 2009; Maurício et al., 2010; Whitney et al., 2010).

Por fim, a última das espécies descritas no Brasil, *S. gonzagai* Maurício, Belmonte-Lopes, Pacheco, Silveira, Whitney & Bornschein 2014 se encontra distribuída em duas cadeias montanhosas no sul da BA, no Planalto da Conquista e na Serra das Lontras, em altitudes de 600 a 1.140 metros. Descrita como possuindo plumagem mais amarronzada do que as demais espécies, uma vocalização mais espaçada, além de confirmação prévia de dados genéticos (Mata et al., 2009; Maurício et al., 2014). Junto com *S. diamantinensis*, também se encontra com status de Em Perigo (BirdLife International, 2022).

Apesar de todos os esforços para melhor classificar as populações do gênero no país, ainda são necessários novos estudos para compreender as populações remanescentes de *S. speluncae*.

1.4 *Scytalopus speluncae*

Atualmente a espécie classificada como *S. speluncae* é endêmica da Mata Atlântica brasileira e possui a maior distribuição geográfica quando comparada com as demais espécies do gênero no Brasil (Cadena et al., 2020; Pulido-Santacruz et al., 2016). A associação com o nome tapaculo-preto é historicamente atribuída para descrever exemplares de coloração cinza-escuro habitantes de cadeias montanhosas, em elevações de 600 a 2.500 metros, em florestas úmidas no leste do Brasil e noroeste da Argentina (Bornschein et al., 1998; Krabbe & Schulenberg, 2003; Maurício 2005; Maurício et al., 2010; Raposo et al., 2006; Rull & Carnaval, 2020). Suas principais características são a plumagem uniforme de coloração cinza-escuro do macho sem marcação de barras nos flancos, com fêmeas apresentam uma coloração marrom-amarelado no ventre, flancos barrados e dorso marrom (Maurício, 2005; Maurício et al., 2010). A espécie foi descrita pela primeira vez em 1835 (Ménétries). Apesar do exemplar descrever sua localidade como sendo de São João del Rei, em MG, autores sugerem que a correta coleta do exemplar possa ter sido realizada no interior do estado do RJ, onde Ménétries realizou coletas entre os anos de 1822 e 1823 (Pacheco, 2004). Sugerindo então, que a localidade tipo da espécie seja considerada a Serra dos Órgãos no RJ (Maurício et al., 2010).

As discordâncias perante a descrição morfológica e o real número de linhagens do complexo é uma discussão desde o início do século XXI (Maurício et al., 2010; Maurício & Bornschein, 2017; Nemésio et al., 2013; Raposo & Kirwan, 2008). Por um longo período, todos os exemplares encontrados nas montanhas costeiras do estado da BA até o norte do RS, além de uma porção noroeste da Argentina, eram nomeados como *S. speluncae*. Com o aumento dos estudos e identificação de novas espécies, a distribuição das populações de *S. speluncae* foi diminuindo e hoje é considerada como presente nas cadeias montanhosas costeiras da Mata Atlântica do sul do ES, sul de MG, RJ, SP, PR, SC e norte do RS (Krabbe et al., 2020).

A partir das prévias discordâncias rodeando a classificação da espécie, Marta et al., (2009) utilizou quatro marcadores genéticos, sendo dois mitocondriais (ND2 e CYB) e dois nucleares (FIB7 e G3PDH), abrangendo sete diferentes localidades, antes todas consideradas *S. speluncae*. O estudo identificou quatro divergentes e estruturadas linhagens no complexo, além de resultar na posterior descrição de *S. gonzagai* (Maurício et al., 2014).

No que diz respeito a diversificação das linhagens, ao contrário do postulado por Carnaval et al. (2009), que sugeriram que as populações de distribuição no sul tenham sido originadas a partir das populações do norte após o Último Máximo Glacial, Pulido-Santacruz et al. (2016),

investigando uma maior amostragem incluindo 108 amostras de 65 localidades, sugerem que as linhagens já estavam separadas há pelo menos 2 milhões de anos. Neste trabalho, as populações se dividiram em dois clados: uma unindo as populações mais ao norte da distribuição, do RJ e MG, como também indivíduos da população da Serra da Mantiqueira na fronteira com o estado de SP; e outro agrupando as populações ao sul da distribuição (Serra do Mar - SP, PR, SC, RS). O mesmo relacionamento retomado por Cadena et al. (2020), a qual utilizando apenas seis amostras da distribuição de *S. speluncae*, estimaram que os dois clados estariam separados há pelo menos 4 milhões de anos.

De acordo com as classificações de Pulido-Santacruz et al. (2016), a espécie é dividida em seis grandes grupos com base na ocorrência geográfica e estruturação genética. Ao sul da distribuição, três populações ocorrem em simpatria. A população denominada como 7 abrange as localidades do RS, SC e Sul do PR, compartilhando a Escarpa Devoniana com a população 5. Esta, habita a região da Serra do Paranapiacaba e grande parte da Escarpa Devoniana nos estados do PR e SP. Já a população 6 compartilha a região da Serra da Boa Esperança apenas com a população 7. Próximo à costa, a população 4 é encontrada na Serra do Mar do estado de SP. A Serra da Mantiqueira, na divisa dos estados de SP e MG, juntamente a região da Serra do Caparaó em MG, abriga, juntas, duas populações de distribuição mais ao norte, denominada como população 3, enquanto, a Serra dos Órgãos no RJ apresenta a população denominada 2 (Figura 2).

As linhagens na distribuição norte mostraram alta estruturação. Por outro lado, as linhagens denominadas 5 e 7, que ocorrem em simpatria mais ao sul da distribuição, apresentaram maior mistura genética com a detecção de três possíveis recentes híbridos. A população 6 foi descrita pela primeira vez no trabalho de Pulido-Santacruz et al. (2016), e até o momento nenhum novo estudo envolvendo os indivíduos da região foi documentado.

Como mencionado anteriormente, as localidades onde as populações de *S. speluncae* são encontradas abrangem a distribuição da Mata Atlântica, sendo essa considerada um dos *hotspots* de biodiversidade do planeta (Myers et al., 2000). Estudos de *proxy* de diversidade ao redor do mundo sugerem que essa área apresenta uma alta taxa de riqueza de espécies, influenciada pela alta umidade e topografia única da região (Rahbek & Graves, 2001).

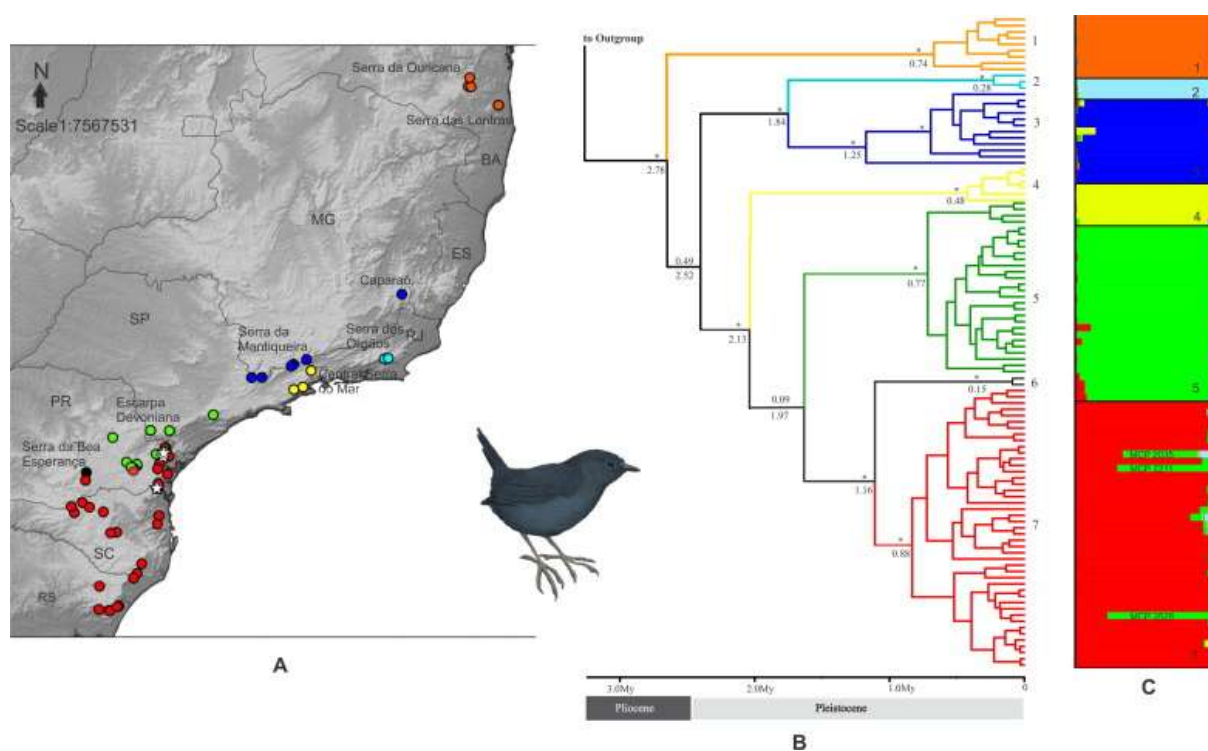


Figura 2: Filogenia retirada do trabalho de Pulido-Santacruz et al. (2016). Relacionamento entre as populações de *Scytalopus speluncae* reconstruído com base em dois marcadores mitocondriais utilizando 108 amostras. (A) Distribuição geográfica das amostras utilizadas no estudo. (B) Árvore mitocondrial estimada com o método bayesiano. (C) Resultado da análise de estrutura populacional baseada em 12 loci de microssatélites incluindo 93 indivíduos. O clado em laranja já é descrito como uma espécie independente do complexo (*Scytalopus gonzagai*).

Até o momento, distinções que levam em consideração apenas caracteres morfológicos ou de vocalização se mostraram ineficientes na separação das populações remanescentes do complexo de *S. speluncae* (Nemésio et al., 2013; Raposo et al., 2006; Raposo & Kirwan, 2008). Sugere-se que isso acontece porque as diversas populações que ocorrem em alopatria não apresentam uma clara diferenciação fenotípica, essas podendo ter se diferenciado devido influência de processo de especiação alopátrica e não por consequência de adaptação (Cadena et al., 2012). As conclusões dos trabalhos com foco nesta espécie evidenciam o isolamento genético entre as populações de *S. speluncae*, com a possibilidade do táxon conter mais de uma unidade evolutiva em sua distribuição. Todavia, esses estudos apresentam estimativas de separação entre as linhagens divergentes, não abrangem toda a distribuição do táxon ou utilizam poucos marcadores genéticos para explicar a complexa história das populações (Cadena et al., 2020; Mata et al. 2009; Pulido-Santacruz et al., 2016). Sendo assim, é de extrema importância realizar um estudo com dados genômicos contendo o maior número de amostras da distribuição da espécie *S. speluncae*, assim como as demais espécies que ocorrem no Brasil. Dessa forma, lançando luz sobre a história que

deu origem a populações tão bem estruturadas e refletindo a real diversidade das espécies do gênero *Scytalopus* do clado brasileiro.

1.5 Genômica

A utilização de dados genômicos para compreender a história evolutiva de organismos não modelo tem se mostrado extremamente eficiente para desvendar processos evolutivos complexos (Lopes et al., 2023; Musher et al., 2022). Com o aumento das diferentes possibilidades de sequenciamento de genomas completos, assim como a gama de programas que visam lidar com o grande número de dados gerados, a área encontra-se em constante desenvolvimento (Levy & Myers, 2016; Reel et al., 2021). No contexto da genômica populacional, esse tipo de estudo desempenha um papel crucial na obtenção de estimativas precisas de tamanho populacional, diversidade e adaptação (Dussex et al., 2021; Luikart et al., 2003; Supple & Shapiro, 2018; Wang et al., 2022). A aplicação da técnica em estudos populacionais fornece uma melhor resolução no processo de especiação, permitindo a identificação de loci que possam estar sujeitos a uma maior diferenciação, além de poder contribuir na tomada de decisões relativas à conservação de espécies e populações (Butlin, 2010; Hohenlohe et al., 2021; Luikart et al., 2003; Supple & Shapiro, 2018).

Dadas as informações anteriores, é de extrema importância que uma revisão incluindo toda a distribuição de *S. speluncae*, abrangendo todos os táxons do gênero *Scytalopus* do clado do leste da América do Sul, seja realizada. A aplicação dos dados genômicos pode trazer luz à possibilidade de existência de mais de uma espécie no complexo do tapaculo-preto, permitindo compreender sua radiação e a correta atribuição taxonômica, além do status de conservação dessas populações.

2. JUSTIFICATIVA

Com o progresso da tecnologia de sequenciamento e análise de dados, tornou-se possível a obtenção de um grande volume de amostras, buscando assim maior resolução de cenários complexos. Ainda que avanços na utilização de dados e na compreensão da história das populações de *S. speluncae* tenham ocorrido, estudos que incluam amostras de toda a distribuição da espécie, bem como a inclusão dos demais táxons do clado do leste da América do Sul, utilizando o maior número de dados, precisam ser realizados. Com isso, o presente projeto busca proporcionar uma resolução mais sólida para a classificação das populações de *S. speluncae* a partir da aplicação de dados genômicos. Essa maior resolução não permitirá apenas a reavaliação taxonômica e

esclarecimento das relações filogenéticas entre as populações, mas também resultará em implicações importantes para a conservação do táxon e das populações.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Compreender a história evolutiva e a estruturação populacional do complexo de populações classificadas como *Scytalopus speluncae* por meio da caracterização de dados genômicos.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar o relacionamento e a divergência das sete espécies que compõem o grupo dos *Scytalopus* na distribuição leste da América do Sul;
- Estimar o relacionamento, a divergência entre as linhagens e os possíveis eventos evolutivos que influenciaram na história de *S. speluncae*;
- Estimar a diversidade genética intraespecífica da espécie *S. speluncae*, assim como sua história demográfica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras e sequenciamento

No presente estudo, serão sequenciados genomas completos de 49 indivíduos de *S. speluncae* que ocorram em diferentes localidades ao longo da sua distribuição, amostrando as principais populações reconhecidas como unidades evolutivas distintas por Pulido-Santacruz et al. (2016) (Figura 3). Há ainda a possibilidade de obtenção de novas amostras a partir de colaborações. Ademais, será sequenciado um genoma de cada uma das demais espécies do gênero que ocorrem no Brasil: *S. diamantinensis*, *S. gonzagai*, *S. petrophilus*, *S. pachecoi*, *S. iraiensis* e *S. novacapitalis*, além do sequenciamento de uma amostra do gênero *Eleoscytalopus*, *E. indigoticus*, utilizada como grupo externo (Tabela 1). Será obtido do banco de dados dois genomas da espécie *Scytalopus superciliaris*, a qual será também adicionada nas análises. As amostras terão seus DNAs extraídos utilizando o kit de extração DNeasy Tissue Kit (Qiagen) seguindo o protocolo estipulado. Os genomas serão sequenciados na plataforma Illumina.

4.2 Montagem dos genomas

Após a obtenção das sequências brutas do sequenciamento, serão realizadas análises de bioinformática com intuito de verificar a qualidade do sequenciamento e proceder com a montagem dos genomas.

A qualidade do sequenciamento será avaliada com base no valor de qualidade Phred, verificando as sequências brutas por meio do programa FastQC (Andrews, 2010). Os genomas serão mapeados utilizando o genoma de *S. superciliaris* (GenBank: N° de acesso ASM1340041v1) como referência no programa PALEOMIX no módulo BAM pipeline (Schubert et al., 2014). O PALEOMIX realiza a filtragem e alinhamento das sequências de forma automatizada, gerando arquivos de alinhamento de sequências binárias (do Inglês, “*binary sequence alignment*” - BAM) que servirão de entrada nas análises subsequentes. Os adaptadores das sequências, as bases de baixa qualidade (>3) e as sequências com menos de 90 bases serão filtradas com o programa AdapterRemoval v2 (Schubert et al., 2016). O alinhamento contra o genoma de referência será feito com o método BWA 0.7.17 (Li & Durbin, 2009), filtrando sequências não mapeadas e aquelas com valor de qualidade Phred >30. As duplicatas de PCR serão filtradas e os indels mapeados com Picard Tools 2.18.5 (Broad Institute 2019) e GATK 3.8 (McKenna et al., 2010), respectivamente. A indexação do arquivo BAM será realizada utilizando o SAMtools v1.12 (Li et al., 2009). A qualidade do mapeamento, incluindo cobertura por par de base e profundidade das sequências, será gerada pelos módulos paleomix *coverage* e paleomix *depths*. Por fim, será utilizado o programa deepTools v3.5.1 (Ramirez et al., 2016) para gerar gráficos de cobertura.

Com os genomas mapeados, a obtenção das sequências consenso será realizada com o software ANGSD (Korneliussen et al., 2014), considerando apenas as bases com um valor mínimo de qualidade igual ou superior a 30. Os genomas serão mascarados com o objetivo de descaracterizar regiões repetitivas e de baixa complexidade, substituindo essas regiões por valores de “N”. O mascaramento será executado através do programa RepeatMasker v4.1.5 (Smit et al., 2015), de acordo com as regiões mascaradas do genoma do módulo de aves. Com as sequências consenso filtradas e mascaradas, a fim de averiguar a completude e realizar predição e anotação de genes com base em ortologia de sequências, o genoma de referência (*S. superciliaris*) será submetido ao software BUSCO v5 (Manni et al., 2021).

O painel de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (do Inglês, “*Single Nucleotide Polymorphisms*” - SNPs) será obtido utilizando o programa BCFtools v1.17 (Danecek et al., 2021) no módulo mpileup. O painel de SNPs será construído a partir da filtragem de bases de baixa qualidade com valores de $q < 30$ e $Q < 30$, com cobertura total mínima de $\frac{1}{3}$ e no máximo 3X a média de profundidade do genoma, além do descarte de indels. Também serão identificadas bases localizadas em regiões repetitivas, com base no arquivo de coordenadas obtido das regiões mascaradas no arquivo consenso FASTA. Primeiramente, será gerado um arquivo VCF contendo os sítios invariantes e variantes, seguido de uma segunda rodada, mantendo apenas os sítios polimórficos.

O genoma mitocondrial será obtido realizando os mesmos passos até a obtenção do arquivos FASTA, a partir da sequência de referência da mitocôndria de *S. superciliaris* (GenBank: N° de acesso NC_053064).

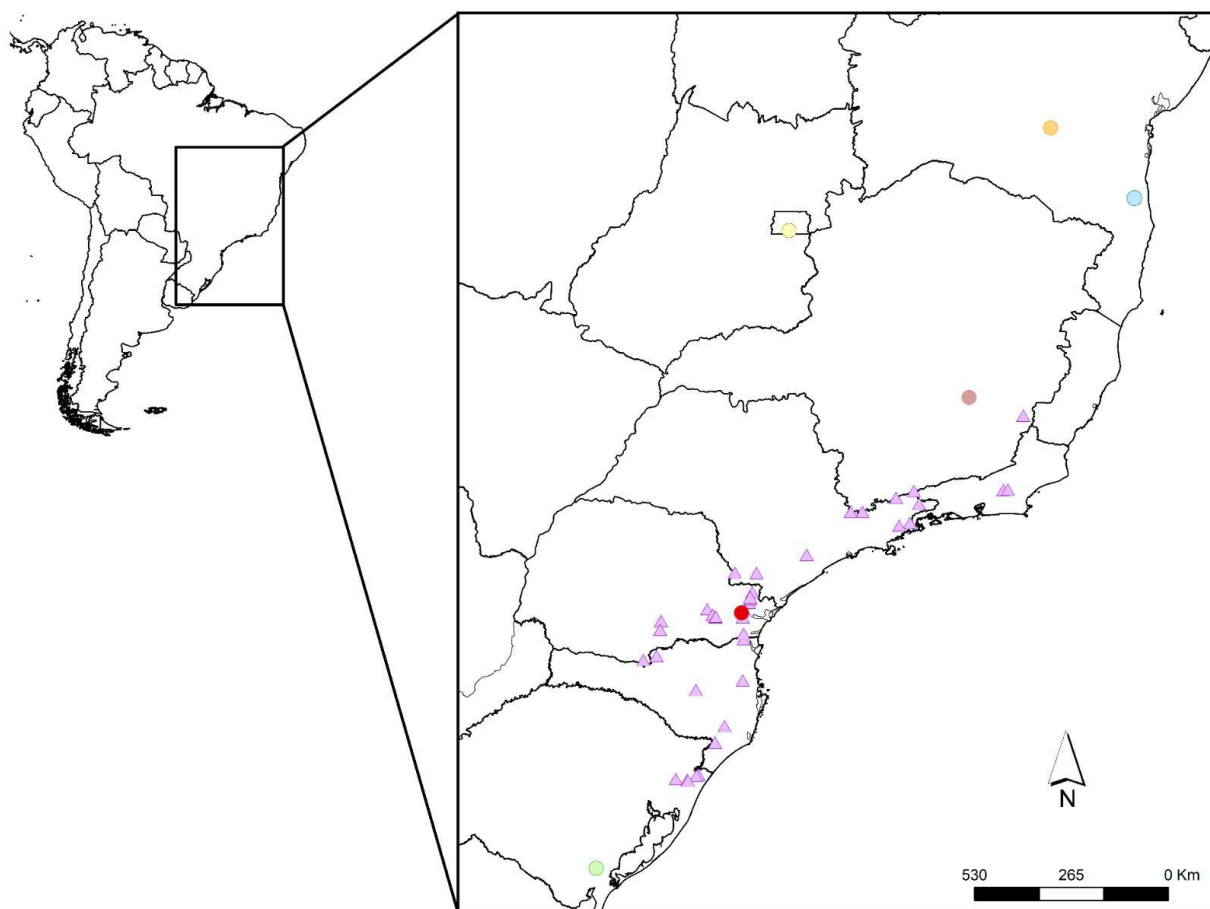


Figura 3: Mapa com as amostras a serem utilizadas no presente trabalho. As populações de *Scytalopus speluncae* são representadas pelos triângulos rosas. As demais espécies pertencentes ao gênero e que serão incluídas no trabalho são:

Scytalopus diamantinensis (círculo laranja), *Scytalopus gonzagai* (círculo azul), *Scytalopus petrophilus* (círculo marrom), *Scytalopus pachecoi* (círculo verde), *Scytalopus iraiensis* (círculo vermelho) e *Scytalopus novacapitalis* (círculo amarelo). Mapa autoral.

4.3 Análises de estruturação genética e filogenômica

Com intuito de avaliar a estruturação populacional, serão realizadas a Análise de Componentes Principais (do Inglês, “*Principal Component Analyses*” - PCA) e a estimativa de componente genômico ancestral dos indivíduos. A PCA, a qual sumariza a variação dos dados em componentes principais, será realizada utilizando o painel completo de SNPs obtidos com o BCFtools por meio do software Plink v1.9 (Chang et al., 2015). Para avaliar a mistura genômica e o componente genômico de cada indivíduo, será empregado no programa *Admixture* v1.3 (Alexander et al., 2009). O *Admixture* v1.3 tem como objetivo estimar a melhor proporção do componente ancestral que explica a frequência dos alelos no conjunto de SNPs com base em um valor de agrupamento (K). O valor de K define quantos componentes genômicos serão estimados para o número das amostras. O método assume a independência de loci, portanto, o painel de SNPs será filtrado com Plink v1.9 com base em distância genética, conforme sugerido no manual, com intuito de reduzir o desequilíbrio de ligação entre os sítios.

Análises de filogenética serão aplicadas para melhor compreender o relacionamento entre as espécies e populações, bem como para estimar os tempos de divergência e avaliar eventos evolutivos (e.g. introgressão, hibridização e Separação Incompleta das Linhagens) que possam ter influenciado a história do grupo.

Para avaliar as relações entre as amostras, será utilizada a amostragem do genoma completo a partir do conjunto de sítios polimórficos gerados com o BCFtools, conforme mencionado anteriormente. A amostra de *E. indigoticus* será incluída como grupo externo em todas as análises. O programa IQ-TREE (von Haeseler et al., 2015) será empregado para estimar uma árvore usando o método de máxima verossimilhança (ML) com a opção -m MFP para calcular o melhor modelo de substituição para os dados (Kalyanamoorthy et al., 2017). Como comparação, será utilizado o mesmo conjunto de dados de SNPs e o mesmo grupo externo para inferir uma topologia com o programa RAxML-NG-MPI (Kozlov et al., 2019), também baseada no método de ML, utilizando o melhor modelo de substituição gerado da análise do IQ-TREE. Em ambos programas, o painel de SNPs será convertido em formato phylip usando o script vcf2phylip.py (Ortiz, 2019). Além das estimativas de árvores de ML com o RaxML e IQ-TREE, será feita uma reconstrução baseada no

método Neighbor-Joining (NJ) usando o programa Phyllip 3.7 (Felsenstein, 2009), com o mesmo conjunto de sítios variantes das análises anteriores, utilizando o script VCF2Dis (<https://github.com/BGI-shenzhen/VCF2Dis>) para converter o painel de SNPs em uma matriz de distância.

Diferentes porções do genoma podem retomar diferentes relacionamentos devido a eventos de introgressão e Separação Incompleta de Linhagens (do Inglês, “*Incomplete Lineage Sorting*” - ILS) (Lopes et al., 2021; Martin et al., 2013). Para analisar separadamente segmentos independentes ao longo dos genomas e investigar a existência de possíveis topologias alternativas e suas frequências, os genomas serão divididos em fragmentos genômicos (FGs). Os FGs terão tamanhos de 5, 10, 20 e 50 kb, espaçados por 100 kb, com o objetivo de minimizar o desequilíbrio de ligação (Lopes et al., 2021). Para cada fragmento de cada conjunto, serão aplicados filtros de porcentagem de dados faltantes com trimAl v1.4 (Capella-Gutierrez et al., 2009), excluindo FGs com mais de 20% de dados ausentes. Para reduzir a probabilidade de recombinação entre os fragmentos será empregado o programa 3SEQ (Lam et al., 2018), usando um valor de corte de $p < 0,001$, de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989). A quantificação da informação genética em cada fragmento será realizada por meio da contagem de sítios parcimoniosos com o programa AMAS tools (Borowiec, 2016), descartando FGs com valores de sítios fora do padrão do conjunto de dados.

Todos os FGs de cada conjunto serão submetidos à estimativa filogenética com o programa RAxML-HPC-PHREADS v8.2 (Stamatakis, 2014), estimando uma topologia para cada fragmento com base no método de ML, utilizando o melhor modelo de substituição obtido com a análise com o programa IQ-TREE. Para sumarizar o grande número de topologias geradas na análise anterior, o programa ASTRAL-III (Zhang et al., 2018) será empregado a fim de obter a árvore de espécies mais provável. Para calcular a frequência de cada uma das árvores em cada tamanho de FG, será utilizado o programa Newick Utilities 1.6 (Junier & Zdobnov, 2010) com as extensões *nw_topology* e *nw_order*.

Com o software BPP (Flouri et al., 2022), que utiliza uma abordagem bayesiana e o modelo de coalescência multiespecífica, será estimado o tempo de divergência entre as linhagens utilizando o conjunto de árvores geradas dos FGs que apresentar maior valor de sítios informativos (>5). Os pontos de calibração dessa estimativa serão baseados de acordo com a literatura.

4.4 Análises de mistura genômica

Como mencionado anteriormente, eventos evolutivos, como fluxo gênico e ILS, são comuns na história das espécies e podem impactar na compreensão dos seus relacionamentos quando não considerados nas estimativas filogenéticas. Para avaliar esses sinais e melhor compreender o fluxo entre as populações e eventos de rápida radiação, serão aplicados dois métodos: o teste de Quantificação de Introgessão via Tamanho de Ramo (do Inglês, “*Quantifying Introgression via Branch Lengths*” - QuIBL) (Edelman et al., 2019) e o teste de ABBA-BABA, também chamado de estatística D.

O QuIBL leva em consideração a distribuição de tamanhos de ramos para um determinado trio em diferentes topologias, inferindo e quantificando se aquele relacionamento é melhor explicado por ILS sozinho ou introgessão. Ramos de tamanho pequeno sugerem ILS, enquanto ramos com grande profundidade podem ser melhor explicados por introgessão. Nesta análise, serão empregadas as árvores do tamanho de FG que melhor atenderem ao critério de um valor significativo de sítios informativos (>5), avaliado a partir da análise de sítios parcimoniosos, e com menor probabilidade de recombinação entre fragmentos.

O teste da estatística D, também conhecido como ABBA-BABA, será utilizado para avaliar a proporção da introgessão entre amostras, levando considerando uma topologia com três grupos e um grupo externo: $((P1,P2),P3),O$. O teste se baseia na análise de distribuição de sítios ancestrais (A) e derivados (B), examinando a frequência de padrões ABBA e BABA. Se os valores de ABBA e BABA forem igualmente prováveis para cada par, a hipótese nula é verdadeira. Caso o contrário, excesso de ABBA ou BABA indicam eventos de introgessão entre P3 e P1 ou P3 e P2. A análise será utilizada visando avaliar a possibilidade e intensidade de fluxo entre as populações, agrupando as amostras de acordo com a análise de estruturação populacional, explicada anteriormente. Essa será executada com o programa Dsuite (Malinsky et al., 2021), com o módulo Dtrios, empregando o conjunto completo dos sítios variantes obtidos do BCFtools.

Por fim, para estimar os relacionamentos entre as populações, considerando tanto ILS quanto fluxo gênico (reticulações), será aplicado o método de estimativa de rede filogenética com abordagem bayesiana, utilizando o algoritmo MCMC_GT implementado no programa PhyloNet (Wen et al., 2016). Com base no modelo de coalescência de rede multiespécies, o algoritmo MCMC_GT emprega o método de Cadeia de Markov Monte Carlo com salto reversível para

amostrar a distribuição posterior de redes filogenéticas. A rede com maior probabilidade posterior será considerada a melhor representação dos relacionamentos entre as populações e espécies. Serão utilizadas 2.000 árvores, do mesmo conjunto de árvores inferidas na análise com o QuIBL, escolhidas aleatoriamente por meio de código personalizado.

4.5 Análises de diversidade genética

Nesse projeto, se pretende avaliar a variação genética intraespecífica, uma métrica de extrema importância para a compreensão dos impactos dos processos evolutivos e da adaptação das populações atuais. Dentro do complexo de populações de *S. speluncae*, onde já se foi observada a existência de diversas unidades evolutivas ao longo da sua distribuição (Mata et al., 2009; Pulido-Santacruz et al., 2016), é essencial avaliar essas métricas para melhor compreender o estado de conservação das populações. Serão realizadas análises focadas na heterozigosidade, estimativa de fragmentos de homozigosidade (ROHs, do Inglês “*Runs of Homozygosity*”), na distância genética (d_{xy}/π) e diferenciação genética (F_{ST}).

A heterozigosidade é uma medida que descreve a variabilidade genética de um indivíduo devido à presença de diferenças de frequências alélicas ao longo do genoma. Quanto maior a diversidade genética, melhor a resposta a pressões seletivas e maior capacidade de adaptação (Kardos et al., 2021). Os ROHs, por outro lado, são regiões do genoma em que os alelos herdados são idênticos, podendo ser indicativos de endogamia ou redução do tamanho efetivo (N_e) da população, afetando o *fitness* da espécie ou população, dependendo da quantidade e distribuição desses fragmentos (Kardos et al., 2017; Martin et al., 2023).

Com objetivo de estimar a heterozigosidade e os níveis de ROHs de cada uma das populações, serão empregadas duas abordagens para posterior comparação. Utilizando o arquivo VCF com todos os sítios gerado pelo BCFtools, a heterozigosidade será estimada com o software VCFtools v3.0 (Danecek et al., 2011), calculando a heterozigosidade observada (H_o) e esperadas (H_e) por meio da função --hardy. Esses valores posteriormente serão divididos pelo número de bases de cada genoma. Os ROHs serão estimados com o programa Plink v1.9 (Chang et al., 2015) usando a função --homozyg com um tamanho de janela de no mínimo >250 kb para identificar ROHs ancestrais e >1000 kb para identificar os que não refletem processos ancestrais, como já visto por Martin et al. (2023). A segunda estimativa, será conduzida com o software ROHan (Renaud et al., 2019), o qual utiliza uma abordagem bayesiana que emprega a taxa de

heteroziguidade dos indivíduos como *prior* para estimar a probabilidade dos genótipos de longas regiões de ROHs e, por fim, Watterson theta, pela contagem de sítios polimórficos. Serão utilizados os arquivos BAM gerados no mapeamento, o genoma de referência e um tamanho de janela que não apresente sobreposição.

A diversidade nucleotídica (π) e a distância genética (F_{ST} e D_{xy}) são importantes para averiguar o histórico de diversidade e proximidade entre populações. Enquanto π descreve o número médio de diferenças de nucleotídeos entre indivíduos da mesma população, D_{xy} e F_{ST} quantificam a distância genética com base na distribuição das frequências alélicas entre populações, refletindo o grau de estruturação e manutenção da variabilidade genética (Nei & Li, 1979; Weir & Cockerham, 1984). Para avaliar esses parâmetros, será utilizado o arquivo VCF contendo os sítios variáveis e invariáveis, contabilizando bases em fragmentos genômicos de 100 kb não sobrepostos com o programa pixy v1.0 (Korunes & Samuk, 2021). A vantagem do uso do pixy é o cálculo da comparação dos genótipos, que não assume homoziguidade para o alelo de referência em casos de sítios com dados faltantes, mas desconsidera a base no cálculo final.

4.6 História demográfica

Investigar a história demográfica é importante para compreender como a população responde a diferentes pressões ambientais, como, por exemplo, os ciclos glaciares. As populações, como consequência dessas pressões, podem experimentar gargalos de garrafa e/ou expansões populacionais, o que pode impactar diretamente a diversidade genética disponível (Huynh et al., 2023; Liu et al., 2022; Martin et al., 2023; Wallberg et al., 2014).

A história demográfica das populações ancestral será estimada por meio do método de PSMC (do Inglês, “*Pairwise Sequentially Markovian Coalescent*”) (Li & Durbin, 2011) e MSMC2 (do Inglês, “*multiple sequentially Markovian coalescent*”) (Schiffels & Wang, 2020). O PSMC infere os tamanhos populacionais efetivos a partir da reconstrução do último ancestral comum com base em um único genoma diploide, considerando a densidade de sítios heterozigotos e eventos de recombinação. Com base nas análises anteriores, será selecionada uma amostra de cada população para ser utilizada, além das amostras das demais espécies de *Scytalopus*. Por outro lado, o programa MSMC2 será empregado para estimar a separação genética entre as populações. Para essa análise, serão utilizadas apenas as amostras de *S. spehuncae*. Os arquivos de entrada para os programas serão gerados de acordo com as recomendações de cada manual.

Trabalhos anteriores já hipotetizaram diferentes cenários para as distribuições de táxons ao longo da Mata Atlântica (Leite et al., 2016; Pulido-Santacruz et al., 2016; Thom et al., 2020). Neste trabalho, buscando compreender o tamanho populacional e a dinâmica das populações de tapaculo-preto, diferentes cenários de expansão e contração, além da inclusão ou não de eventos de migrações entre populações, serão testados com o pacote R PipeMaster (Gehara et al., 2017). PipeMaster utiliza do programa msABC (Pavlidis et al., 2010), baseado no modelo de simulação de coalescência, para testar diferentes modelos demográficos. A utilização do pacote, vinculado ao msABC possibilita testar modelos complexos de dinâmica populacional, selecionando o melhor modelo com base em uma abordagem de aprendizagem de máquina.

4.7 Análises de seleção

Com o propósito de investigar se as populações de *S. speluncae* estão sujeitas a pressões seletivas, promovendo sua diferenciação, uma análise de seleção positiva será conduzida incluindo todas as regiões codificantes recuperadas com o BUSCO. Inicialmente, serão extraídas as regiões codificantes de pelo menos duas amostra de cada uma das populações previamente identificadas nas análises anteriores, com um código personalizado. O teste para checar se as regiões estão sob seleção positiva será realizado com o programa HyPhy (Pond et al., 2005), implementando o teste estatístico BUSTED (do Inglês, “*Branch-site Unrestricted Statistical Test for Episodic Diversification*”) (Murrell et al., 2015). O BUSTED verifica se o gene em questão passou por algum episódio de seleção positiva em pelo menos um códon em pelo menos um ramo da topologia. Isso ocorre quando $\omega_3 = 1$, rejeitando a hipótese nula e assumindo que há evidências de que pelo menos um local do gene tenha passado por seleção positiva. Além disso, a BUSTED calcula a Taxa de Evidência, fornecendo a probabilidade de que o modelo alternativo tenha se ajustado melhor aos dados em comparação com o modelo nulo. A análise de seleção será conduzida testando todos os ramos da filogenia quanto à seleção positiva.

5. RESULTADOS ESPERADOS

Com este trabalho, pretende-se compreender melhor a estruturação populacional do complexo do tapaculo-preto, assim como fornecer uma base para a avaliação da divergência entre as linhagens, oferecendo mais dados para embasar as decisões no âmbito da conservação e da real classificação taxonômica da espécie.

Espera-se estimar a melhor resolução no que diz respeito aos relacionamentos taxonômicos e tempo de divergência entre as populações de *S. speluncae*, assim como também os das demais espécies do gênero no clado do leste da América do Sul. É também esperável compreender quais os eventos que influenciaram em suas histórias evolutivas, como fluxo gênico e ILS, além da estimativa da diversidade intraespecífica e os tamanhos populacionais ancestrais e atuais. Por fim, o presente projeto espera responder sobre possíveis sinais de seleção positiva que possam estar influenciando na diversificação das populações.

6. CRONOGRAMA

O projeto tem previsão de duração de 24 meses e terá início após a obtenção e extração do DNA das amostras de tecido e sangue. Em seguida, os DNAs extraídos serão enviados a empresa terceirizada para sequenciamento. A partir da obtenção das sequências já processadas, inicia-se o processo de análise dos dados, com duração de 12 meses, seguida da escrita do manuscrito.

	Meses											
ATIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Obtenção das amostras e extração do DNA	■	■	■									
Sequenciamento				■	■	■						
Análise dos dados							■	■	■	■	■	■
	Meses											
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Revisão bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Análise dos dados	■	■	■	■	■	■						
Escrita do manuscrito							■	■	■	■	■	■

7. ORÇAMENTO

A extração do DNA de possíveis novas amostras que possam ser utilizadas no estudo será feita com o DNeasy Blood & Tissue Kit. As análises de bioinformática serão realizadas com os equipamentos disponíveis no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS. O sequenciamento será realizado aplicando uma cobertura média de 10X na plataforma Illumina em parceria com o Instituto Tecnológico Vale.

Item	Quantidade	Valor total
Plásticos e vidrarias	-	Disponível no Lab. de Biologia Genômica e Molecular
DNeasy Blood & Tissue Kit (50)	1	R\$ 530,0
Envio via FedEx para sequenciamento	1	R\$ 500,00
Sequenciamento	56 amostras	R\$ 94.000,00

REFERÊNCIAS

- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655-1664.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Areta, J. I., & Monteleone, D. L. (2023). Species limits and biogeography of the white-browed tapaculo (*Scytalopus superciliaris*) complex and the Puna tapaculo (*S. simonsi*). *Journal of Ornithology*, 164(1), 13-35.
- Avendaño, J. E., & Donegan, T. M. (2015). A distinctive new subspecies of *Scytalopus griseicollis* (Aves, Passeriformes, Rhinocryptidae) from the northern Eastern Cordillera of Colombia and Venezuela. *ZooKeys*, (506), 137.
- Avendaño, J. E., Cuervo, A. M., López-O, J. P., Gutiérrez-Pinto, N., Cortés-Diago, A., & Cadena, C. D. (2015). A new species of tapaculo (Rhinocryptidae: Scytalopus) from the Serranía de Perijá of Colombia and Venezuela. *The Auk: Ornithological Advances*, 132(2), 450-466.
- Barrow, L. N., Bigelow, A. T., Phillips, C. A., & Lemmon, E. M. (2015). Phylogeographic inference using Bayesian model comparison across a fragmented chorus frog species complex. *Molecular Ecology*, 24(18), 4739-4758.
- Batalha-Filho, H., Pessoa, R. O., Fabre, P. H., Fjeldså, J., Irestedt, M., Ericson, P. G., Silveira, L. F., & Miyaki, C. Y. (2014). Phylogeny and historical biogeography of gnateaters

- (Passeriformes, Conopophagidae) in the South America forests. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79, 422-432.
- BirdLife International (2018). *Scytalopus speluncae*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2018*: e.T22703527A132071050. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22703527A132071050.en>. Recuperado em 14 de outubro de 2023.
- BirdLife International (2022). *Scytalopus diamantinensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2022*: e.T22736188A215960894. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-2.RLTS.T22736188A215960894.en>. Recuperado em 04 de novembro de 2023.
- BirdLife International (2022). *Scytalopus gonzagai*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2022*: e.T103661238A215965299. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-2.RLTS.T103661238A215965299.en>. Recuperado em 04 de novembro de 2023.
- BirdLife International (2018). *Scytalopus novacapitalis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2018*: e.T22703531A131361562. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22703531A131361562.en>. Recuperado em 05 de novembro de 2023.
- Bolívar-Leguizamón, S. D., Silveira, L. F., Derryberry, E. P., Brumfield, R. T., & Bravo, G. A. (2020). Phylogeography of the variable antshrike (*Thamnophilus caerulescens*), a South American passerine distributed along multiple environmental gradients. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 148, 106810.
- Bornschein, M. R., Maurício, G. N., Belmonte-Lopes, R., Mata, H., & Bonatto, S. L. (2007). Diamantina tapaculo, a new *Scytalopus* endemic to the Chapada Diamantina, northeastern Brazil (Passeriformes: Rhinocryptidae). *Revista Brasileira de Ornitologia*, 15(2), 151-174.
- Bornschein, M. R., Reinert, B. L., & Pichorim, M. (1998). Descrição, ecologia e conservação de um novo *Scytalopus* (Rhinocryptidae) do sul do Brasil, com comentários sobre a morfologia da família. *Ararajuba*, 6(1), 3-36.
- Borowiec, M. L. (2016). AMAS: a fast tool for alignment manipulation and computing of summary statistics. *PeerJ*, 4, Artigo e1660.
- Broad Institute. (2019). *Picard Toolkit*. Obtido do <https://broadinstitute.github.io/picard/>
- Butlin, R. K. (2010). Population genomics and speciation. *Genetica*, 138(4), 409-418.
- Cabanne, G. S., Calderón, L., Trujillo Arias, N., Flores, P., Pessoa, R., d'Horta, F. M., & Miyaki, C. Y. (2016). Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(4), 856-872.
- Cadena, C. D., & Céspedes, L. N. (2020). Origin of elevational replacements in a clade of nearly flightless birds: most diversity in tropical mountains accumulates via secondary contact following allopatric speciation. In V., Rull, & A. C., Carnaval (Eds.). *Neotropical diversification: Patterns and processes* (pp. 635-659). Springer.

- Cadena, C. D., Cuervo, A. M., Céspedes, L. N., Bravo, G. A., Krabbe, N., Schulenberg, T. S., Derryberry, G. E., Silveira, L. F., Derryberry, E. P., Brumfield, R. T., & Fjeldså, J. (2020). Systematics, biogeography, and diversification of *Scytalopus tapaculos* (Rhinocryptidae), an enigmatic radiation of Neotropical montane birds. *The Auk*, *137*(2), Artigo ukz077.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, *25*(15), 1972-1973.
- Carnaval, A. C., & Moritz, C. (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, *35*(7), 1187-1201.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F., Rodrigues, M. T., & Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, *323*(5915), 785-789.
- Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M., & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*, *4*(1), Artigo s13742-015.
- Clements, J. F., Rasmussen, P. C., Schulenberg, T. S., Iliff, M. J., Fredericks, T. A., Gerbracht, J. A., Lepage, D., Spencer, A., Billerman, S. M., Sullivan, B. L., & Wood, C. L. (2023). *The eBird/Clements checklist of birds of the world: v2023*. Baixado de <https://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/>
- Coopmans, P., Krabbe, N., & Schulenberg, T. S. (2001). Vocal evidence of species rank for nominate unicolored tapaculo *Scytalopus unicolor*. *Bulletin-British Ornithologists Club*, *121*(3), 208-212.
- Cuervo, A. M., Cadena, C. D., Krabbe, N., & Renjifo, L. M. (2005). *Scytalopus stilesi*, a new species of tapaculo (Rhinocryptidae) from the Cordillera Central of Colombia. *The Auk*, *122*(2), 445-463.
- Cunha, I. L. D., Reis, M. G., Fieker, C. Z., & Dias, M. M. (2020). Brasília tapaculo (*Scytalopus novacapitalis*) seasonality and site occupancy in altitudinal riparian environments after non-natural burnings and feral pig invasion in Serra da Canastra National Park, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, *81*, 278-284.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, *10*(2), giab008.
- de Moraes, L. A., Bornschein, M. R., Gatto, C. A. F. R., Santos, S. S. D., & Maurício, G. N. (2018). Taxonomic review of the rhinocryptid genus *Eleoscytalopus* (I): Bahia tapaculo (*E. psychopompus*) is vocally and morphologically distinct from white-breasted tapaculo (*E. indigoticus*). *The Auk: Ornithological Advances*, *135*(4), 1009-1019.
- Donegan, T. M., & Avendaño, J. E. (2008). Notes on tapaculos (Passeriformes: Rhinocryptidae) of the eastern Andes of Colombia and the venezuelan Andes, with a new subspecies of *Scytalopus griseicollis* from Colombia: Notas sobre tapaculos (Passeriformes: Rhinocryptidae)

de la cordillera Oriental de Colombia y los Andes venezolanos, con una nueva subespecie de *Scytalopus griseicollis* de Colombia. *Ornitología Colombiana*, 6, 24-65.

- Dusseux, N., Van Der Valk, T., Morales, H. E., Wheat, C. W., Díez-del-Molino, D., Von Seth, J., Foster, Y., Kutschera, V. E., Guschanski, K., Rhie, A., Phillippy, A. M., Korlach, J., Howe, K., Chow, W., Pelan, S., Damas, J. D. M., Lewin, H. A., Hastie, A. R., Formenti, G., Fedrigo, O., Guhlin, J., Harrop, T. W. R., Lec, M. F. L., Dearden, P. K., Haggerty, L., Martin, F. J., Kodali, V., Thibaud-Nissen, F., Iorns, D., Knapp, M., Gemmell, N. J., Robertson, F., Moorhouse, R., Digby, A., Eason, D., Vercoe, D., Howard, J., Jarvis, E. D., Robertson, B. C., & Dalén, L. (2021). Population genomics of the critically endangered kākāpō. *Cell Genomics*, 1(1), Artículo 100002.
- Edelman, N. B., Frandsen, P. B., Miyagi, M., Clavijo, B., Davey, J., Dikow, R. B., García-Accinelli, G., Belleghem, S. M. V., Patterson, N., Neafsey, D. E., Challis, R., Kumar, S., Moreira, G. R., Salazar, C., Chouteau, M., Counterman, B. A., Papa, R., Blaxter, M., Reed, R. D., Dasmahapatra, K. K., Kronforst, M., Joron, M., Jiggins, C. D., McMillan, W. O., di Palma, F., Blumberg, A. J., Wakeley, J., Jaffe, D., & Mallet, J. (2019). Genomic architecture and introgression shape a butterfly radiation. *Science*, 366(6465), 594-599.
- Felsenstein, J. (1993). *PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5 c*. Joseph Felsenstein..
- Flouri, T., Jiao, X., Rannala, B., & Yang, Z. (2018). Species tree inference with BPP using genomic sequences and the multispecies coalescent. *Molecular Biology and Evolution*, 35(10), 2585-2593.
- Gehara, M., Mazzochinni, G. G., & Burbrink, F. (2020). PipeMaster: inferring population divergence and demographic history with approximate Bayesian computation and supervised machine-learning in R. *BioRxiv*, 2020-12.
- Harvey, M. G., & Brumfield, R. T. (2015). Genomic variation in a widespread Neotropical bird (*Xenops minutus*) reveals divergence, population expansion, and gene flow. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 305-316.
- Holt, B. G., Lessard, J. P., Borregaard, M. K., Fritz, S. A., Araújo, M. B., Dimitrov, D., Fabre, P., Graham, C. H., Graves, G. R., Jønsson, K. A., Nogués-Bravo, D., Wang, Z., Whittaker, R. J., Fjeldå, J., & Rahbek, C. (2013). An update of Wallace's zoogeographic regions of the world. *Science*, 339(6115), 74-78.
- Hohenlohe, P. A., Funk, W. C., & Rajora, O. P. (2021). Population genomics for wildlife conservation and management. *Molecular Ecology*, 30(1), 62-82.
- Hosner, P. A., Robbins, M. B., Valqui, T., & Peterson, A. T. (2013). A new species of *Scytalopus* tapaculo (Aves: Passeriformes: Rhinocryptidae) from the Andes of central Peru. *The Wilson Journal of Ornithology*, 125(2), 233-242.
- Junier, T., & Zdobnov, E. M. (2010). The Newick utilities: high-throughput phylogenetic tree processing in the UNIX shell. *Bioinformatics*, 26(13), 1669-1670.

- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, *14*(6), 587-589.
- Kardos, M., Armstrong, E. E., Fitzpatrick, S. W., Hauser, S., Hedrick, P. W., Miller, J. M., Tallmon, D. A., & Funk, W. C. (2021). The crucial role of genome-wide genetic variation in conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(48), Article e2104642118.
- Kardos, M., Qvarnström, A., & Ellegren, H. (2017). Inferring individual inbreeding and demographic history from segments of identity by descent in ficedula flycatcher genome sequences. *Genetics*, *205*(3), 1319-1334.
- Korneliussen, T. S., Albrechtsen, A., & Nielsen, R. (2014). ANGSD: Analysis of next generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 1-13.
- Korunes, K. L., & Samuk, K. (2021). pixy: Unbiased estimation of nucleotide diversity and divergence in the presence of missing data. *Molecular Ecology Resources*, *21*(4), 1359-1368.
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, *35*(21), 4453-4455.
- Krabbe, N., & Cadena, C. D. (2010). A taxonomic revision of the paramo tapaculo *Scytalopus canus* Chapman (Aves: Rhinocryptidae), with description of a new subspecies from Ecuador and Peru. *Zootaxa*, *2354*(1), 56-66.
- Krabbe, N., & Schulenberg, T. S. (1997). Species limits and natural history of *Scytalopus* tapaculos (Rhinocryptidae), with descriptions of the Ecuadorian taxa, including three new species. *Ornithological Monographs*, *48*, 47-88.
- Krabbe, N., & Schulenberg, T. S. (2003). Family Rhinocryptidae (Tapaculos). In J., del Hoyo, A., Elliott, & D., Christie (Eds.). *Handbook of the birds of the world* (Vol. 8, pp. 748–787). Lynx Ed.
- Krabbe, N. K., Schulenberg, T. S., Hosner, P. A., Rosenberg, K. V., Davis, T. J., Rosenberg, G. H., Lane, D. F., Andersen, M. J., Robbins, M. B., Cadena, C. D., Valqui, T., Salter, J. F., Spencer, A. J., Angulo, F., & Fjeldså, J. (2020). Untangling cryptic diversity in the High Andes: Revision of the *Scytalopus* [*magellanicus*] complex (Rhinocryptidae) in Peru reveals three new species. *The Auk*, *137*(2), Article ukaa003.
- Krabbe, N., Schulenberg, T. S., & Kirwan, G. M. (2020). Mouse-colored Tapaculo (*Scytalopus spelunca*), version 1.0. In J., del Hoyo, A., Elliott, J., Sargatal, D. A., Christie, & E., de Juana (Eds.). *Birds of the world*. Cornell Lab of Ornithology.
- Lam, H. M., Ratmann, O., & Boni, M. F. (2018). Improved algorithmic complexity for the 3SEQ recombination detection algorithm. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(1), 247-251.

- Lavinia, P. D., Escalante, P., García, N. C., Barreira, A. S., Trujillo-Arias, N., Tubaro, P. L., Naoki, K., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., & Lijtmaer, D. A. (2015). Continental-scale analysis reveals deep diversification within the polytypic red-crowned ant tanager (*Habia rubica*, Cardinalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *89*, 182-193.
- Lees, A. C., Haskell, L., Allinson, T., Bezeng, S. B., Burfield, I. J., Renjifo, L. M., Rosenberg, K. V., Viswanathan, A., & Butchart, S. H. (2022). State of the world's birds. *Annual Review of Environment and Resources*, *47*, 231-260.
- Leite, Y. L., Costa, L. P., Loss, A. C., Rocha, R. G., Batalha-Filho, H., Bastos, A. C., Quarema, V. S., Fagundes, V., Paresque, R., Passamani, M., & Pardini, R. (2016). Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(4), 1008-1013.
- Levy, S. E., & Myers, R. M. (2016). Advancements in next-generation sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *17*, 95-115.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics*, *25*(14), 1754-1760.
- Li, H., & Durbin, R. (2011). Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature*, *475*(7357), 493-496.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078-2079.
- Lopes, F., Oliveira, L. R., Kessler, A., Beux, Y., Crespo, E., Cárdenas-Alayza, S., Majluf, P., Sepúlveda, M., Brownell Jr., R. L., Franco-Trecu, V., Páez-Rosas, D., Chavez, J., Loch, C., Robertson, B. C., Acevedo-Whitehouse, K., Elorriaga-Verplancken, F. R., Kirkman, S. P., Peart, C. R., Wolf, J. B. W., & Bonatto, S. L. (2021). Phylogenomic discordance in the eared seals is best explained by incomplete lineage sorting following explosive radiation in the southern hemisphere. *Systematic Biology*, *70*(4), 786-802.
- Lopes, F., Oliveira, L. R., Beux, Y., Kessler, A., Cárdenas-Alayza, S., Majluf, P., Páez-Rosas, D., Chaves, J., Crespo, E., Brownell Jr., R. L., Baylis, A. M. M., Sepúlveda, M., Fraco-Trecu, V., Loch, C., Robertson, B. C., Peart, C. R., Wolf, J. B. W., & Bonatto, S. L. (2023). Genomic evidence for homoploid hybrid speciation in a marine mammal apex predator. *Science Advances*, *9*(18), Artigo eadf6601.
- Luikart, G., England, P. R., Tallmon, D., Jordan, S., & Taberlet, P. (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, *4*(12), 981-994.
- Luna, L. W., Naka, L. N., Thom, G., Knowles, L. L., Sawakuchi, A. O., Aleixo, A., & Ribas, C. C. (2023). Late Pleistocene landscape changes and habitat specialization as promoters of population genomic divergence in Amazonian floodplain birds. *Molecular Ecology*, *32*(1), 214-228.

- Malinsky, M., Matschiner, M., & Svardal, H. (2021). Dsuite-Fast D-statistics and related admixture evidence from VCF files. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 584-595.
- Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 38(10), 4647-4654.
- Martin, C. A., Sheppard, E. C., Illera, J. C., Suh, A., Nadachowska-Brzyska, K., Spurgin, L. G., & Richardson, D. S. (2023). Runs of homozygosity reveal past bottlenecks and contemporary inbreeding across diverging populations of an island-colonizing bird. *Molecular Ecology*, 32(8), 1972-1989.
- Martin, S. H., Dasmahapatra, K. K., Nadeau, N. J., Salazar, C., Walters, J. R., Simpson, F., Blaxter, M., Manica, A., Mallet, J., & Jiggins, C. D. (2013). Genome-wide evidence for speciation with gene flow in *Heliconius* butterflies. *Genome Research*, 23(11), 1817-1828.
- Mata, H., Fontana, C. S., Maurício, G. N., Bornschein, M. R., de Vasconcelos, M. F., & Bonatto, S. L. (2009). Molecular phylogeny and biogeography of the eastern tapaculos (Aves: Rhinocryptidae: *Scytalopus*, *Eleoscytalopus*): Cryptic diversification in Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(2), 450-462.
- Maurício, G. N. (2005). Taxonomy of southern populations in the *Scytalopus speluncae* group, with description of a new species and remarks on the systematics and biogeography of the complex (Passeriformes: Rhinocryptidae). *Ararajuba*, 13(1), 7-28.
- Maurício, G. N., Belmonte-Lopes, R., Pacheco, J. F., Silveira, L. F., Whitney, B. M., & Bornschein, M. R. (2014). Taxonomy of “mouse-colored tapaculos”(II): An endangered new species from the montane Atlantic Forest of southern Bahia, Brazil (Passeriformes: Rhinocryptidae: *Scytalopus*). *The Auk: Ornithological Advances*, 131(4), 643-659.
- Maurício, G. N., & Bornschein, M. R. (2017). On identification errors in *Scytalopus speluncae* (Ménétriés) and *S. pachecoi* Maurício from southern Brazil with new data on distribution and biogeography of these taxa (Aves: Rhinocryptidae). *Zootaxa*, 4350(3), 595-599.
- Maurício, G. N., Mata, H., Bornschein, M. R., Cadena, C. D., Alvarenga, H., & Bonatto, S. L. (2008). Hidden genertic diversity in Neotropical birds: Molecular and anatomical data support a new genus for the “*Scytalopus*” *indigoticus* species-group (Aves: Rhinocryptidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 125-135.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Milá, B., Tavares, E. S., Munoz Saldana, A., Karubian, J., Smith, T. B., & Baker, A. J. (2012). A trans-Amazonian screening of mtDNA reveals deep intraspecific divergence in forest birds and suggests a vast underestimation of species diversity. *PLoS One*, 7(7), Artigo e40541.

- Musher, L. J., Giakoumis, M., Albert, J., Del-Rio, G., Rego, M., Thom, G., Aleixo, A., Ribas, C. C., Brumfield, R. T., Smith, B. T., & Cracraft, J. (2022). River network rearrangements promote speciation in lowland Amazonian birds. *Science Advances*, 8(14), Artigo eabn1099.
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.
- Nemesio, A., Rasmussen, C., Aguiar, A. P., Pombal Jr, J. P., & Dubois, A. (2013). Nomenclatural issues in ornithology: The incredible controversy on the identity of a long overlooked Brazilian bird. *Zootaxa*, 3734(2), 241-258.
- Ortiz, E. M. (2019). *Vcf2phylip v2.0: convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis* [Programa de Computador]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2540861>
- Pacheco, J. F. (2004). Pílulas históricas VI Sabará ou Cuiabá? O problema das localidades de Ménériès. *Atualidades Ornitológicas*, 117, 4-5.
- Pavlidis, P., Laurent, S., & Stephan, W. (2010). msABC: A modification of Hudson's ms to facilitate multi-locus ABC analysis. *Molecular Ecology Resources*, 10(4), 723-727.
- Pond, S. L. K., Frost, S. D., & Muse, S. V. (2005). HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*, 21(5), 676-679.
- Pulido-Santacruz, P., Bornschein, M. R., Belmonte-Lopes, R., & Bonatto, S. L. (2016). Multiple evolutionary units and demographic stability during the last glacial maximum in the *Scytalopus speluncae* complex (Aves: Rhinocryptidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102, 86-96.
- Rahbek, C., Borregaard, M. K., Colwell, R. K., Dalgaard, B. O., Holt, B. G., Morueta-Holme, N., Nogues-Bravo, D., Whittaker, R. J., & Fjeldså, J. (2019). Humboldt's enigma: What causes global patterns of mountain biodiversity? *Science*, 365(6458), 1108-1113.
- Rahbek, C., & Graves, G. R. (2001). Multiscale assessment of patterns of avian species richness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4534-4539.
- Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., Heyne, S., Dündar, F., & Manke, T. (2016). deepTools2: A next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 44, Artigo W160.
- Raposo, M. A., & Kirwan, G. M. (2008). The Brazilian species complex *Scytalopus speluncae*: how many times can a holotype be overlooked. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 16(1), 78-81.
- Raposo, M. A., Stopiglia, R., Loskot, V., & Kirwan, G. M. (2006). The correct use of the name *Scytalopus speluncae* (Ménétriès, 1835), and the description of a new species of Brazilian tapaculo (Aves: Passeriformes: Rhinocryptidae). *Zootaxa*, 1271(1), 37-56.

- Reel, P. S., Reel, S., Pearson, E., Trucco, E., & Jefferson, E. (2021). Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review. *Biotechnology Advances*, *49*, 107739.
- Renaud, G., Hanghøj, K., Korneliussen, T. S., Willerslev, E., & Orlando, L. (2019). Joint estimates of heterozygosity and runs of homozygosity for modern and ancient samples. *Genetics*, *212*(3), 587-614.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, *43*(1), 223-225.
- Rull, V., & Carnaval, A. C. (2020). *Neotropical diversification: Patterns and processes*. Berlin, Alemanha: Springer.
- Schiffels, S., & Wang, K. (2020). MSMC and MSMC2: the multiple sequentially markovian coalescent. In J. Y., Dutheil (Ed.). *Statistical population genomics* (pp. 147-165). Humana.
- Sedano, R. E., & Burns, K. J. (2010). Are the Northern Andes a species pump for Neotropical birds? Phylogenetics and biogeography of a clade of Neotropical tanagers (Aves: Thraupini). *Journal of Biogeography*, *37*(2), 325-343.
- Smit, A. F. A., Hubley, R. & Green, P. (2015) *RepeatMasker Open-4.0* [Programa de Computador]. <http://www.repeatmasker.org>.
- Stotz, D. F. (1996). *Neotropical birds: Ecology and conservation*. University of Chicago Press.
- Schubert, M., Ermini, L., Sarkissian, C. D., Jónsson, H., Ginolhac, A., Schaefer, R., Martin, M. D., Fernández, R., Kircher, M., McCue, M., Willerslev, E., & Orlando, L. (2014). Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. *Nature Protocols*, *9*(5), 1056-1082.
- Schubert, M., Lindgreen, S., & Orlando, L. (2016). AdapterRemoval v2: Rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Research Notes*, *9*(1), 1-7.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312-1313.
- Supple, M. A., & Shapiro, B. (2018). Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biology*, *19*, 1-12.
- Thom, G., Xue, A. T., Sawakuchi, A. O., Ribas, C. C., Hickerson, M. J., Aleixo, A., & Miyaki, C. (2020). Quaternary climate changes as speciation drivers in the Amazon floodplains. *Science Advances*, *6*(11), Artigo eaax4718.
- Thome, M. T. C., Zamudio, K. R., Haddad, C. F., & Alexandrino, J. (2014). Barriers, rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, *23*(24), 6152-6164.

- Vasconcelos, M. A., Maurício, G. N., Kirwan, G. M., & Silveira, L. F. (2008). Range extension for marsh tapaculo *Scytalopus iraiensis* to the highlands of Minas Gerais, Brazil, with an overview of the species' distribution. *Bulletin-British Ornithologists Club*, 128(2), 101.
- von Haeseler, A., Schmidt, H. A., Bui, M. Q., & Nguyen, L. T. (2014). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268 -274.
- Wang, Q., Lan, T., Li, H., Sahu, S. K., Shi, M., Zhu, Y., Han, L., Yang, S., Li, Q., Zhang, L., Deng, Z., Liu, H., & Hua, Y. (2022). Whole-genome resequencing of Chinese pangolins reveals a population structure and provides insights into their conservation. *Communications Biology*, 5(1), 821.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- Wen, D., Yu, Y., Zhu, J., & Nakhleh, L. (2018). Inferring phylogenetic networks using PhyloNet. *Systematic Biology*, 67(4), 735-740.
- Whitney, B. M., de Vasconcelos, M. F., Silveira, L. F., & Pacheco, J. F. (2010). *Scytalopus petrophilus* (rock tapaculo): A new species from Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 18(2), 73.
- Yan, C., Song, M. H., Jiang, D., Ren, J. L., Lv, Y., Chang, J., Huang, S., Zaher, H., & Li, J. T. (2023). Genomic evidence reveals intraspecific divergence of the hot-spring snake (*Thermophis baileyi*), an endangered reptile endemic to the Qinghai-Tibet plateau. *Molecular Ecology*, 32(6), 1335-1350.
- Zhang, C., Rabiee, M., Sayyari, E., & Mirarab, S. (2018). ASTRAL-III: polynomial time species tree reconstruction from partially resolved gene trees. *BMC Bioinformatics*, 19(6), 15-30.

Apêndice I – Tabela com as amostras que serão utilizadas no presente estudo e que se encontram disponíveis no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS.

Espécie	Localidade	Coordenada	Amostra
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	São Francisco de Paula, RS, Brasil	29°27'48"S, 50°37'30"W	MCP 1169
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	São Francisco de Paula, RS, Brasil	29°21'20"S, 50°04'16"W	MCP 1076
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Santo Antônio, RS, Brasil	29°29'16"S, 50°20'21"W	MCP 983
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Santo Antônio, RS, Brasil	29°29'16"S, 50°20'21"W	MCP 984
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra da Boa União, RS, Brasil	29°23'16"S, 50°06'57"W	MCP 1170
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra do Umbu, RS, Brasil	29°30'18"S, 50°19'26"W	MCP 987
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Cerro do Galo, SC, Brasil	26°26'06"S, 51°05'51"W	MCP 2429
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Cerro do Galo, SC, Brasil	26°26'06"S, 51°05'51"W	MCP 2431
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Bom Jardim da Serra, SC, Brasil	28°34'07"S, 49°39'17"W	MCP 2167
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Morro do Funil, SC, Brasil	27°16'25"S, 50°07'43"W	MCP 2066
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Parque Estadual da Serra Furada, SC, Brasil	28°09'56"S, 49°25'14"W	MCP 2529
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra das Bateias, SC, Brasil	27°02'26"S, 48°58'33.50"W	Sample 125
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra do Quiriri, SC, Brasil	26°01'32"S, 48°57'14"W	MCP 2034
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra do Capivari, PR, Brasil	25°07'57"S, 48°49'15"W	MCP 2211
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Cerro das Flores, PR, Brasil	25°02'22"S, 48°47'40"W	MCP 2528
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Entre Palmeira e Ponta Grossa, PR, Brasil	25°17'23"S, 49°50'50"W	MCP 2039
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Campo Largo, PR, Brasil	25°25'36"S, 49°42'59"W	MCP 2163
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Tibagi, PR, Brasil	25°25'36"S, 49°42'59"W	MCP 2037
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra da Boa Esperança, Irati, PR, Brasil	25°34'28"S, 50°59'01"W	MCP 2065
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra da Boa Esperança, Irati, PR, Brasil	25°47'49"S, 51°00'28"W	Sample 122
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	General Carneiro, PR, Brasil	26°32'11"S, 51°25'05"W	MCP 1106
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Balsa Nova, PR, Brasil	25°29'06"S, 49°39'08"W	MHNCI 5984
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Quatro Barras, PR, Brasil	25°20'21"S, 48°55'03"W	MCP 2225
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Entre Adrianópolis e Tunas do Paraná, PR, Brasil	24°52'01"S, 48°44'28"W	Sample 145
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Tunas do Paraná, PR, Brasil	24°59'15"S, 48°47'27"W	MCP 2526
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Piraquara, PR, Brasil	25°28'55"S, 48°58'21"W	MCP 2531
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Balsa Nova, PR, Brasil	25°28'24"S, 49°38'20"W	MCP 2067
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Guaratuba, PR, Brasil	25°53'27"S, 48°57'25"W	MCP 2032
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Guaratuba, PR, Brasil	25°53'27"S, 48°57'25"W	MCP 2033
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra da Boa Esperança, Mallet, PR, Brasil	25°47'49"S, 51°00'28"W	Sample 123
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Nova Friburgo, RJ, Brasil	22°21'18"S, 42°33'49"W	MCP 1995
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Serra São Bernardo, RJ, Brasil	22°20'32"S, 42°27'05"W	MCP 1994
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Registro, RJ, Brasil	22°22'34"S, 44°45'44"W	MCP 1997
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Registro, RJ, Brasil	22°22'34"S, 44°45'44"W	MCP 1999
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Delfim Moreira, RJ, Brasil	22°32'40"S, 45°12'12"W	MCP 1172
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Delfim Moreira, MG, Brasil	22°32'40"S, 45°12'12"W	MCP 1173
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Camanducaia, MG, Brasil	22°53'08"S, 46°01'43"W	MCP 2047

<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Camanducaia, MG, Brasil	22°53'08"S, 46°01'43"W	MCP 2048
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Divino, MG, Brasil	20°31'16"S, 42°04'17"W	MCP 1723
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Extrema, MG, Brasil	22°53'17"S, 46°19'03"W	MCP 2049
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Extrema, MG, Brasil	22°53'17"S, 46°19'03"W	MCP 2474
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Pico dos Marins, SP, Brasil	22°30'00"S, 45°07'56"W	MCP 1177
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Cunha, SP, Brasil	23°09'42"S, 44°51'43"W	MCP 2051
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	São José do Barreiro, SP, Brasil	22°41'40"S, 44°37'57"W	MCP 1989
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	São José do Barreiro, SP, Brasil	22°41'40"S, 44°37'57"W	MCP 1992
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Cunha, SP, Brasil	23°13'42"S, 45°07'37"W	MCP 1988
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Apiai, SP, Brasil	24°23'50"S, 48°38'10"W	MCP 217
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Chapéu, SP, Brasil	24°23'03"S, 49°10'22"W	MCP 2173
<i>Scytalopus speluncae</i> complexo	Piedade, SP, Brasil	23°56'48"S, 47°24'06"W	MCP 2261
<i>Scytalopus diamantinensis</i>	Chapada Diamantina, BA, Brasil	13°26'24"S, 41°23'52.8"W	MCP 1896
<i>Scytalopus petrophilus</i>	Catas Altas, MG, Brasil	13°26'24"S, 41°23'52.8"W	MCP 2215
<i>Scytalopus pachecoi</i>	Morro Redondo, RS, Brasil	31°40'01.2"S, 52°34'40.8"W	MCP 976
<i>Scytalopus iraiensis</i>	Quatro Barras, PR, Brasil	25°22'37.2"S, 49°00'14.4"W	MPEG 52945
<i>Scytalopus novacapitalis</i>	Distrito Federal, Brasil	15°57'57.6"S, 47°50'02.4"W	MCP 1481
<i>Scytalopus gonzagai</i>	Serra das Lontras, Município de Aratoca, BA, Brasil	15°10'01.2"S, 39°20'24"W	MCP 2007
<i>Eleoscytalopus indigoiticus</i>	Duas Barras, RJ, Brazil	13°26'24"S, 41°23'52.8"W	MCP 1721