



Leonardo Moura dos Santos Soares

SISTEMÁTICA MOLECULAR E
DIVERSIFICAÇÃO DOS GÊNEROS *Nonnula* e
Monasa (AVES: BUCCONIDAE)



SISTEMÁTICA MOLECULAR E
DIVERSIFICAÇÃO DOS GÊNEROS *Nonnula* e *Monasa*
(AVES: BUCCONIDAE)

Leonardo Moura dos Santos Soares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Doutorado do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de doutor em Zoologia

Orientador: Dr. Marcos Pérsio

Co-orientador: Dr. Alexandre Aleixo

BELÉM – PARÁ

2017

“Uma longa viagem começa com um único passo”

Lao-Tsé

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S676s Soares, Leonardo Moura dos Santos
Sistemática Molecular e Diversificação dos Gêneros *Nonnula* e *Monasa* (Aves: *Bucconidae*) /
Leonardo Moura dos Santos Soares. - 2016.
117 f. : il. color.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Zoologia (PPGZOOL), Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Marcos Pérsio Dantas Santos Santos
Coorientação: Prof. Dr. Alexandre Aleixo.
1. Filogeografia. 2. Diversificação Neotropical. 3. Diversidade críptica. 4. Complexo de espécies. I.
Santos, Marcos Pérsio Dantas Santos, *orient.* II. Título

CDD576.8

LEONARDO MOURA DOS SANTOS SOARES

SISTEMÁTICA MOLECULAR E DIVERSIFICAÇÃO
DOS GÊNEROS *Nonnula* e *Monasa* (AVES: BUCCONIDAE)

Dr. Marcos Pérsio Dantas Santos
Orientador
Universidade Federal do Pará

Dr. Fábio Raposo do Amaral
Universidade Federal de São Paulo

Dra. Camila Ribas
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Dr. Alexander Fernandes
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Alexander Lees
Cornell University

Dr. Péricles Sena do Rego
Universidade federal do Pará

Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza
Universidade Federal do Pará

Dr. Marcos Maldonado Coelho
Universidade Federal de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Capes e ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia pela concessão da bolsa de pesquisa e por tornar viável a realização desse projeto de doutoramento.

Ao Orientador Dr. Marcos Pérsio pelas relevantes contribuições e incentivos ao longo do doutorado.

Ao Dr. Alexandre Aleixo pela co-orientação e pela excelente contribuição na minha formação, auxílio para a elaboração e realização deste projeto e pelo seu empenho durante esse tempo.

Ao Dr. John Bates por ter me concedido a oportunidade de desenvolver parte do trabalho em *The Field Museum Natural History* e todos os seus ensinamentos e auxílio para a realização desse trabalho.

Aos curadores e responsáveis pelas coleções científicas que gentilmente disponibilizaram material para o desenvolvimento deste trabalho Lima, F, e Aleixo, A. (MPEG), Rice, N (ANSP), Miyaki, C. Y. (LGEMA), Ribas, C. C. (INPA), Dittman, D. L. e Brumfield, R. (LSUMZ), Robbins, M. B. (KU), Bates, J. (FMNH) Santos, F. (UFMG) e Raposo, M. (MNRJ) e Graves, G. (SNMNH).

À Fátima Lima pelo excelente trabalho prestado à frente da Coleção Ornitológica do MPEG.

Aos amigos de laboratório: Lucas Eduardo, Tibério Burlamaqui, Joiciane, Sidnei Dantas, Leo Miranda, Lincoln carneiro, Aurea, Pablo e Gabriela, Bernardo, Tânia, Tainá, Ângelo, Marcela Lima, Sofia, Tiago, Bruno e Ana Kelly. Em especial o amigo Geraldo pela excelente ajuda no sequenciamento do material e à Marcela Lima pelo apoio ao longo desse trabalho.

Um Agradecimento especial à Gabriela, Pablo, Leo Trevelin, Cassia, Youssef e Leandra e Fernanda. Valeu galera do Siribolo. E a Gabriela, Pablo e Trevelin pela hospedagem em Belém sempre que precisei.

Aos Amigos de Teresina: Nayro, Raimundo, André e Fábio Lopes pelo apoio durante todo esse tempo.

Aos amigos que fiz em Chicago ao longo do doutorado sanduíche: John Bates, Bruce Paterson, Ben Marks, David, Dylan Maddox, Noé e Kevin. E os Brasileiros João Capurucho, Júlio Vilela, Anderson Feijó, Rodolfo Probst, Ianna e Ana Soares. E em especial os amigos Hannah e Elmer pelos tur em Chigado. Valeu galera.

Aos amigos do Museu: João, Adriano Maciel, Pedro Peloso, Marcelo Sturaro, Marina, Fernanda Santos, André Raveta, Daniel Coutinho, André Luís. E ao pessoal do futebol pelos momentos de descontração.

Aos Membros da banca por aceitarem revisar nosso trabalho.

À minha família, que sem dúvidas me ajudaram bastante: em especial meus pais Maria de Jesus e João Evangelista que trabalharam bastante para que tudo isso fosse possível; aos meus irmãos: Márcio Cleto, Mara Layanne, Marcos Lívio e Laércio; aos cunhados: Glaucus, Mayara, Andressa e Daniele e aos sobrinhos: Emylle, Isadora, Lívia, João e Sofia.

Um Agradecimento especial à minha namorada Rafaela Sousa pelo apoio incondicional na reta final dessa jornada e à minha segunda família: Seu José e dona Jesus, Ravena, Vinicius, André e Naisy, vocês foram muito importantes.

Muito obrigado

Sumário

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVO	17
Objetivo Geral.....	17
Objetivos Específicos	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 1	21
Molecular systematics of nunlets (<i>Nonnula</i>: Birds, Bucconidae): ancient and cryptic diversification across Neotropical lowland forests	22
ABSTRACT	23
INTRODUCTION.....	24
MATERIAL AND METHODS	26
Sampling	26
Phylogenetic analyses	27
Species trees and divergence times.....	28
Ancestral area reconstruction.....	29
RESULTS	30
Phylogenetic analyses	30
Species Tree estimation	31
Diversification time	32
Ancestral area reconstruction.....	33
DISCUSSION	34
Diversity and systematics in the <i>Nonnula rubecula</i> , Rusty-breasted Nunlet complex.....	34
Diversity and systematics in the <i>Nonnula ruficapilla</i> complex.....	37
Origin and historical diversification of the genus <i>Nonnula</i>	38
REFERENCES.....	43

List of Tables	51
List of figures.....	51
Supporting Information.....	60
CAPÍTULO 2	70
Filogenia e biogeografia histórica de <i>Monasa</i> (Aves Bucconidae) na região Neotropical.....	71
RESUMO	72
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	75
<i>Amostragem</i>	75
<i>Análises filogenéticas</i>	76
<i>Árvores de espécies e tempos de divergência</i>	77
<i>Delimitação de espécies baseado em coalescência</i>	78
<i>Genética de populações e demografia histórica</i>	79
RESULTADOS.....	79
<i>Análises filogenéticas</i>	79
<i>Estimativas de diversificação e a árvore de espécies</i>	81
<i>Delimitação de espécies usando BP&P</i>	81
<i>Genética de populações e demografia histórica</i>	82
DISCUSSÃO.....	83
<i>Diversificação do gênero Monasa na Amazônia</i>	83
<i>Incongruências taxonômicas</i>	86
AGRADECIMENTOS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
Lista de Tabelas.....	95
Lista de Figuras	96
Material suplementar.....	106

RESUMO

As florestas Neotropicais compreendem uma das regiões biogeográficas mais ricas em termos de biodiversidade. E a origem da diversidade Neotropical e sua distribuição espacial tem sido abordada em uma perspectiva biogeográfica, assumindo que essa elevada diversidade foi resultado de fatores históricos associados à mudança da paisagem nessa região. Várias hipóteses biogeográficas baseadas, principalmente, em eventos vicariantes foram propostas na tentativa de explicar os padrões geográficos nos quais se organiza a diversidade biológica na região Neotropical. Dentre elas destacamos: o soerguimento dos Andes, refúgios florestais do Pleistoceno, rios como barreiras e incursões marinhas do Mioceno. Dentro desse contexto, utilizamos dois gêneros da Família Bucconidae: *Monasa* e *Nonnula* para tentar interpretar esses padrões de diversificação Neotropical. Esta tese teve como objetivos, reconstituir as relações filogeográficas entre os táxons que compõem os gêneros *Nonnula* e *Monasa*, a partir de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais; datar os eventos cladogenéticos para inferir quais processos históricos foram responsáveis pela diversificação e tentar estimar o efeito de cada um destes processos entre os diferentes táxons que os vivenciaram. Foram seqüenciadas 100 amostras distribuídas em 6 espécies do gênero *Nonnulo* e 166 amostras para as 4 espécies reconhecidas para o gênero *Monasa*. Nossos dados indicam incongruência entre o tratamento taxonômico atual e a história evolutiva de *Nonnula*. Nossa análise recuperou 19 linhagens recíprocas monofiléticas dentro de *Nonnula*, revelando a existência de pelo menos 6 espécies biológicas no complexo *N. rubecula*. Além disso, nossa análise recuperou 10 linhagens recíprocas monofiléticas em *N. ruficapilla* que apresentaram parafilética com *N. amaurocephala*. As distribuições dessas linhagens geralmente coincidem com áreas neotropicais conhecidas de endemismo (AE). Já para o gênero *Monasa* foram delimitadas 12 linhagens bem suportadas estatisticamente, e que a taxonomia tradicional não representa a diversidade de linhagens desse grupo. Com exceção de *Monasa atra*, todas as espécies mostraram estruturação filogeográfica. Foram recuperadas duas linhagens em *M. flavirostris*, duas linhagens em *M. nigrifrons* e 7 linhagens em *M. morphoeus*. Essas linhagens estão delimitadas pelos principais rios amazônicos. *M. flavirostris* foi a primeira linhagem a se diversificar, seguido por *M. morphoeus* que é o táxon irmão de *M. atra* e *M. nigrifrons*. A diversidade filogenética desses dois gêneros é subestimada pela taxonomia atual, fornecendo um exemplo de como endemismo enigmático amplamente distribuídos pode ser um bom exemplo para se estudar os padrões filogeográficos na região Neotropical, especialmente na Amazônia.

Palavras Chaves: Filogeografia, Diversificação Neotropical, Diversidade críptica, Gênero *Nonnula*, Gênero *Monasa*, Complexo de espécies

ABSTRACT

Neotropical forests comprise one of the wealthiest biogeographical regions regarding biodiversity. The origin of Neotropical diversity and its spatial distribution has been approached from a biogeographic perspective, assuming that this high diversity was the result of historical factors associated with the landscape change in this region. There were proposed several biogeographic hypotheses based mainly on vicarious events in an attempt to explain the geographical patterns in which biological diversity is organized in the Neotropical region. Among them, we highlight: the soaring of the Andes, Pleistocene's forest refuges, rivers such as barriers and Miocene's marine incursions. Within this context, it was used two genera of the *Bucconidae* Family: *Monasa* and *Nonnula* to try to interpret these Neotropical patterns of diversification. This thesis aimed to reconstruct the phylogeographic relationships between the taxon that compose the *Nonnula* and *Monasa* genus, from nuclear and mitochondrial molecular markers; to date the cladogenetic events to infer which historical processes were responsible for the diversification and to try to estimate the effect of each one of these processes between the different taxon that experienced them. There were sequenced 100 samples distributed in 6 species of the *Nonnulo* genus and 166 samples for the 4 recognized species for the *Monasa* genus. Our data indicate incongruence between the current taxonomic treatment and the evolutionary history of *Nonnula*. Our analysis recovered 19 reciprocal monophyletic lines within *Nonnula*, revealing the existence of at least six biological species in the *N. rubecula* complex. Also, our analysis recovered 10 reciprocal monophyletic lines in *N. ruficapilla* that presented paraphyletic with *N. amaurocephala*. The distributions of these lines generally coincide with known endemism neotropical areas (EA). In the *Monasa* genus, there were delimited 12 lines well supported statistically, and that the traditional taxonomy does not represent the diversity of lineages of this group. All species showed phylogeographic structuring, exceptionally *Monasa atra*. There were determined two strains in *M. flavirostris*, two strains in *M. nigrifrons* and seven strains in *M. morphoeus*. The main Amazonian rivers delimit these lineages. *M. flavirostris* was the first lineage to be diversified, followed by *M. morphoeus* which is the brother taxon of *M. atra* and *M. nigrifrons*. The phylogenetic diversity of these two genera is underestimated by the current taxonomy, providing an example of how widespread enigmatic endemism can be a good example for studying phylogeographic patterns in the Neotropical region, especially in Amazon.

Key Words: Phylogeography, Neotropical Diversification, Cryptic Diversity, Genus *Nonnula*, Genus *Monasa*, Species Complex

INTRODUÇÃO GERAL

As florestas Neotropicais compreendem uma das regiões biogeográficas mais ricas em termos de biodiversidade (Mittermeier *et al.*, 2003), apresentando cerca de 3751 espécies de aves (Stoltz *et al.*, 1996). No Brasil ocorrem 1901 espécies (Piacentini *et al.*, 2015) e mais de 2.900 subespécies (Pinto, 1944; Sick, 1997). Essas subespécies foram descritas com base em diferentes padrões, que vão desde variações geográficas não delimitáveis até fenótipos bem diferenciados e de distribuição alopátrica ou parapátrica (Sick, 1997). Toda essa diversidade, no entanto, não está distribuída de maneira homogênea. É possível observar determinados padrões na distribuição de vários grupos biológicos, os quais podem apresentar uma distribuição congruente em regiões denominadas Áreas de Endemismos (AE). Essas AE se destacam pela presença de táxons proximamente relacionados, que se substituem em margens opostas dos principais rios, sugerindo inter-relações históricas entre elas e são consideradas as menores unidades geográficas para análise de biogeografia histórica (Silva *et al.*, 2005).

Historicamente a questão da origem da diversidade Neotropical e sua distribuição espacial tem sido abordada em uma perspectiva biogeográfica, assumindo que essa elevada diversidade foi resultado de fatores históricos associados à mudança da paisagem nessa região (Antonelli *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2012). Várias hipóteses biogeográficas baseadas, principalmente, em eventos vicariantes foram propostas na tentativa de explicar os padrões geográficos nos quais se organiza a diversidade biológica na região Neotropical. Dentre elas destacamos: o soerguimento dos Andes (Chapman, 1917), refúgios florestais do Pleistoceno (Haffer, 1969; Vanzolini e Willians, 1970), rios como barreiras (Wallace, 1852; Sick, 1967) e incursões marinhas do Mioceno (Rasanen *et al.*, 1995; Webb, 1995).

A Família Bucconidae como um Modelos de estudo

A Família Bucconidae é composta por 35 espécies (na sua maioria monotípicas) distribuídas em 12 gêneros, e exclusivamente Neotropical, tornando um excelente modelo para se testar hipóteses sobre a origem da biota Neotropical. Os táxons que compõem a família Bucconidae ocorrem desde o sul do México ao norte da Argentina, alcançando sua maior diversidade no norte da America do Sul, mais especificamente na Amazônia. Habitam principalmente matas (do sub-bosque a copas) e clareiras (Ridgely, 1981). Várias espécies de Bucconidae com ampla distribuição exibem uma complexa variação geográfica e apresentam discordâncias quanto ao número e distribuição dos táxons válidos (Rasmussen e Collar, 2002).

Nesse sentido, os dois gêneros, *Nonnula* e *Monasa*, propostos para esse estudo são de especial interesse para investigações filogeográficas, principalmente na bacia amazônica, pois preenchem requisitos importantes como a existência de espécies politípicas alopátricas, parapátricas e simpátricas com ampla distribuição na região. Além disso, apresentam espécies e subespécies endêmicas a determinados interflúvios ou áreas de endemismos, permitindo, assim, uma análise comparativa dos efeitos dos eventos históricos sobre essas linhagens filogeneticamente próximas e co-distribuídas.

O gênero *Nonnula* foi descrito por Sclater em 1854 e distribui-se na região Neotropical, estendendo-se desde o Panamá até o nordeste da Argentina (Rasmussen e Collar, 2002). São reconhecidas seis espécies, tratadas mais detalhadamente abaixo.

Nonnula rubecula descrita inicialmente como *Bucco rubecula* por Spix em 1824 tendo como localidade tipo Malhada, oeste da Bahia, próximo ao rio São Francisco, Brasil. Sua taxonomia é ainda incerta e confusa, podendo haver mais de uma espécie envolvida. A

espécie possui 7 subespécies reconhecidas, algumas das quais podem constituir-se Unidades Evolutivas Independentes (Rasmussen e Collar, 2002):

- *N. r. rubecula* descrita por Spix em 1824, ocorre da região nordeste do Brasil entre os estados do Maranhão, Piauí e Bahia à região sul no estado de Santa Catarina, no leste do Paraguai e nordeste da Argentina.
- *N. r. cineracea* descrita por P. L. Sclater em 1881 ocorre no nordeste do Equador e Peru, oeste do Brasil ao sul do rio Solimões e oeste do rio Madeira (área de endemismo Inambari).
- *N. r. duidae* descrita por Chapmam em 1914 ocorre a leste da Venezuela e ao norte do rio Orinoco.
- *N. r. simplex* descrita por Todd em 1937, ocorre no sudeste da Amazônia ao sul do rio Amazonas, leste do rio Madeira e oeste do rio Tapajós (área de endemismo Rondônia).
- *N. r. tapanahoiensis* descrita por Mees em 1968, ocorre ao sul das Guianas, norte do rio Amazonas e leste do rio Negro (área de endemismo Guiana).
- *N. r. interfluvialis* descrita por Parkes em 1970, ocorre ao sul da Venezuela e sul do rio Orinoco.
- *N. r. simulatrix* descrita por Parkes em 1970, ocorre no sudeste da Colômbia e noroeste do Brasil entre os rios Negro e Solimões (áreas de endemismo Imeri e Napo).

Nonnula sclateri descrita por Hellmayr em 1907, é espécie monotípica, pouco conhecida e endêmica do sudoeste da Amazônia tendo como localidade do holótipo Humaitá, Amazonas. É encontrada nas bordas de florestas de terra firme, florestas de várzea e borda de matas, comumente encontrada em formações florestais de bambu e em matas ripárias

(Sick, 1997). Ocorre do sudeste do Peru, oeste da Amazônia até o oeste do rio Madeira (área de endemismo Inambari; Rasmussen e Collar, 2002; Peters, 1948).

Nonnula brunnea descrita por Sclater em 1881, é espécie monotípica, tendo como localidade do holótipo Sarayacu, Peru. Ocupam do sub-bosque ao dossel de florestas de terra firme e de várzea, bem como floresta secundária. Distribui-se do norte do Peru ao leste do Equador e oeste da Colômbia (Rasmussen e Collar, 2002).

Nonnula amaurocephala descrita por Chapman em 1921, é espécie monotípica que se distribui no noroeste da Amazônia ao norte do baixo rio Solimões e oeste do baixo rio Negro, tendo como localidade do holótipo Manacapuru, Amazonas. Ocupa o bosque sombreado de florestas de igapó relativamente atrofiado devido às inundações sazonais de águas pretas. Aparentemente substituída por *N. rubecula* em florestas de terra firme, porém é vista movimentando-se em florestas secundárias (Rasmussen e Collar, 2002).

Nonnula frontalis descrita inicialmente como *Malacoptila frontalis* por Sclater em 1854 tendo como localidade do holótipo, o interior da Colômbia. Com sua taxonomia incerta, é possível que constitua mais de uma única espécie. Portanto, análises mais aprofundadas são necessárias. A subespécie *N. f. pallescens* é aceita por alguns autores como pertencente à espécie *N. ruficapilla*, apesar de geográfica e morfológicamente distantes. Ocupam bordas de florestas úmidas, floresta de galeria e mata secundária nas terras baixas. Preferem florestas ribeirinhas com emaranhados de trepadeiras. Três subespécies são reconhecidas atualmente (Rasmussen e Collar, 2002; Figura 3):

- *N. f. frontalis* descrita por Sclater em 1854, ocorre no extremo norte da Colômbia.

- *N. f. pallescens* descrita por Todd em 1919 ocorre nas planícies da costa caribenha do norte da Colômbia.
- *N. f. stulta* descrita por Wetmore em 1953 ocorre do Panamá até o extremo noroeste da Colômbia.

Nonnula ruficapilla foi descrita inicialmente como *Lipornix ruficapilla* por Tschudi em 1844. A espécie habita sub-bosque e bordas de florestas úmidas, floresta de terra firme, florestas secundárias, floresta de transição e margens de rios. Além disso, está associada à florestas de bambu (Rasmussen e Collar, 2002; Figura 4 e Figura 8). Quatro subespécies são reconhecidas:

- *N. r. ruficapilla* descrita por Tschudi em 1844, ocorre do leste do Peru e oeste do Brasil ao sul do rio Solimões até a margem esquerda do rio Madeira (área de endemismo Inambari).
- *N. r. nattereri* descrita por Hellmayr em 1921, ocorre no sudeste da Amazônia do leste do rio Madeira até o oeste do rio Xingu.
- *N. r. rufipectus* descrita por Chapmam em 1928, ocorre no nordeste do Peru.
- *N. r. inundata* Novaes, 1991 ocorre a leste do rio Xingu e oeste do rio Tocantins.

O gênero *Monasa* foi descrito por Vieillot, (1816) e distribui-se na região Neotropical, estendendo-se desde a Costa Rica até a Mata Atlântica (Rasmussen e Collar, 2002). São reconhecidas quatro espécies biológicas: *Monasa atra*, *M. morphoeus*, *M. nigrifrons* e *M. flavirostris*.

Monasa atra (Boddaert, 1783) descrita inicialmente como *Cuculus ater* é um táxon considerado monotípico, ocorre no sul e leste da Venezuela e Guianas, norte e leste do

Brasil e leste da Colômbia (área de endemismo Guiana). Ocupa principalmente áreas de sub-bosque em florestas de terra firme e área de várzea, ambos em florestas tropicais úmidas (Rasmussen e Collar, 2002).

Monasa morphoeus (Hahn e Küster, 1823) descrita inicialmente como *Bucco morphoeus*. Ocorre desde a Costa Rica ao oeste do maranhão, além de uma subespécie (*M. m. morphoeus*) com distribuição disjunta na Mata Atlântica. As subespécies *M. m. morphoeus*, *M. m. grandior* e *M. m. fidelis* tem sido consideradas três espécies distintas por alguns autores (Rasmussen e Collar, 2002). Sete subespécies são reconhecidas atualmente:

- *M. m. morphoeus* Hahn e Kuster (1823) ocorre no leste do Brasil do sul da Bahia ao Rio de Janeiro.
- *M. m. peruana* Sclater, 1856 ocorre a leste do Equador, sudeste da Colômbia, sul da Venezuela e leste do Peru até o oeste do rio Tapajós e nordeste da Bolívia.
- *M. m. pallescens* Cassin, 1860 ocorre do sudeste do Panamá ao oeste da Colômbia.
- *M. m. grandior* P. L. Sclater e Salvin, 1868 ocorre no leste de Honduras, leste de Nicaragua e oeste do Panamá.
- *M. m. fidelis* Nelson, 1912 ocorre no Caribe, leste do Panamá e noroeste da Colômbia.
- *M. m. sclateri* Ridgway, 1912 ocorre nas regiões norte e central da Colômbia.
- *M. m. rikeri* Ridgway, 1912 ocorre ao sul do rio Amazonas, do leste do rio Tapajós até o oeste do Maranhão.

Monasa nigrifrons (Spix, 1824) descrita inicialmente como *Bucco nigrifrons*. Ocorre no leste do Peru, leste do equador, sudeste da Colômbia e em grande parte do Brasil (ocorrendo desde o oeste da Amazônia até o oeste de São Paulo, Minas Gerais e Piauí. No

Brasil central a espécie possui ocorrência no Pantanal e em áreas vizinhas ao norte. Duas subespécies são reconhecidas (Rasmussen e Collar, 2002).

- *M. n. nigrifrons* (Spix, 1824) ocorre no sudeste da Colômbia, leste do Equador, leste do Peru. No Brasil ocorre do oeste do rio Negro ao leste do Piauí, Mato Grosso do Sul e oeste de São Paulo.
- *M. n. canescens* Todd, 1937 ocorre no leste da Bolívia.

Monasa flavirostris Strickland, (1950) ocorre no oeste da bacia amazônica distribuindo-se no sudeste da Colômbia, leste do Equador, do sul ao leste do Peru, oeste e Norte da Bolívia (Rasmussen e Collar, 2002).

Essa incerteza quanto as relações filogenéticas associadas à ampla distribuição de algumas espécies, a grande diversidade de padrões de distribuição e variação morfológica intraespecífica reconhecida, indica que estudos mais detalhados desses gêneros servirão como um excelente modelo para abordar comparativamente os principais eventos e processos históricos que moldaram a diversificação da biota Neotropical.

OBJETIVO

Objetivo Geral

- Reconstituir as relações filogeográficas entre os táxons que compõem os gêneros *Nonnula* e *Monasa*, a partir de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais; datar os eventos cladogenéticos para inferir quais processos históricos foram responsáveis pela diversificação e tentar estimar o efeito de cada um destes processos entre os diferentes táxons que os vivenciaram.

Objetivos Específicos

- Verificar a estruturação das populações das diferentes espécies de *Nonnula* e *Monasa*;
- Datar os eventos cladogenéticos entre linhagens dos gêneros *Nonnula* e *Monasa* e verificar a possibilidade de terem sido causados por processos históricos comuns;
- Analisar a resposta de cada população das diferentes espécies de *Nonnula* e *Monasa* aos eventos históricos com os quais tiveram contato;
- Verificar o grau de concordância dos padrões filogeográficos e de genética populacional entre as diferentes populações co-distribuídas das diferentes espécies de *Nonnula* e *Monasa*, procurando-se eventos históricos comuns que possa explicá-los.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonelli, A. (2010) Amazonia through time: andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330, 927–931.
- Chapman, F.M. (1917) The distribution of bird-life in Colombia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 36, 347–355.
- Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165, 131-137.
- Piacentini, V. Q., Aleixo, A., Agne, C. E., Maurício, N. G., Pacheco, J. F., Bravo, G. A., Brito, G. R. R., Naka, L. N., Olmos, F., Posso, S., Silveira, L. F., Betini G. S., Carrano, E., Franz, I., Lees, A. C., Luciano M. Lima, L. M., Pioli, D., Schunck, F., Amaral, F. R., Bencke, G. A., Cohn-Haft, M., Figueiredo, L. F. A., Straube, F. C. and Cesari, E. (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 23(2), 91-298.
- Peters, J. L. (1948) *Check-List of Birds of the World*, Vol. 6. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Pinto, O. M. de O. (1944) *Catálogo de Aves do Brasil e lista dos exemplares existentes na coleção do Departamento de Zoologia. Publicação do Departamento de Zoologia. São Paulo, 2ª parte.*
- Rasmussen, P., Collar, N. (2002) Family *Bucconidae*. In: Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. (Eds.), *Handbook of the Birds of the World: Jacamas to woodpeckers*. Lynx Edicions.
- Rasanen, M. E.; Linna, A. M. Santos; J. C. R. e Negri, F. R. (1995) Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, 269, 386–390.

- Ribas, C.C., Aleixo, A., Nogueira, A.C., Miyaki, C.Y. & Cracraft, J. (2012) A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 681-9.
- Sick, H. (1967). Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para a avifauna. *Atas Simpósio Biota Amazônia Zoológica*, 5, 495–520.
- Ridgely, R. S. (1981) *A guide to the birds of Panamá*. Princeton: Princeton univ. Press.
- Sick, H. (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 912.
- Silva, J.M.C., Rylands, A.B., Fonseca, G.A.B., 2005. The fate of the Amazonian Areas of Endemism. *Conserv. Biol.* 19, 684-694.
- Stotz, D. F.; Fitzpatrick, J. W.; Parker, T. A. III; Moscovits, D. (1996) *Neotropical birds: ecology and conservation*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Vanzolini, P. E. e Williams, E. E. (1970) South American *Anolis*, the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arq. Zool*, 19, 1-124.
- Wallace, A.R. (1852). On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 20, 107-110.
- Webb, S.D. (1995). Biological implications of the middle Amazon seaway. *Science*, 269, 361–362.

CAPÍTULO 1



Original article

Molecular systematics of nunlets (*Nonnula*: Birds, Bucconidae): ancient and cryptic diversification across Neotropical lowland forests

Leonardo Moura dos Santos Soares¹, Alexandre Aleixo^{2*}, John Bates³, Marcos Pésio⁴

¹ Curso de Pós-graduação em Zoologia - Universidade Federal do Pará / Museu Paraense Emílio Goeldi, Caixa Postal 399, CEP 66040-170, Belém, PA, Brazil. E-mail: leonardomss65@hotmail.com

² Coordenação de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Caixa Postal 399, CEP 66040-170, Belém, PA, Brazil.

³ Life Sciences, Field Museum of Natural History, 1400 S. Lake Shore Dr., Chicago, IL, USA, 60605.

⁴ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Ecologia e Zoologia de Vertebrados, Av. Augusto Correia, n 1, Guamá – Belém – PA CEP 66075-110

* Corresponding author

ABSTRACT

Aim To reconstruct geographical and temporal patterns of diversification in the puffbird genus *Nonnula*, especially regarding the influence of landscape evolution and climate changes as drivers of diversification.

Location Neotropics, with emphasis in the Amazon basin.

Methods We sequenced 100 individuals from 6 species of *Nonnula*, and 5 genes: two mitochondrial and three nuclear nuclear (4 loci) to estimate a multilocus phylogeny of the genus. Phylogeographic patterns within each sampled species were also evaluated. We used Bayesian, Maximum likelihood and Species tree methods to estimate the phylogeny, uncover time tree, and historical demography parameters. We also performed ancestral area state reconstruction in BiogeoBaers.

Results Our data indicates incongruence between the current taxonomic treatment and evolutionary history of *Nonnula*. Our analysis recovered 19 reciprocally monophyletic lineages Within *Nonnula*, revealing the existence of at least six biological species in the *N. rubecula* complex. In addition, our analysis recovered 10 lineages reciprocally monophyletic within *N. ruficapilla* that showed paraphyletic with *N. amaurocephala*. The distributions of these lineages are generally coincident with known Neotropical areas of endemism (AE).

Main Conclusion The phyletic diversity in *Nonnula* is underestimated by current taxonomy, providing an instance of how ubiquitous cryptic endemism can be in the Neotropics, particularly in Amazonia.

Keywords: Amazonia, Bucconidae, cryptic diversity, historical biogeography, phylogeography, species delimitation

INTRODUCTION

Over the last 10 million years, the Neotropical landscape has been influenced by a combination of tectonic events that have altered drainage patterns, as well as orbital-induced climatic changes (Fernandes *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2013). Paleogeographic studies indicate that Andean uplift during the Neogene catalyzed significant changes in the lowlands, including formation of the modern Amazon River system. These tectonic events also led to the closure of the Panama Isthmus, and the isolation of humid lowland forests east and west of the Andes by montane habitats and the aridification of the Caribbean lowlands in northern South America (Mora *et al.*, 2010). The process of species diversification is strongly linked to tectonism and climate, both in terrestrial and marine realms. The dynamic geologic history of South America should thus be very relevant for understanding the origins of the present biodiversity (Hoorn *et al.*, 2010). Although complex, several hypotheses have been proposed to explain the history of diversification in the Neotropics. Among the numerous proposed causal mechanisms behind the high species diversity in the region, three are predominant. One proposes that tectonically mediated changes in river systems have been primarily responsible for the isolation of forest biotas (Ribas *et al.*, 2012). A second, the Pleistocene refuge hypothesis (Haffer, 1969; Vanzolini & Williams, 1970), postulates that climate change cyclically fragmented and connected forest biotas throughout the region. In the most recent argument, (Smith *et al.*, 2014) suggest that the ecological attributes of the organisms themselves, not the landscape, are in fact the primary drivers of diversification.

Haffer's original formulation supposed speciation in forest refuges during the Pleistocene, whereas rivers as isolating barriers suggests a relatively older biotic history because of the belief that major features of the Amazonian drainage substantially predate Quaternary climatic fluctuations (Hoorn *et al.*, 2010 and Ribas *et al.*, 2012). Further, in

recent years, new aspects of land surface evolution have been evoked to explain biogeographic patterns in the Amazon, such as: 1) changes in drainage patterns and sedimentation within the large wetlands that existed in western Amazon up to the Pliocene (Hoorn *et al.*, 2010 and Campbell *et al.*, 2006); and 2) the role of Andean uplift on drainage patterns of neighboring lowlands (Batalha-Filho *et al.*, 2014). However, several studies indicated that speciation in the Neotropics has been a protracted process dating back to as early as the Neogene and has continued up until the present (Ribas *et al.*, 2012, Smith *et al.*, 2013). It has also been argued that these hypotheses are not mutually exclusive and that landscape, climate and intrinsic aspects of the biology of species have all been factors that have shaped current biodiversity in the Neotropics (Bates *et al.*, 2001; Antonelli, *et al.*, 2010).

The Neotropical region comprises biogeographical subunits rich in avian biodiversity with about 3751 species (Mittermeier *et al.*, 2003). With the advent of modern DNA analyses, subspecies, originally described based on different patterns ranging from minor changes in geographical variation to well differentiated phenotypes with allopatric or parapatric distributions (Sick, 1997), can be assessed at the genetic level.

We present a detailed study on the historical diversification of the genus *Nonnula* (Aves Bucconidae) that comprises six lowland forest understory-inhabiting species distributed from southern Central America to northern Argentina. They are 'sally' foragers that are considered to be poor dispersers and more prone to developing phylogeographic structuring than canopy birds (Rasmussen & Collar, 2002; Burney & Brumfield 2009). Based on subspecies taxonomy, the group exhibits complex geographical variation and there has been disagreement as to the number and distribution of valid taxa. This uncertainty about the phylogenetic relationships associated with the

wide distributions of some species, the great diversity of distribution patterns and the intraspecific morphological variation already recognized, underscore the potential of the genus *Nonnula* to serve as a model to study cryptic diversification in the Neotropical lowlands.

The genus *Nonnula* was described by Sclater (1854) and currently comprises six species and 17 subspecies (Rasmussen & Collar, 2002). *Nonnula* has polytypic species whose taxa can be allopatric, sympatric and parapatric across their distributions. Particularly in Amazonia, some taxa are restricted to certain areas of endemism or interfluves, thus allowing an assessment of the effects of the major features of the local landscape. In this study, we infer the phylogenetic relationships, divergence times and biogeography within *Nonnula* using mitochondrial and nuclear loci based on an extensive taxonomic sampling of the genus. This sampling permits a greater ability to assess the details of relationships within what it is a morphologically conservative, but widespread lineage of Neotropical birds.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

We reconstructed the phylogeny of *Nonnula* based on 100 ingroup samples representing all six species of the genus and 14 of the 17 subspecies recognized this group. (Rasmussen & Collar, 2002; See Appendix S1 in Supporting Information). One recognized *Nonnula rubecula* subspecies, distributed in east Venezuela, northern Orinoco river (*N. r. duidae*) and two recognized *N. frontalis* subspecies, distributed in northern extreme Colombia and in plains of the Caribbean coast (*N. f. frontalis* and *N. f. pallescens*) were not sampled due to the lack of available tissues.

For most samples, we sequenced a total of 3597 pb from fragments of five loci: three autosomal nuclear loci, transforming growth factor beta 2 intron 5 (TGFB2, 606 pb), muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase (MUSK, 590 pb) and intron 1 of the protein gene tied to chromo-helicase DNA (CHD, 349 pb), and two protein-coding mitochondrial DNA (mtDNA) genes: cytochrome b (*Cyt b*, 1017pb) and NADH dehydrogenase subunits 2 (ND2, 1035pb). The genes *Cyt b*, ND2, CHD and MUSK were sequenced for the entire set of individuals, whereas the gene TGFB2 was sequenced for a subset of, at least, one or two individuals per lineage, to perform coalescent analyses (Heled & Drummond, 2010). DNA extraction, amplification, sequencing and alignment procedures are described in supplementary material.

The gametic phase of heterozygous variants was determined using phase 2.1.1 (Stephens & Donnelly, 2003). For each nuclear dataset, separate runs of 400 iterations each were performed, accepting results with probability ≥ 0.7 . All polymorphic sites with probability ≤ 0.7 were coded in both alleles with the appropriate IUPAC ambiguity code.

Phylogenetic analyses

We used Bayesian inference (BI) and Maximum Likelihood (ML) to estimate the phylogeny of *Nonnulla* based alternatively on a concatenated sequence matrix of five partitions (ND2: GTR + G; *Cyt b*: HKY +G; TGFB2: GTR + G; MUSK: HKY + G and CHD: HKY+G). The best fit model for each gene was selected using JModeltest using the Bayesian information criterion (BIC; Posada, 2008). Phylogenies were estimated using MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) and Maximum Likelihood (ML) analyses were carried out as implemented in RAx ML 7.0.3 (Stamatakis, 2006). Lineages were defined as genetically distinct geographical clusters with strong support values (≥ 0.95 Bayesian posterior probability; Huelsenbeck & Rannala, 2004),

consistent with the term ‘phylogroup’ (Rissler & Apodaca, 2007). Two independent Bayesian runs of 10 million generations with four chains of Markov chain Monte Carlo (MCMC) each were performed. The 10% of the generations were discarded as burn-in, after which trees were sampled every 500 generations. Chain convergence (Effective Sample Size – ESS values > 200) was checked using the likelihood plots for each run using Tracer 1.5 (Rambaut and Drummond, 2007). Maximum Likelihood (ML) analyses were carried out as implemented in RAx ML 7.0.3 (Stamatakis, 2006). Mean uncorrected pairwise (p) distances (Nei, 1987) were estimated within and among lineages using MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Species trees and divergence times

We used *BEAST (Heled & Drummond, 2010), part of the beast 1.8 package (Drummond *et al.*, 2012), to reconstruct a time-calibrated multilocus species tree using 1–4 individuals (n = 37) from each currently recognized species or phylogeographical lineage inferred from our complete mtDNA data. Best-fit models of evolution were estimated using jModelTest (ND2: GTR + G; *Cyt b*: HKY +G; TGFB2: GTR + G; MUSK: HKY + G and CHD: HKY+G).

We used a Yule speciation prior and relaxed uncorrelated lognormal clock for each gene tree. To calibrate our species tree, we used the *Cyt b* substitution rate of 1.105×10^{-2} (substitutions/ site/Myr (2.21% change between lineages per Myr; Weir & Schluter, 2008; Weir *et al.*, 2009). Analyses were run for 100 million generations and sampled every 1000 generations. Tracer 1.5 was used to confirm acceptable mixing and likelihood stationarity, appropriate burn-in, and adequate effective sample sizes (> 200). After discarding the first 10 million generations (10%) as burn-in, the parameter values of the

samples from the posterior distribution were summarized on the maximum clade credibility tree using TreeAnnotator 1.8 (Heled & Drummond, 2010).

Ancestral area reconstruction

We used the package BioGeoBEARS (BioGeography with Bayesian Evolutionary Analysis in R Scripts'; Matzke 2013; <http://cran.r-project.org/web/packages/BioGeoBEARS/index.html>) to infer the ancestral areas for the *Nonnula* clade. This package uses a maximum likelihood method similar to LAGRANGE (Ree *et al.*, 2005; Ree and Smith, 2008). In this inference, ancestral areas are optimized onto internal nodes. BioGeoBEARS calculates maximum likelihood estimates of the ancestral states (range inheritance scenarios) at speciation events by modeling transitions between discrete states (biogeographical ranges) along phylogenetic branches as a function of time. It allows the use of the LAGRANGE DEC model (Dispersal, Extinction and Cladogenesis) and a new model called BioGeoBEARS DEC + J model (see Ree *et al.*, 2005 and Matzke, 2013 for further details). Both models include two free parameters (d = dispersal and e = extinction), but DEC + J includes the additional parameter "j" that corresponds to founder event speciation. Likelihood values of these models were compared using Likelihood Ratio Test (LRT). We defined five geographical areas for the BioGeoBEARS analysis after considering the evidence available for historical relationships between relevant geographic areas in South America (Hoorn *et al.*, 2010) and the distribution of *Nonnula* taxa. These regions were as follows: eastern Brazil (**EB**), southern Amazon (**SA**), Guiana Shield (**GS**), western Amazon (**WA**), and Central America (**CA**). The ancestral area probability was computed for each node and subsequently plotted on the majority-rule chronogram using R scripts. We set the maximum number of areas at five.

RESULTS

Phylogenetic analyses

Phylogenetic relationships within *Nonnula* were recovered in the BI and ML analyses based on the mitochondrial and concatenated multilocus sequence dataset (total of three analyses; Fig. 1A, 1B, 1C and 2), including two mtDNA genes (*Cyt b* and ND2) and three autosomal nuclear loci (MUSK, TGFB2 and CHD). Both mitochondrial and concatenated multilocus analysis recovered different topologies showing high statistical support and the reciprocal monophyly for 19 groups. Since these groups represent distinctive evolutionary lineages, we consider them to be valid species (under the evolutionary and phylogenetic species concepts) and therefore refer to them taxonomically as species. The only difference in topologies pertained to the placements of *Nonnula rubecula* and *N. tapanahoniensis*, which were recovered in different positions in the BI mitochondrial, concatenated multilocus and ML mitochondrial in both cases with low statistical support (Fig. 2).

Overall, two main clades were recovered in *Nonnula*, hereafter referred to as the *N. ruficapilla* and *N. rubecula* complexes. Each of the five taxa of the *Nonnula rubecula* complex we sampled were recovered as monophyletic with well support (PP > 0.95 and BP > 70; Fig. 2). We found that all *Nonnula rubecula* taxa were monophyletic, with *N. tapanahoiensis* (from the Guiana area of endemism) grouping either as sister to all remaining taxa (Fig. 2) or to a highly supported clade including just *N. simplex* (from the Rondonia area of endemism), *N. simulatrix* (from Imeri and Napo areas of endemism), and *N. cineracea* (from the Inambari area of endemism; Fig. 1 and 2). Within *Nonnula rubecula*, two reciprocally monophyletic clades were recovered, one grouping specimens from the Atlantic Forest of southeastern Brazil, Argentina, and north-eastern of Paraguay

(labelled *rubecula* 1) and another with specimens from the dry forests of north-eastern Brazil (labelled *rubecula* 2; Fig. 2).

Within the *ruficapilla* complex, we also recovered two highly supported main clades: one grouping *N. frontalis*, *N. brunnea* and *N. sclateri* and another with all taxa historically associated with *N. ruficapilla* as well as *N. amaurocephala* (Fig. 2). Within *N. ruficapilla*, which was recovered as a paraphyletic group with respect to *N. amaurocephala*, we found three distinct clades whose basal relationships were poorly supported statistically. In the first clade, five reciprocally monophyletic subclades were recovered: (R6) from the Rondonia area of endemism and north-east of the Aripuana river; (R7) from south west of the Aripuana river; (R8) from west of the Purus river to the Ucayali and south of the Solimões rivers; (R9) *Nonnula r. rufipectus* from north of the Marañon and Napo rivers; and (R10) *N. amaurocephala* from the Jaú endemism area (Fig. 2). In the second clade, there were two well supported subclades: (R4) *N. r. inundata* from east of the Xingu river; and (R5) from the Tapajos area of endemism. The third clade was recovered as sister to the second clade, albeit with little support, and included the following subclades: (R1) *N. r. ruficapilla* from East of the Andes, west of the Ucayali and south of the Marañon rivers; (R2) from the eastern Inambari area of endemism between the Purus and Madeira rivers; and (R3) *N. r. nattereri* from southern Rondônia area of endemism between the Madeira and the upper Tapajós (west Teles Pires) rivers.

Species Tree estimation

We estimated a Species Tree (ST) for *Nonnula* using four independent loci (2 mtDNA genes and 3 nuDNA; Fig. 3). Statistically well-supported groups recovered in the BI and ML analysis were used as species priors. The ST topology differs from that obtained by BI based on the mtDNA dataset (Fig. 2) in the placement of *N. rubecula* (sub-

clades *rubecula* 1 and 2 from eastern Brazil) as sister to all remaining lineages of the *Nonnula rubecula* complex, thus in accordance with the IB concatenated multilocus tree and ML based on the mtDNA dataset (Fig. S1). However, support for this relationship is small in the ST (PP = 0.70 Fig. 3). As in the concatenated analyses, relationships between *N. simplex*, *N. simulatrix* and *N. cineracea* were recovered with high support ($p = 0.99$; Fig. 3)

As in the concatenated analyses, two main clades were recovered in the *N. ruficapilla* complex, with the first split separating the *N. frontalis* / *brunnea* / *sclateri* clade (which was recovered with high support) from the remaining lineages (Fig. 3). As in the concatenated analyses, the second main clade of the *N. ruficapilla* complex grouped with high support all taxa formerly regarded as subspecies of *N. ruficapilla* plus *N. amaurocephala*, with the former being paraphyletic with respect to the latter, albeit with low statistical support (Fig. 3). Within this group, four well-supported clades were recovered: the first clade included 3 subclades (R1, R2 and R3); the second and third clades included 2 subclades each, respectively (R4 and R5) and (R6 and R7); and the fourth clade included 3 subclades (R8, R9 and R10). As in the concatenated analyses, basal relationships between clades (R4 and R5), (R6 and R7), and (R8, R9 and R10) were poorly supported for the most part. However, the node supporting a closer relationship between clades R6, R7, R8, R9 to *N. amaurocephala* rather than clades R1-R5 was recovered with a high posterior probability (Fig. 3).

Diversification time

The initial splits in *Nonnula* occurred in the Late Miocene, with the separation between the *N. rubecula* and *N. ruficapilla* complexes (Fig. 3). Within the *N. rubecula* complex, the first split occurred between the eastern Brazilian *N. rubecula* and all

remaining species of the complex around 8.5 Ma (5.69-11.3 Ma). The split between the Guianan shield endemic *N. tapanahoniensis* and the rest of the Amazonian lineages occurred ca. 6.68 Ma (3.82-9.81 Ma). The divergence of *N. simplex* occurred at 2.813 Ma (1.59-4.11 Ma) whereas *N. cineracea* and *N. simulatrix* split from one another at 1.995 Ma (1.04-2.90 Ma).

In the *N. ruficapilla* complex the first split occurred between the clade uniting *N. brunnea*, *N. frontalis* and *N. sclateri* and the clade grouping taxa formerly regarded as subspecies of *N. ruficapilla* and *N. amaurocephala* at 6.285 Ma (4.41-8.08 Ma). Within the *ruficapilla* clade the first split occurred about 3.57 Ma (2.61 - 4.68 Ma) separating clades R1, R2 and R3 from the remaining clades. The second divergence occurred between clades R4 and R5 and clades R6, R7, R8, R9 and R10 around 3 Ma (2,02 - 4,075). The third divergence occurred between clades R6 and R7 and clades R8, R9 and R10 around 1,9 Ma (1,331 - 2,743). Finally, the divergences among R10 and R8 and R9 occurred at 1,54 Ma (0,73 - 2,30) and 0.8 Ma (0.5 - 1.2), respectively (Fig. 3).

Ancestral area reconstruction

The model that best fit the phylogenetic reconstruction of *Nonnula* was DIVALIKE+J (lnL=-15.85). The best ancestral area estimate indicates that the likely origin of the genus *Nonnula* was south of the Amazon River in either the western Amazon, the Atlantic Forest, or both (Fig. 4; Table 2). The initial split in *Nonnula* probably separated via vicariance a Brazilian / Guianan shield lineage leading to the *N. rubecula* complex from the ancestor of the *N. ruficapilla*, which was likely distributed in the western Amazonian sedimentary basin (Fig. 4). Our analyses suggest a late Miocene divergence via vicariance between *N. rubecula* from the Atlantic and the Amazonian lineages of the complex. Other putative events involved: Miocene to Pliocene divergence

between the ancestor of *N. tapanahoniensis* (Guiana Shield) and the clade comprising *N. simplex* (Brazilian shield) and *N. cineracea* and *N. simulatrix* (western Amazonia), which probably followed a dispersal event into the Brazilian shield, possibly across the Amazon river (Fig. 1b); the Plio-pleistocene split between *N. simplex* and *N. cineracea* plus *N. simulatrix*, which apparently involved a dispersal event across the Madeira River into the western Amazonian sedimentary basins; and, finally, the likely Pleistocene split between *N. cineracea* and *N. simulatrix* probably via vicariance across the upper Amazon (Solimões) River.

In the *N. ruficapilla* complex, the initial split took place via vicariance in western Amazonia and separated the ancestor of *N. frontalis*, *N. brunnea*, and *N. sclateri* from that originating *N. amaurocephala* and the remaining *N. ruficapilla* lineages during the Mio-Pliocene. Later, these two daughter lineages appeared to have dispersed: 1) across the Andes (resulting in the split of *N. frontalis* during the Plio-Pleistocene); and 2) into the Brazilian shield (leading to the diversification of nine *N. ruficapilla* plus *N. amaurocephala* lineages throughout the Plio-Pleistocene as well; Fig. 4; Table 2). Within the latter clade, two dispersal events into the Brazilian shield and one back to the western sedimentary basins mostly during the Pleistocene appeared to be correlated with diversification across several main Amazonian rivers.

DISCUSSION

Diversity and systematics in the *Nonnula rubecula*, Rusty-breasted Nunlet complex

Our analyses recovered seven reciprocally monophyletic lineages within the *Nonnula rubecula* complex with high statistical support according to all phylogeny estimates. These results suggest strong evolutionary independence among them and hence

that they could be regarded as separate evolutionary species according to lineage based species concepts (Queiroz 2005); with the caveat that only one taxon within the complex was not sampled (*N. r. duidae*), six taxa discussed below could be elevated to full species status.

Nonnula rubecula from northeastern Brazil, corresponded to clade *rubecula* 2; specimens of this clade share the same plumage type of the holotype of *N. rubecula* (obtained at Malhada, Bahia, Brazil, along the Rio São Francisco, ca. 600 km to the south from the Serra das Confusões National Park, where our sequenced samples originated. *Nonnula fulvescens* from southeastern Brazil, eastern Paraguay, and northeastern Argentina, corresponded to clade *rubecula* 1; the taxon name *fulvescens* is available for this clade and was described by Bertoni (1901) from Puerto Bertoni, Paraguay (Peters 1948). Formerly regarded as a single species, *N. rubecula* and *N. fulvescens* are mutually diagnosable by distinct plumage types see also Parkes 1970, Rasmussen & Collar 2002) and are separated by a mtDNA sequence divergence of 1.6% (Table 1). Even though not sequenced, three additional specimens of *N. rubecula* from Sambaíba, Maranhão (07°08'S, 45°21'W; MPEG 41968, 41869 and 41870), along with our sequenced series from Serra das Confusões National Park, Piauí, represent the northernmost records of the *N. rubecula* group in eastern Brazil. Apparently, *N. rubecula* and *N. fulvescens* replace each other somewhere along the 500 km stretch separating Malhada (state of Bahia; the type locality of *N. rubecula*) from Felixlândia (state of Minas Gerais; where our northernmost samples of *N. fulvescens* come from) along the São Francisco River valley; possibly, the southern distributional limit of *N. rubecula* coincides with that of the dry forests in the southern state of Tocantins and northern state of Minas Gerais, close to the upper valleys of rivers Jequitinhonha and Doce, as observed for several other lineages

with similar ranges (Parkes 1970, Cabanne *et al.*, 2007, Carnaval *et al.*, 2009, d'Horta *et al.*, 2011 Batalha-Filho *et al.*, 2012).

The four Amazonian clades recovered in the *N. rubecula* complex also can be considered full evolutionary species, at least (Table 1). *Nonnula tapanahoniensis* (Guiana shield), *N. cineracea* (Inambari area of endemism), and *N. simplex* (Rondônia area of endemism) are also divergent genetically and diagnosable in terms of plumage (Gyldenstolpe, 1945, Rasmussen & Collar 2002). We were not able to include samples from Venezuela near the type locality of *duidae* (Mount Duida) in the analyses (Fig. 2; 3 and Fig. S1). However, the latter taxon is very similar in plumage to specimens of the *N. interfluvialis* / *simulatrix* clade, which occurs immediately south of Mount Duida (Parkes, 1970; pers. obs.). Therefore, we tentatively include *duidae* in the *N. interfluvialis* / *simulatrix* clade, pending further analyses based on a larger series of specimens from representative localities. Within this clade, our analyses recovered the paraphyly of *simulatrix* as currently defined, with respect to *interfluvialis* (Fig. 2 and Fig. S1); in fact, two reciprocally monophyletic clades with high support were recovered: a western clade grouping samples from Peruvian Amazonia around the mouth of the Napo River (closer to the type locality of *simulatrix*, i.e. Tonantins, in westernmost Amazonian Brazil); and an eastern clade with samples from the south bank of the Japurá River in Brazil eastward to the north bank of the upper Negro and west bank of the mid-lower Negro (closer to the type locality of *interfluvialis*, i.e. Caño Atamoni, near São Carlos de Rio Negro in Venezuela). Therefore, potentially each of these two clades could also be regarded as distinct evolutionary species to which the names *simulatrix* and *interfluvialis* would apply, but important gaps in our sampling prevent drawing any firm conclusions; this, coupled with the purported intergradation between *simulatrix* and *interfluvialis* as inferred from plumage characters by Parkes (1970) in the middle Negro River, which is

also consistent with the observed paraphyly of *simulatrix* with *interfluvialis*, highlights the need for caution when interpreting our results. Hence, we suggest that for the moment *duidae*, *simulatrix*, and *interfluvialis* are treated as a single endemic species from northwestern Amazonian under *N. duidae*, the name with priority.

Diversity and systematics in the *Nonnula ruficapilla* complex

In the *N. ruficapilla* complex, 10 well-supported reciprocally monophyletic lineages were recovered by the estimated trees (Fig. 2, 3, and Fig. S1). Current taxonomy already recognizes the Cis-Andean *N. brunnea* (from South-Central Colombia, eastern Ecuador, and northern Peru) and *N. sclateri* (from eastern Peru, northern Bolivia and southwestern Amazonian Brazil to the left bank of the upper Madeira), and the Trans-Andean *N. frontalis* (from central Panamá to northern Colombia), as separate species. Our results support the treatment of *N. brunnea* and *N. sclateri* as a "superspecies" as suggested previously, but contrast strongly with the view that *N. frontalis* represents a population of the polytypic *N. ruficapilla* or a member of the *N. ruficapilla* / *amaurocephala* superspecies (Rasmussen & Collar 2002, Remsen *et al.*, 2016); instead, our results support strongly the evolutionary independence of *N. frontalis* and its closer phylogenetic affinity to *N. brunnea* and *N. sclateri* rather than *N. ruficapilla* and *N. amaurocephala*.

All estimated trees also recovered nine reciprocally monophyletic clades within the former polytypic *N. ruficapilla*, as well as its paraphyly with respect to *N. amaurocephala* (Fig. 2, 3, and Fig. S1). However, only four valid taxon names are available for these lineages with evolutionary species status: 1) *ruficapilla* (type from Chanchamayo, eastern Peru; Peters, 1948), corresponding to lineage R2 and that includes populations from Eastern Peru in the valleys of the Marañon, Huallaga, Ucayali eastward

to the Purus and Madeira rivers in Brazil; 2) *nattereri* (type from Villa Maria, now Cáceres, on the uppermost Paraguay River, Mato Grosso, Brazil), corresponding to lineage R3 and that groups populations from east of the Madeira river to the upper Tapajós (Teles Pires River) in southern Rondonia area of endemism; 3) *inundata* (type from Jacundá on the left bank of the Tocantins River in eastern Pará, Brazil; Novaes 1991), corresponding to lineage R4, which includes a sample from the Xingu area of endemism; and 4) *rufipectus* (type from Puerto Indiana, on the north bank of the Amazon River in northern Peru), corresponding to lineage R9, which groups samples north of the Ucayali and Amazonas rivers in northeastern Peru. The remaining five clades include lineages grouped previously with either *ruficapilla* or *nattereri*, rendering them polyphyletic, as follows: R1 and R8 (*ruficapilla*) and R5, R6, and R7 (*nattereri*). Clearly, a complete overhaul of the taxonomy of taxa previously grouped under the polytypic *N. ruficapilla* is needed and will be better achieved under a multi-character approach and after the inspection of a larger series of specimens. Finally, lineage R10 corresponds to *N. amaurocephala* from northwestern Amazonian Brazil on the north bank of the Amazon River, originally described as an independent species.

Origin and historical diversification of the genus *Nonnula*

Recent studies showed that multilocus phylogenies based on classical concatenation of genes are less accurate than inferences based on coalescent species tree approaches to recover the phylogenetic relationships among taxa (Heled and Drummond, 2010). Moreover, estimates of coalescent species tree are efficient to accommodate inconsistencies between gene trees due to incomplete lineage sorting in recently diversified populations (Heled and Drummond, 2010; Batalha-Filho *et al.*, 2013). Therefore, in this study we implemented the Bayesian coalescent species tree by *BEAST

to depict the systematic relationships within the *N. ruficapilla* and *N. rubecula* complexes. Our species tree was similar to the concatenated mitochondrial and multilocus trees built under BI and ML approaches, revealing essentially the same clades with good node support values. However, some more basal nodes were poorly supported such as that related to the sister group to the clade grouping *N. inundata* – R4 and *R. ruficapilla* R5 as well as the sister lineage to *N. amaurocephala* – R10. Also, the closest relative to *N. tapanahoniensis* could not be estimated with good statistical support by any of the phylogenies obtained.

The two main *Nonnula* lineages, leading to *rubecula* and *N. ruficapilla* complexes, diverged in the Late Miocene (12,411 Ma.), one probably originating in eastern South America (i.e., Brazilian and Guiana shields; *rubecula* complex) and the other in southwestern Amazonia (*ruficapilla* complex). While the event leading to this separation is difficult to establish, it coincided with the major ecological division within *Nonnula*, i.e., between lineages that can occupy tall upland terra-firme forest away from water (*rubecula* complex) versus those that are necessarily tied to riverine and edge habitats (*ruficapilla* complex).

Within the *N. rubecula* complex, the first split occurred about 8.493 Ma. (5.692-11.330) during the Miocene, separating the Atlantic / northeastern Brazilian lineages (*N. rubecula* and *N. fulvescens*) from the Amazonian ones (*N. tapanahoniensis*, *N. simplex*, *N. cineracea*, and *N. duidae*). This pattern is consistent with that reported by Batalha-Filho *et al.* (2013) for some lineages whereby splits between Amazon and Atlantic forest lineages occurred before the Plio-Pleistocene. This diversification may have been influenced by climatic processes that influenced the distribution of rainforests across the continent, with different periods of contact and isolation between the Amazon and Atlantic forests (Batalha-Filho *et al.*, 2010). The second split within the *N. rubecula*

complex occurred at approximately 6.683 Ma. (3.824-9.819), with *N. tapanahoniensis* (from Guiana Shield) separating from the remaining Amazonian taxa. These results appear consistent with those reporting initial splits of Guianan shield lineages with respect to others from throughout Amazonia (Batista *et al.*, 2013, Horta *et al.*, 2013, Rodrigues *et al.*, 2013, Fernandes *et al.*, 2014, Dantas *et al.*, 2016), and support a palaeogeographic model of establishment of the transcontinental Amazon River and its western drainage (starting with the Amazon and Negro rivers) during Plio-Pleistocene times (Ribas *et al.*, 2012). The third split occurred between *N. simplex* and the other two Amazonian clades (*N. cineracea* and *N. duidae*) about 2.813 Ma (1.595-4.118 Ma), whereas the fourth split involved the western Amazonian taxa *N. cineracea* and *N. duidae* around 1.995 Ma (1.048-2.905 Ma). These divergences are probably associated with the formation of other main rivers in western Amazonia, namely the Madeira and Solimões (Ribas *et al.*, 2012; Hoorn *et al.*, 2010 and Latrubesse *et al.*, 2010). Finally, the split between *N. rubecula* and *N. fulvescens* in eastern Brazil dates to around 0.496 Ma. (0.062-0.800), and seems spatially and temporally analogous to that separating *Malacoptila striata* and *M. minor*, and thought to have been caused by fragmentation of the Atlantic Forest during the Pleistocene (Ferreira *et al.*, 2017).

In the *N. ruficapilla* complex the first split occurred at ca. 6.286 Ma. (4.417-8.086) in western Amazonia between the clade with *N. brunnea*, *N. sclateri*, and *N. frontalis* and the lineages grouped under the former polytypic *N. ruficapilla* plus *N. amaurocephala*. These separations may have been influenced by the uplift of the Andes central portion, as inferred by Lutz *et al.* (2013) for the genera *Selenidera* and *Andigena* and by Chaves *et al.* (2011) for the genus *Adelomyia*. *Nonnula frontalis* split from *N. sclateri* e *N. brunnea* around 3.635 Ma (2.190-5.117), apparently after dispersal of a common ancestor across the Andes (Fig. 4). All lineages grouped under the former polytypic *N. ruficapilla* plus *N.*

amaurocephala are bound by main Amazonian rivers, and their diversification appear linked to the establishment of the modern drainage, including the major southeastern tributaries such as the Tapajós, which currently separates members of its three major clades: (R1, R2, and R3); (R4 and R5); (R6, R7, R8, R9, and R10). The earliest splits in the former polytypic *N. ruficapilla* plus *N. amaurocephala* date back to around 3.570 Ma. (2.03-3.87), and could be related to the initial establishment of the modern Tapajós drainage, with other similar spatio-temporal splits reported for other avian lineages (Aleixo 2004, Ribas *et al.*, 2012, Thom and Aleixo 2015, Ferreira *et al.*, 2017). Several estimated dispersal events across other major southern Amazonian tributaries during the mid-Late Pleistocene appear to be associated with splits between lineages such as R4 and R5 (Xingu), R6 and R7 (Juruena), R8 and R9 (Ucayali), and *N. amaurocephala* and R8+R9 (upper Amazon - Solimões; Fig. 4; Table 2). This complex and so far unique pattern, which resulted in some distantly related lineages such as R2 and R8 as well as R3 and R5 living in close parapatry, respectively in western and central Amazonia, without any noticeable physical barrier separating them, differs from those reported for several lineages of upland *terra-firme* birds in southern Amazonia (Fernandes *et al.*, 2014, Thom and Aleixo 2015, Ferreira *et al.*, 2017). It is possible that the inferred small dispersal abilities of *Nonnula* are countered to some extent by the selection of riverine habitats by lineages of the *N. ruficapilla* complex, leading to the observed multiple events of diversification across rivers involving lineages with disparate phylogenetic affinities.

Acknowledgments

We thank the curator and curatorial assistants of the Field Museum of Natural History, Chicago, USA (FMNH); Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil (INPA); Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves, Universidade de São Paulo, Brazil (LGEMA); Louisiana State University Museum of Natural Science

(LSUMZ), Baton Rouge, USA; Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Brazil (MPEG); and Smithsonian National Museum of Natural History (SNMNH), Washington, USA, for allowing us to borrow tissues samples and study specimens under their care. Field and laboratory work related to this paper were generously funded by CNPq (grants #310593/2009-3; “INCT em Biodiversidade e Uso da Terra da Amazônia” 574008/2008-0; # 563236/2010-8; and # 471342/ 2011-4), FAPESPA (ICAAF 023/2011 and 010/2012), and through the collaborative grant "Dimensions US-Biota-São Paulo" (#1241066) supported by the US National Science Foundation (NSF), National Aeronautics and Space Administration (NASA), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to AA and JMB. Support to LMSS graduate research was provided by a Capes PhD fellowship and CNPQ (#207461/2014-7). AA is supported by a CNPq research productivity fellowship (#310880/2012-2).

REFERENCES

- Antonelli, A. (2010) Amazonia through time: andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* **330**, 927–931.
- Batalha-Filho, H., Cabanne, G.S., Miyaki, C.Y. (2012) Phylogeography of na Atlantic forest passerine revels demografiphic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **65**, 892-902
- Batalha-Filho, H., Pessoa, R.O., Fabre, P.H., Fjeldsa, 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**, 422-32.
- Bates, J.M. (2001) Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic pattern of diversification. In: Viera, I., D’Incao, M.A., Silva, J.M.C., Oren, D. (Eds.), *Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia*. Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, Brasil, pp. 119–138.
- Borges, S. H. (2007) Análise biogeográfica da avifauna da região oeste do baixo Rio Negro, amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Zoologia* **24** (4): 919–940.
- Burney, C.W., Brumfield, R.T. (2009) Ecology Predicts Levels of Genetic Differentiation in Neotropical Birds. *The American naturalist*, **174** (3): 358 – 368.

Cabanne, G.S., Santos, F.R., Miyaki, C.Y. (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recente demographic expansion in Southern Atlantic forest. *Biol. J. Linn. Soc.* **1**, 73-84.

Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T., Moritz, C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* **323**, 785-789.

Campbell, K.E., Frailey, C.D. & Romero-Pittman, L. (2006) The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **239**, 166-219.

Chapman, F.M. (1917) The distribution of bird-life in Colombia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **36**, 347–355.

d’Horta, F., Cabanne, G.S., Meyer, D., Miyaki, C.Y. (2011) The genetic effects of late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic forest passerine. *Mol. Ecol.* **20**, 1932-1935.

Dantas, S.D., Weckstein, J.D., Bates J., Krabbe, N.K., Cadena, C.D., Robbins, M.B., Valderrama, E., Aleixo, A. Molecular systematics of the new world screech-owls (Megascops: Aves, Strigidae): biogeographic and taxonomic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **94**, 626-634

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 1969–1973.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* **1**, 47–50.

Fernandes, A.M., Wink, M., Aleixo, A. (2012) Molecular phylogeography of the Chestnut-tailed Antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. *J. Biogeogr.* **39**, 1524–1535.

Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915–925.

Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**, 131–137.

Heled, J. & Drummond, A. (2010) Bayesian inference of species trees from multi-locus data. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 570–580.

Hoorn, C., Wesselingh, F.P., ter Steege, H. (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* **330**, 927–931.

[http://ib.berkeley.edu/courses/ib200/labs/Lab21/IB200_BioGeoBEARS_demo_updated.](http://ib.berkeley.edu/courses/ib200/labs/Lab21/IB200_BioGeoBEARS_demo_updated)

[R](#)

Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (2004) Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic Biology*, **53**, 904–913.

Latrubesse, E.M., Cozzuol, M., Silva-Caminha, S.A.F., Rigsby, C.A., Absy, M.L. & Jaramillo, C. (2010) The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth-Science Reviews*, **99**, 99-124.

Lerner, H.R.L., Meyers, M., James, H.F., Hofreiter, M. & Fleischer, R.C. (2011) Multilocus resolution of phylogeny and timescale in the extant adaptive radiation of Hawaiian honeycreepers. *Current Biology*, **21**, 1838–1844.

Librado P, Rozas J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451–1452.

Lutz, H.L., Weckstein, J.D., Patane, J.S., Bates, J.M. & Aleixo, A. (2013) Biogeography and spatio-temporal diversification of *Selenidera* and *Andigena* Toucans (Aves: Ramphastidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69**, 873-83.

Matzke, N.J. (2014) Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in Island Clades. *Systematic Biology*, **63**, 951-70.

Mittermeier, R. A, Mittermeier, C. G. Mittermeier, Brooks, T. M. Brooks, Pilgrim, J. D. Pilgrim, Konstant, W R. Ko Stant, Fonseca, G. A. B. Fonseca & Kormos, C. Kormos

(2003) Wilderness and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Science* **100**: 10309-10313.

Mora, A., Baby, P., Roddaz, M., Parra, M., Brusset, S., Hermoza, W., Espurt, N. (2010) Tectonic history of the Andes and Sub-Andean zones: implications for the development of the Amazon Drainage basin. In: C. Hoorn, F.P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: Landscape and Species Evolution, a Look into the Past*. Wiley Online Library, p. 38 – 60.

Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Piacentini, V.Q., Aleixo, A., Agne, C.E., Maurício, N.G., Pacheco, J.F., Bravo, G.A., Brito, G.R.R., Naka, L.N., Olmos, F., Posso, S., Silveira, L.F., Betini G.S., Carrano, E., Franz, I., Lees, A.C., Lima, L. M., Pioli, D., Schunck, F., Amaral, F.R., Bencke, G.A., Cohn-Haft, M., Figueiredo, L.F.A., Straube, F.C. and Cesari, E. (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Revista Brasileira de Ornitologia*, **23**(2), 91-298.

Posada, D. (2008) JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1253–1256.

Queiroz, K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 6600- 6607

Rambaut, A., Drummond, A.J. (2007) Tracer v1.4. <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2092–2100.

Rasmussen, P. & Collar, N. (2002) Family Bucconidae (Puffbirds). *Handbook of the birds of the world* (ed. by J. Del Hoyo, A. Elliot and J. Sargatal). Lynx Edicions.

Ree, R.H., Moore, B.R., Webb, C.O. & Donoghue, M.J. (2005) A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution*, **59**, 2299-2311.

Ree, R.H. & Smith, S.A. (2008) Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology*, **57**, 4-14.

Ribas, C.C., Aleixo, A., Nogueira, A.C., Miyaki, C.Y. & Cracraft, J. (2012) A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B*, **279**, 681-9.

Rissler, L.J. & Apodaca, J.J. (2007) Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, **56**, 924–942.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.

Sick, H. (1997). *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 912.

Smith, B.T. & Klicka, J. (2010) The profound influence of the Late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of New World birds. *Ecography*, **33**, 333–342.

Smith, B. T., Ribas, C. C., Whitney, B. M., Hernandez-Banos, B. E., Klicka J. (2013) Identifying biases at different spatial and temporal scales of diversification: a case study in the Neotropical parrotlet genus *Forpus*. *Molecular Ecology*, **23**, 483-494.

Smith, B.T., McCormack, J.E., Cuervo, A.M., Hickerson, M.J., Aleixo, A., Cadena, C.D., Pérez-Emán, J., Burney, C.W., Xie, X., Harvey, M.G., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Derryberry, E.P., Prejean, J., Fields, S., Brumfield, R.T. (2014) The drivers of tropical speciation. *Nature*, **515**, 406–409.

Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**, 2688–2690.

Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 1162–1169.

Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731–2739.

Vanzolini, P.E., Williams, E.E., 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). *Arquiv. Zool. (S. Paulo)*, 19, 1–298.

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

Weir, J.T. (2009) Implications of genetic differentiation in Neotropical montane forest birds. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 96, 410–433.

Weir, J.T. & Price, M. (2011) Andean uplift promotes lowland speciation through vicariance and dispersal in *Dendrocincla* woodcreepers. *Molecular Ecology*, 20, 4550–63.

List of Tables

Table 1. Average pairwise uncorrected p-distances (mtDNA) between and within major clades of the genus *Nonnula* recovered by Bayesian and Maximum Likelihood phylogenies.

Table 2 Models and parameters from each of the analyses conducted using BioGeoBEARS. Dispersal (d), Extinction (e), Founder (j), values of Log-Likelihood (ln L) and Akaike Information Criterion (AIC) scores from each model implemented.

List of figures

Figure 1. Map showing the distribution of tissue sampling localities A) *N. ruficapilla* complex, B) *N. rubecula* complex, C) *N. frontalis*, *N. brunnea* and *N. sclateri*

Figure 2. Phylogenetic relationships among major clades of the genus *Nonnula* derived from Bayesian Inferences and Maximum likelihood based on sequences of the mtDNA. Bayesian Inferences based on sequences all loci combined (*Cyt b*, ND2, TGFB2, CHD and Musk). Nodal support values correspond to posterior probabilities in the mtDNA and concatenated dataset analyses.

Figure 3. Multi-locus coalescent species tree (mtDNA, CHD, TGFB2 and Musk; branches and 95% confidence intervals in Blue). Black circles represent values of posterior probability $pp \geq 95\%$ for the species tree.

Figure 4. Ancestral area reconstruction from BioGeoBEARS, derived from the Species tree analyses. The best-fit model was DIVALIKE+J. Most likely biogeographic areas are shown in the circles, and the colors in the squares indicate the current species distribution.

Table 1.

Clade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 <i>N. rubecula_2</i>																		
2 <i>N. rubecula_1</i>	1.6																	
3 <i>N. tapanahoniensis</i>	13.2	13																
4 <i>N. simplex</i>	10.9	10.5	12.6															
5 <i>N. interfluvialis</i>	11.3	11.2	13.2	4.2														
6 <i>N. cineracea</i>	11.1	10.9	13	4.2	3.2													
7 <i>N. brunnea</i>	16.3	16.4	16.8	16.3	16.9	15.5												
8 <i>N. sclateri</i>	16.8	16.9	18.7	17.1	17.2	15.7	6.5											
9 <i>N. ruficapilla - R7</i>	15.5	15.9	15.1	14.9	15.9	15.3	7.9	8.9										
10 <i>N. amaurocephala - R10</i>	15.3	15.7	15.7	15.6	16.7	16.3	7.1	8.8	2.1									
11 <i>N. frontalis</i>	17.5	17.9	18.3	17.2	17.5	16.8	8.5	7.1	9.2	9.3								
12 <i>N. ruficapilla - R2</i>	14.9	15.3	16.1	16	16.7	16.1	6.1	9.5	5.1	4.5	9.4							
13 <i>N. rufipectus - R1</i>	15.1	15.7	16.1	15.1	15.9	15.5	7.7	9.5	5.6	5	9.9	3.2						
14 <i>N. rufipectus - R9</i>	15.1	15.5	15.5	15.3	16.5	15.5	7.8	8.8	3.1	3.2	9.5	5.5	6.5					
15 <i>N. ruficapilla - R8</i>	15.7	16.1	15.9	16	17.5	16.4	8.2	9.7	3.4	3.4	9.5	4.8	6	3				
16 <i>N. nattereri - R3</i>	14.8	15.2	16	15.6	16	15.5	6.6	9.5	4.8	4.7	9.3	2	3.6	5.4	5.4			
17 <i>N. nattereri - R6</i>	15.7	16.1	15.3	15.5	16.1	16.1	8.4	9.4	0.7	2.5	9.4	5.6	6.1	3.8	4.1	5.3		
18 <i>N. nattereri - R5</i>	15.1	15.7	16.8	14.8	16.5	16	8.5	9.8	4.3	4.7	9	5	6	5.4	5.1	5.4	5	
19 <i>N. inundata - R4</i>	15.6	16.3	16.8	15.3	17.1	16.3	8.5	10.3	4.8	4.9	9.8	6	6.2	5.6	5.6	6.1	5.5	1.7

Table 2.

Model	d	e	j	LnL	AIC
DEC	20.08	3.2	0	-31.11	49.6
DEC+J	30.07	1.00	0.006	-22.87	39.9
DIVALIKE	20.09	2.59	0	-28.29	47.14
DIVALIKE+J	30.07	1.69	0.003	-21.79	39.31
BAYAREALIKE	20.29	7.47	0	-37.55	67.26
BAYAREALIKE+J	30.03	8.48	0.155	-24.55	41.63

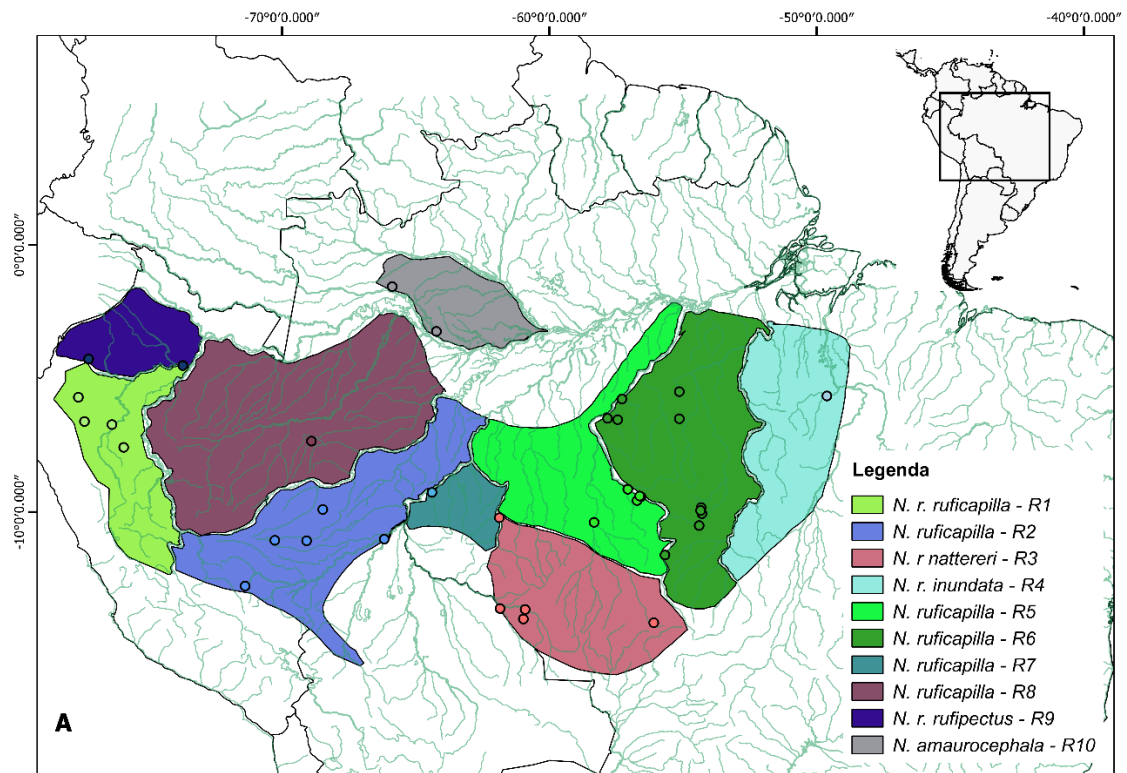


Figure 1A

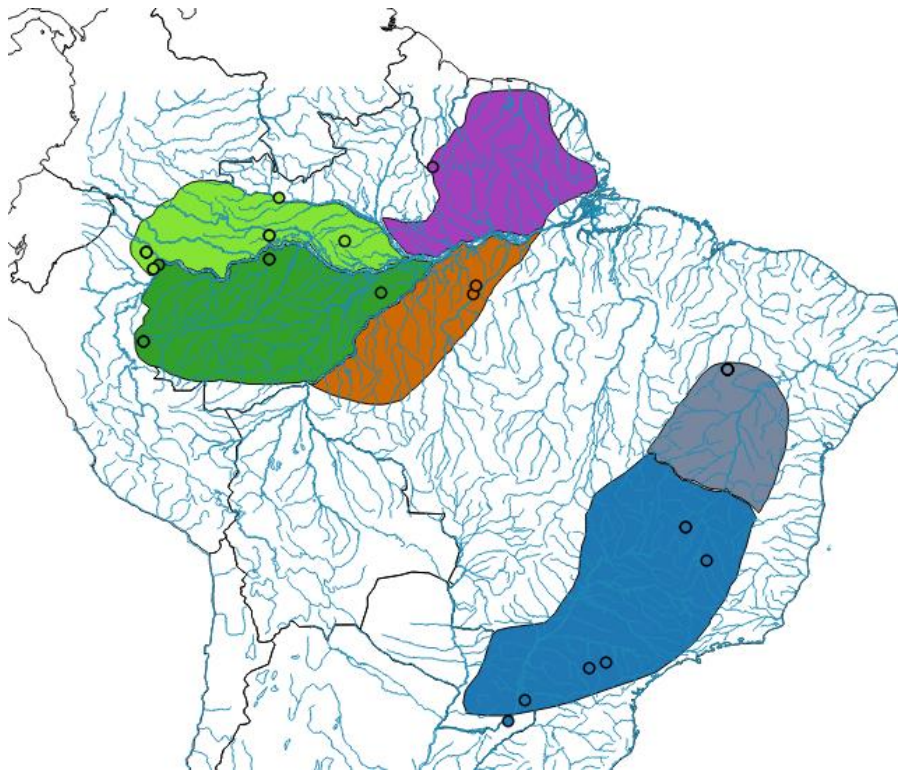


Figure 1B

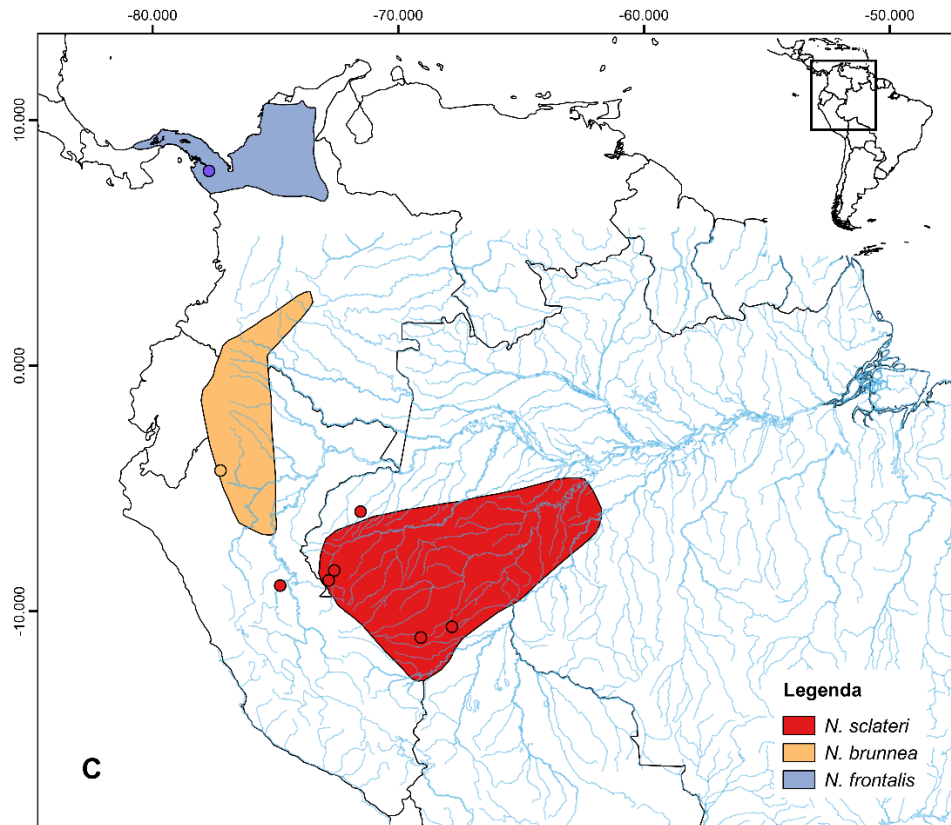


Figure 1C

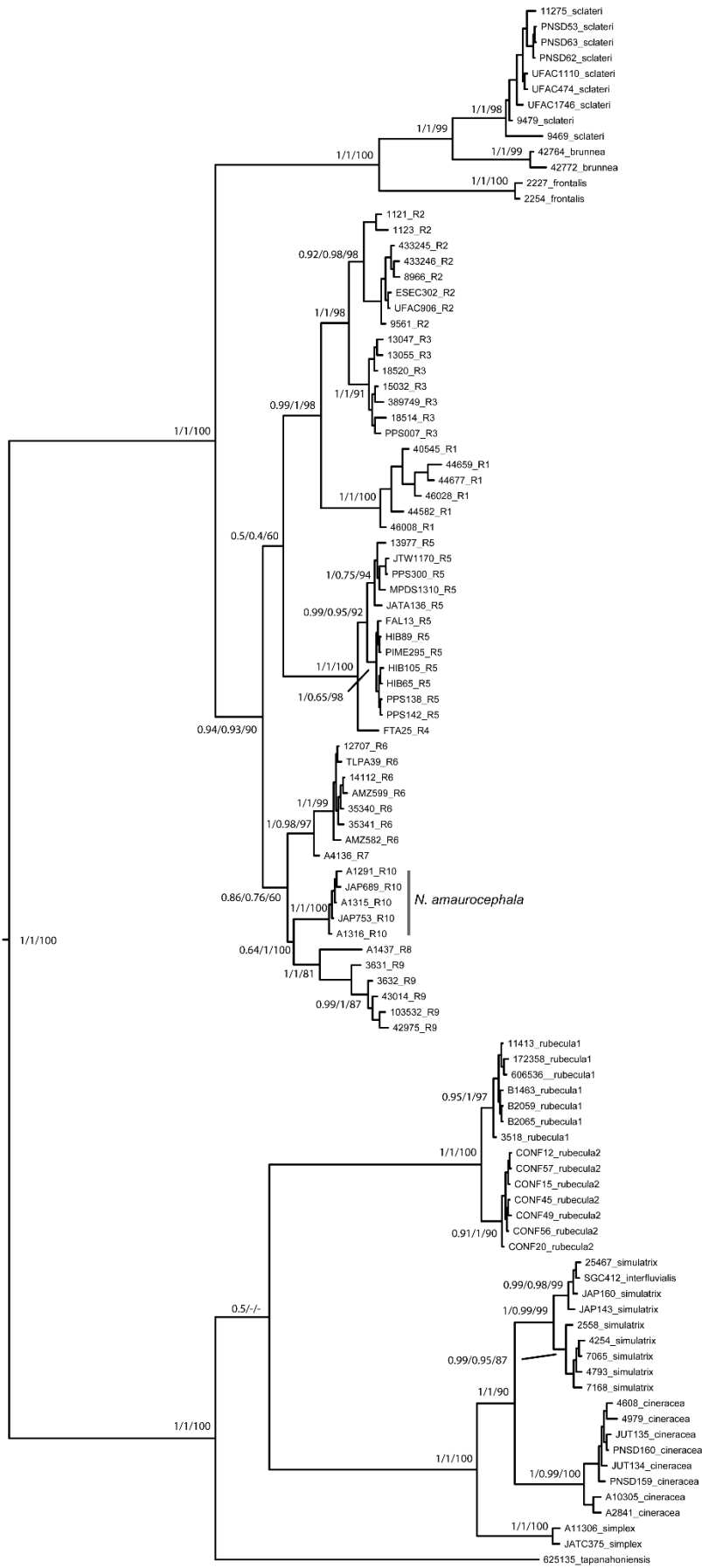


Figure 2

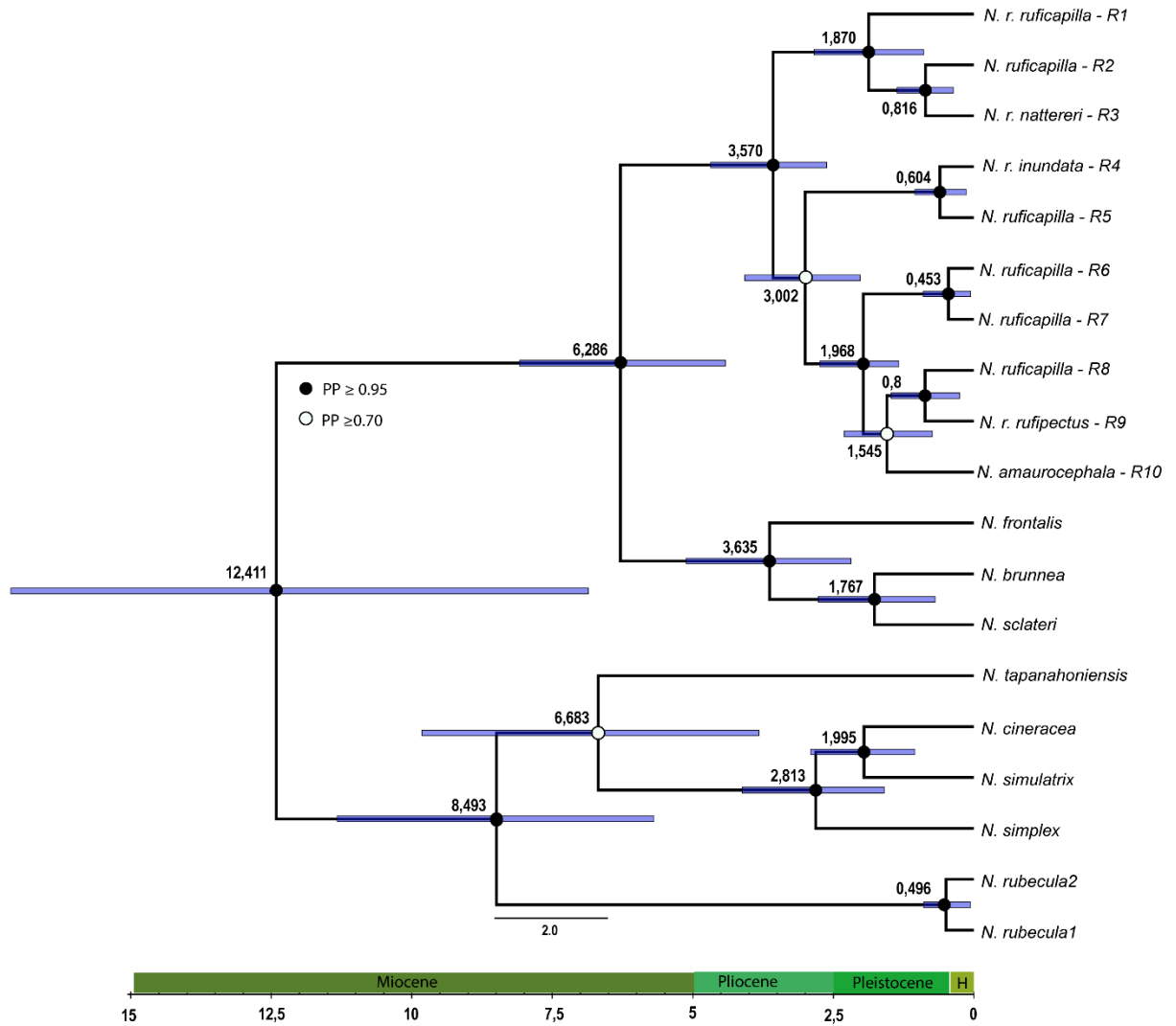


Figure 3

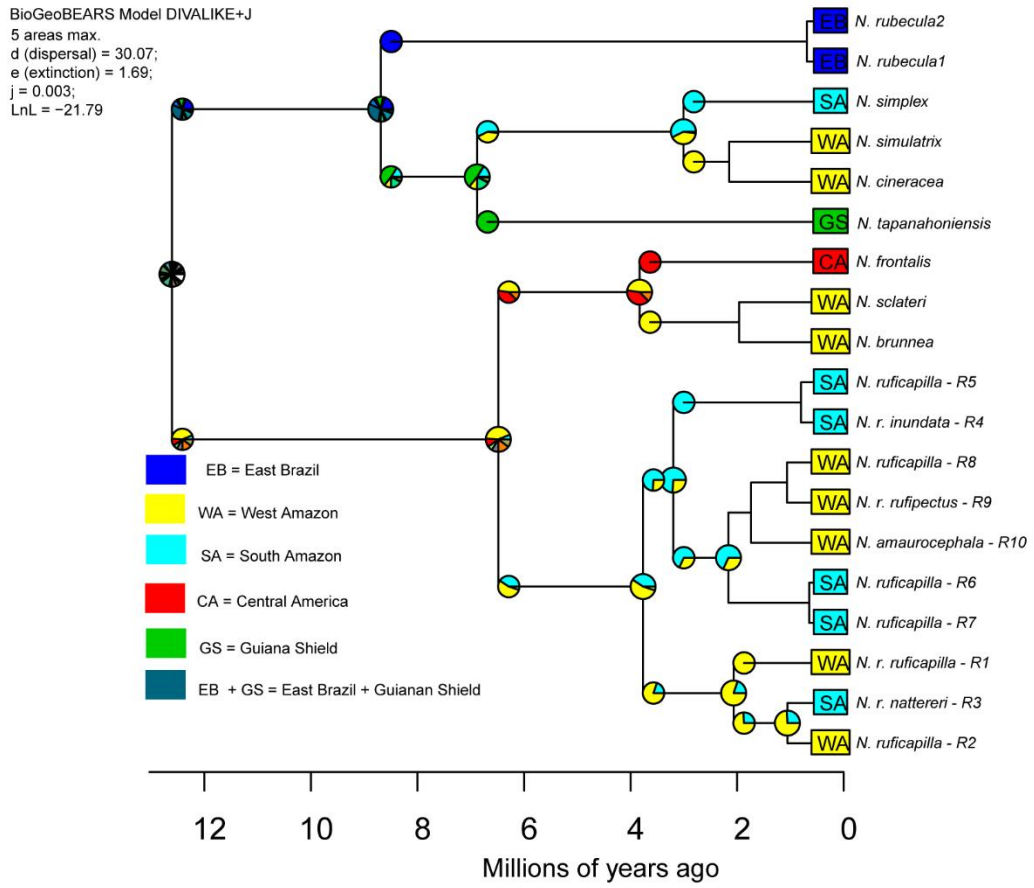


Figure 4

Supporting Information

DNA extraction, amplification and sequencing

Our analyses included tissue samples from 100 individuals of 19 *Nonnula* taxa (Tabela 1) belonging to all species recognized by (Rasmussen & Collar, 2002; see results). We were unable to find available tissues for *N. r. duidae*, *N. r. interfluvialis*, *N. f. pallescens* and *N. f. frontalis*. DNA was extracted using the DNeasy tissue extraction kit (Qiagen, Valencia, California) or a phenol–chloroform protocol (Sambrook and Russel, 2001). We obtained sequences of five different genes including two mitochondrial genes (Cytochrome-b [Cytb, 1035 bps] and NADH dehydrogenase subunit 2 [ND2, 1040 bps], one nuclear intron (transforming growth factor beta 2 [TGFB2, 606 bps]) and two Zlinked introns (chromohelicase-DNA binding protein intron 18 [CHD, 349 bps] and muscle skeleton receptor tyrosine kinase intron 4 [MUSK, 590 bps]). Primers used to amplify and sequence each gene are listed in Table 1. MtDNA and NuDNA fragments were PCR-amplified using standard thermal cycling conditions: denaturation at 94 C, annealing between 46 and 56 C, and extension at 72 C, for 30 or 35 cycles. The PCR products were run on a 1% agarose gel to verify whether amplification was successful and of sufficient quantity for sequencing. PCR products were cleaned using either Exonuclease and Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSap) enzymatic reactions (United States Biochemical), PEG 8000 20% NaCl 2.5 M, or GELase (Epicentre Technologies, Madison, WI). All PCR were cycle-sequenced using a Big- Dye 3.1 Terminator kit (BigDye, Applied Biosystems, Foster City, CA) with the same primers used for amplification. Cycle sequencing reactions were cleaned with ethanol EDTA precipitation, and resuspended in Hi–Di formamide. Sequences were then visualized

through an ABI 3730 and ABI 3300 automated sequencer and aligned and reconciled using Bioedit and Geneious

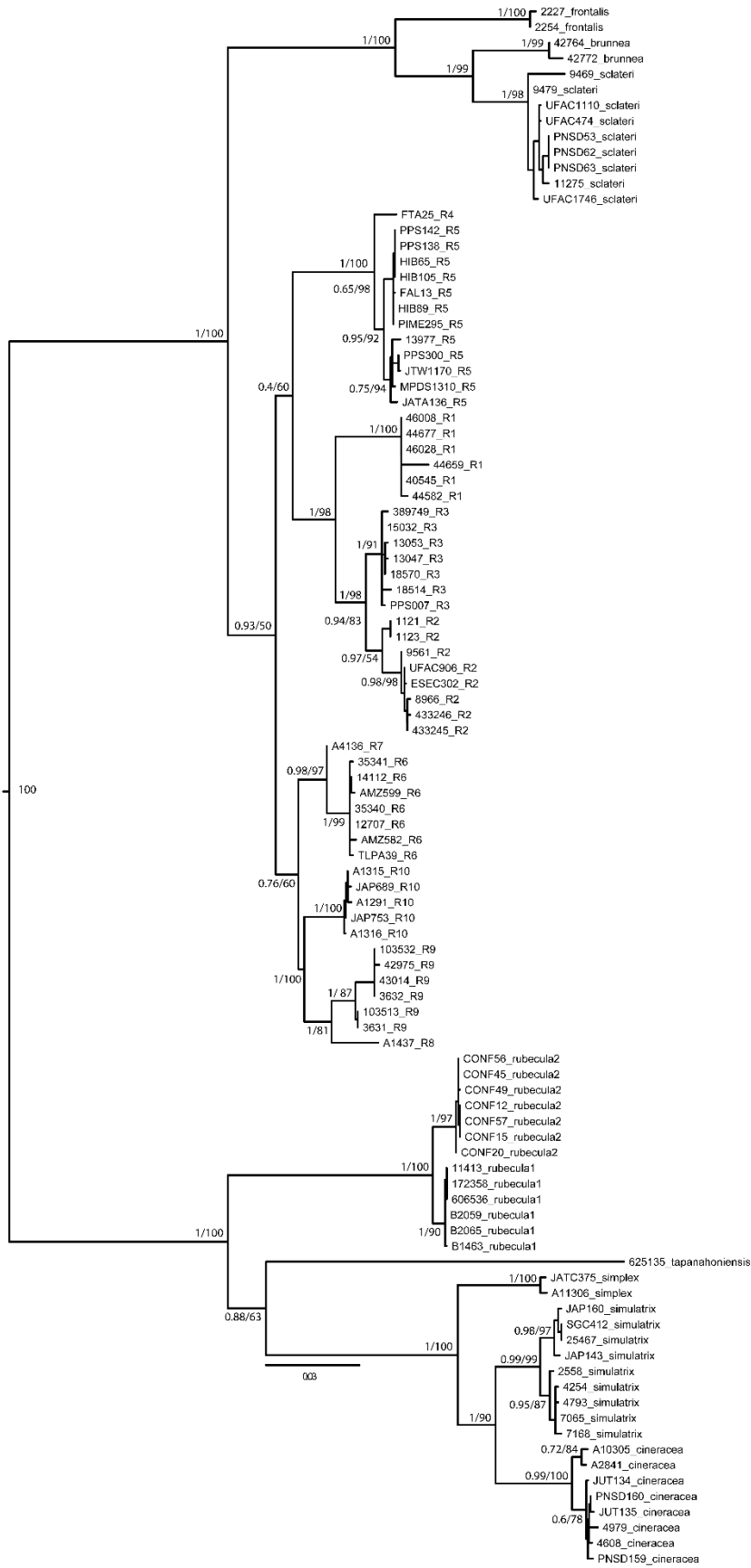


Figure S1. Phylogenetic relationships among major clades of the genus *Nonnula* derived from Bayesian Inferences concatenated dataset and Maximum likelihood (mtDNA) based on sequences of the mtDNA. Bayesian Inferences based on sequences all loci combined (Cyt b, ND2, TGFB2, CHD and Musk). Nodal support values correspond to posterior probabilities in the mtDNA and concatenated dataset analyses. Note the positioning *Nonnula tapanhaoniensis*.

Appendix S1

N. Campo	Gênero	Espécie	Subespécie	Localidade	LONG	LAT
PNSD159	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>cineracea</i>	Alto Rio Moa, margem esquerda, Mâncio Lima (PNSD 7°30'S, 73°43'W)	-73,7165	-7,5
PNSD160	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>cineracea</i>	Alto Rio Moa, margem esquerda, Mâncio Lima (PNSD 7°30'S, 73°43'W)	-73,7165	-7,5
INPA A 10305	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>cineracea</i>	BR 319, km 300, Grade PPBio, Módulo 6, parcela N500	-61,566	-4,993
INPA A 2841	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>cineracea</i>	BR 319, Km 300, M6 PPBIO		
JUT 134	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>cineracea</i>	Jutaí, RESEX do Rio Jutaí, Comunidade São João do Acurau (03°17'44"S;67°19'27"W)	-67,32311	-3,28046
JUT135	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>cineracea</i>	Jutaí, RESEX do Rio Jutaí, Comunidade São João do Acurau (03°17'44"S;67°19'27"W)	-67,32311	-3,28046
LSUMZ 4608	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>cineracea</i>	S Rio Amazonas, ca 10 km SSW mouth Rio Napo on E. bank Quebrada Vainilla	-72,91757	-3,58675
LSUMZ 4979	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	S Rio Amazonas, ca 10km SSW mouth Rio Napo on E bank Quebrada Vainilla	-72,91757	-3,58675
LSUMZ 7065	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	Quebrada Oran, ca. 5km N Rio Amazonas, 85km NE Iquitos	-73,22787	-3,78881
LSUMZ 4254	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	Lower Rio Napo region, E. bank Rio Yanayacu, ca. 90km N Iquitos	-73,59372	-2,8967
LSUMZ 4793	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	Lower Rio Napo region, E. bank Rio Yanayacu, ca. 90km N Iquitos	-73,59372	-2,8967
LSUMZ 25467	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	PARNA do Jaú, região da "Capina do Pataua"	-63,46151	-2,36984
LSUMZ 2558	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	1 km N Rio Napo, 157 km by river NNE Iquitos	-73,59372	-2,8967
LSUMZ 7168	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	Quebrada Oran,ca. 5km N Rio Amazonas, 85km NE Iquitos	-73,22787	-3,78881
JAP 143	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	Japurá, Rio Mapari (02°02'59,6"S;67°15'47,1"W)	-67,2631	-2,04972
JAP 160	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simulatrix</i>	Japurá, Rio Mapari (02°02'59,6"S;67°15'47,1"W)	-67,2631	-2,04972
SGC 412	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>interfluvialis</i>	São Gabriel da Cachoeira, PPBIO (00°09'S;66°48'W)	-66,8	-0,15
Conf 012	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Mun. Cristino Castro, PN Serra das Confusões, Baixão Japecanga (8°57'09.1"S 43°50'37.8"W)	-43,8436	-8,9525
Conf 015	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Mun. Cristino Castro, PN Serra das Confusões, Baixão Japecanga (8°57'09.1"S 43°50'37.8"W)	-43,8436	-8,9525

Conf 020	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Mun. Cristino Castro, PN Serra das Confusões, Baixão Japecanga (8°57'09.1"S 43°50'37.8"W)	-43,8436	-8,9525
Conf 045	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Mun. Cristino Castro, PN Serra das Confusões, Baixão Japecanga (8°57'09.1"S 43°50'37.8"W)	-43,8436	-8,9525
Conf 049	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Mun. Cristino Castro, PN Serra das Confusões, Baixão Japecanga (8°57'09.1"S 43°50'37.8"W)	-43,8436	-8,9525
Conf 056	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Mun. Cristino Castro, PN Serra das Confusões, Baixão Japecanga (8°57'09.1"S 43°50'37.8"W)	-43,8436	-8,9525
Conf 057	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Mun. Cristino Castro, PN Serra das Confusões, Baixão Japecanga (8°57'09.1"S 43°50'37.8"W)	-43,8436	-8,9525
3518	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Região do Pinhalão (50°3'W; 23°58'S)	-50,05	-23,9667
11413	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Ortigueira	-50,9167	-24,2333
B1463	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	MG; Felixlândia; Fazenda Santa Cruz (Mata)	-44,8811	-18,7464
B2059	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	MG; Brasilândia de Minas; Fazenda Brejão (Mata)	-46,0064	-17,0119
B2065	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	MG; Brasilândia de Minas; Fazenda Brejão	-46,0064	-17,0119
USNM 609536	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Argentina, Misiones	-55,08894	-26,9484
DOT 12060/ 172358	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>rubecula</i>	Argentina, Misiones, Parque Provincial Urugua-I, ca.1 km W park headquarters, Ruta Provincial 19	-54,19807	-25,848
JAT (C) 375	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simplex</i>	Itaituba, margem esquerda Rio Tapajós, Jatobá (05°04'23,07"S;56°51'21,24"W)	-56,8559	-5,07325
INPA A 11306	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>simplex</i>	Margem esquerda do Rio Tapajós; 85 km sudoeste de Itaituba, D; (4°41'36.72"S, 56°38'18.56"W)	-58,09552	-2,40396
USNM 625135	<i>Nonnula</i>	<i>rubecula</i>	<i>tapanahoiensis</i>	Guyana, Sipu River	-58,93885	1,425599
PNSD 053	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Parque Nacional Serra do Divisor, Tabocal (08°44'42.8"S, 72°50'04.9"W)	-72,8344	-8,745
PNSD 062	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Parque Nacional Serra do Divisor, Tabocal (08°44'42.8"S, 72°50'04.9"W)	-72,8344	-8,745

PNSD 063	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Parque Nacional Serra do Divisor, Tabocal (08°44'42.8"S, 72°50'04.9"W)	-72,8344	-8,745
UFAC 1110	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Porto Walter, Igarapé Cruzeiro do Vale, Colônia Dois Portos (08°20'35,7"S72°36'19,7"W)	-72,6053	-8,343
UFAC 474	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Tarauacá, Floresta Estadual do Mogno, Br 364 km 6 Rio Tauari (05°56'38,4"S,71°32'07,9"W)	-71,5353	-5,9438
UFAC 1746	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Capixaba, Br 317 km 164, Ramal da Gameleira km 04 (10°38'12,6"S;67°48'55,8"W)	-67,8153	-10,6367
LSUMZ 9479	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Nicolás Suarez; 12 km by road S of Cobija, 8 km W on road to Mucden	-69,08287	-11,0729
LSUMZ 9469	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	Nicolás Suarez; 12 km by road S of Cobija, 8 km W on road to Mucden	-69,08287	-11,0729
LSUMZ 11275	<i>Nonnula</i>	<i>Sclateri</i>	<i>sclateri</i>	SE slope Cerro Tahuayo, ca km ENE Pucallpa	-74,80627	-8,95941
LSUMZ 42772	<i>Nonnula</i>	<i>Brunnea</i>	<i>brunnea</i>	Ca 54 km NNW mouth of Rio Morona, on west bank, 4°16' 51" S, 77°14' 16" W	-77,23678	-4,27244
LSUMZ 42764	<i>Nonnula</i>	<i>Brunnea</i>	<i>brunnea</i>	Ca 54 km NNW mouth Rio Morona on west bank, 4°16' 51" S, 77°14' 16" W	-77,23678	-4,27244
LSUMZ 2254	<i>Nonnula</i>	<i>Frontalis</i>		Cana on E slope Cerro Pirré	-77,70267	7,927669
LSUMZ 2227	<i>Nonnula</i>	<i>Frontalis</i>		Cana on E slope Cerro Pirré	-77,70267	7,927669
LSUMZ 44677	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R1</i>	Ca 33 km NE Florida, 5° 41' 14"S, 77° 38' 09" W	-77,62155	-5,70013
LSUMZ 40545	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R1</i>	86 km SE Juanjui on E bank of upper Rio Pauya, 7°35'40"S, 75°54'58"W	-75,9252	-7,57671
LSUMZ 44582	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R1</i>	Ca 26 km SSE Tarapoto, 6° 43' 50"S, 76° 22' 38" W	-76,36509	-6,72382
LSUMZ 44659	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R1</i>	Ca 33 km NE Florida, 5° 41' 14"S, 77° 38' 09" W	-77,62155	-5,70013
LSUMZ 46028	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R1</i>	Quebrada Upaguiha, CA 26 km SSE Tarapoto, 6°44"S, 77°23"W	-77,39366	-6,60943
LSUMZ 46008	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R1</i>	CA 26 km SSE Tarapoto, 6°44"S, 77°23"W	-77,39366	-6,60943
ESEC 302	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	ESEC Rio Acre, ca. 78 km W Assis Brasil 11°03'24,5"S,70°16'16,6"W	-70,2711	-11,0567
UFAC 906	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	Rio Branco, Transacrea (AC-090) km 70, Ramal Jarinal km 11 09°54'02,1"S,68°28'32,1"W	-68,4756	-9,90056

LSUMZ 9561	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	Nicolás Suarez; 12 km by road S of Cobija, 8 km W on road to Mucden	-69,08287	-11,0729
FMNH 433245	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	Moskitania, 13.4 km NNW Atalaya, 1 bank Alto Madre de Dios	-71,3833	-12,7667
FMNH 433246	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	Moskitania, 13.4 km NNW Atalaya, 1 bank Alto Madre de Dios	-71,3833	-12,7667
LSUMZ 8966	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	Nicolás Suarez; 12 km by road S of Cobija, 8 km W on road to Mucden	-69,08287	-11,0729
LSUMZ 1123	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	Rio Beni, ca 20 km by river N. Puerto Linares	-66,17791	-11,0111
LSUMZ 1121	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla - R2</i>	Rio Beni, ca 20 km by river N. Puerto Linares	-66,17791	-11,0111
PPS007	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R3</i>	Nova Mutum S-14, 14048; W-56,09386	-56,09386	-14,1405
LSUMZ 18514	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R3</i>	Velasco; Parque Nacional Noel Keonpff Mercado 60 km ESE of Florida	-60,97176	-13,9992
LSUMZ 13053	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R3</i>	Velasco; W Bank Rio Paucerna, 4 km upstream from Rio Itenez	-60,90641	-13,6436
LSUMZ 13047	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R3</i>	Velasco; W Bank Rio Paucerna, 4 km upstream from Rio Itenez	-60,90641	-13,6436
LSUMZ 18570	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R3</i>	Velasco; Parque Nacional Noel Keonpff Mercado 60 km ESE of Florida	-60,97176	-13,9992
LSUMZ 15032	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R3</i>	Velasco; 13 km SW Piso Firme	-61,84492	-13,6088
LSUMZ 15025	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R3</i>	Velasco; 13 km SW Piso Firme	-61,84492	-13,6088
FTA 025	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>inundata - R4</i>	Carajás, FLONA Tapirapé-Aquiri	-49,61735	-5,65184
FAL 013	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	Altamira, Floresta Nacional de Altamira 05°29'28,7"S;55°08'17,9"W	-55,1381	-5,49111
PIME 295	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	Novo Progresso, Comunidade Nova Fronteira 06°30'0,16"S;55°12'58,7"W	-55,1381	-6,50444
PPS138	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	63 km leste de Guarantã do Norte (S-9,94184;W-54,34259)	-54,34259	-9,94184
PPS142	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	63 km leste de Guarantã do Norte (S-9,94184;W-54,34259)	-54,34259	-9,94184
JAT (A) 136	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	Pará, Jacareacanga, margem direita rio Crepori	-57,2847	-5,76681
MPDS 1310	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	Jacareacanga, FLONA Crepori, Rio das Tropas, Cotovelo 6°31'823"S; 57°26'40,4"W	-57,4444	-6,53944
13977	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	Linha C, Margem Direita do Rio Teles Pires, Jacareacanga	-57,82286	-6,49177
PPS300	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	Sinop, Fazenda Missioneira (S-11,60644;W-55,67501)	-55,67501	-11,6064
JTW1170	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri - R5</i>	Peixoto de Azevedo, Fazenda Pium (S-10,50329;W-54,39640)	-54,3964	-10,5033

HIB 65	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R5	Guarantã do Norte, Fazenda Filhos do Sol 09°57'06,9"S;54°19'25,4"W	-54,32159	-9,82853
HIB 89	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R5	70 km à leste de Matupá 10°03'24,5"S;54°17'29,7"W	-54,29299	-10,0562
HIB 105	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R5	70 km à leste de Matupá 10°03'24,5"S;54°17'29,7"W	-54,29299	-10,0562
AMZ 582	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R6	Nova Bandeirantes, margem direita Rio Juruena, Fazenda Geripá 10°22'57"S;58°19'36"W	-58,3267	-10,3825
AMZ 599	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R6	Nova Bandeirantes, margem direita Rio Juruena, Fazenda Geripá 10°22'57"S;58°19'36"W	-58,3267	-10,3825
TLP(A) 039	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R6	Paranaíta, Rio Teles Pires 09°25'310"S;56°33'753"W	-56,5708	-9,42528
12707	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R6	margem oposta à Fazenda Teles Pires, Margem esquerda do rio Teles Pires, Paranaíta	-56,71866	-9,56858
14112	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R6	Linha I, Margem Esquerda do Rio Teles Pires, Paranaíta	-56,62255	-9,39847
LSUMZ 35341	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R6	W. bank of Rio Teles Pires, 6 km upriver from the mouth of Rio Sao Benedito, 9°08' 44"S, 57°03' 40" W	-57,06631	-9,14445
LSUMZ 35340	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>natereri</i> - R6	W. bank of Rio Teles Pires, 6 km upriver from the mouth of Rio Sao Benedito, 9°08' 44"S, 57°03' 40" W	-57,06631	-9,14445
INPA A 4136	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>nattereri</i> - R7	Porto Velho; margem direita do Rio Jaci; Três Praias	-64,39246	-9,26294
INPA A 1437	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>ruficapilla</i> - R8	AM: Igarapé Santa Cruz, margem dir. baixo R. Moaco; ca. 220 km W Pauini	-68,90138	-7,34386
LSUMZ 103532	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>rufipectus</i> - R9	S bank Maranon River along Samiria River, Est. Biol. Pithecia. 3°	-73,7122	-4,51467
LSUMZ 3632	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>rufipectus</i> - R9	S bank Rio Maranon, along Rio Samiria, Est. Biol. Pithecia, Base Tacsha Cocha	-73,7122	-4,51467
LSUMZ 3631	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>rufipectus</i> - R9	S bank Rio Maranon, along Rio Samiria, Est. Biol. Pithecia, Base Tacsha Cocha	-73,7122	-4,51467
LSUMZ 43014	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>rufipectus</i> - R9	Ca 54 km NNW mouth Rio Morona on west bank, 4°16' 51" S, 77°14' 16" W	-77,23756	-4,27021
LSUMZ 42975	<i>Nonnula</i>	<i>ruficapilla</i>	<i>rufipectus</i> - R9	Ca 54 km NNW mouth Rio Morona on east bank, 4°16' 51" S, 77°14' 16" W	-77,23756	-4,27021

JAP 689	<i>Nonnula</i>	<i>amaurocephala</i>	<i>amaurocephala</i> - <i>R10</i>	Maraã, Lago Cumapi 01°33'34,5"S;65°52'48,2"W	-65,881	-1,5594
JAP 753	<i>Nonnula</i>	<i>amaurocephala</i>	<i>amaurocephala</i> - <i>R10</i>	Maraã, Lago Cumapi 01°33'34,5"S;65°52'48,2"W	-65,881	-1,5594
INPA A 1291	<i>Nonnula</i>	<i>amaurocephala</i>	<i>amaurocephala</i> - <i>R10</i>	RDS Amanã; Igarapé Ubim, "Volta Grande"; ca. 100km N Tefé	-64,2264	-3,2372
INPA A 1315	<i>Nonnula</i>	<i>amaurocephala</i>	<i>amaurocephala</i> - <i>R10</i>	RDS Amanã; "trilha do Bacaba"; ca. 90km N Tefé	-64,2264	-3,2372
INPA A 1316	<i>Nonnula</i>	<i>amaurocephala</i>	<i>amaurocephala</i> - <i>R10</i>	RDS Amanã; "trilha do Bacaba"; ca. 90km N Tefé	-64,2264	-3,2372

CAPÍTULO 2

**Filogenia e biogeografia histórica de *Monasa* (Aves Bucconidae)
na região Neotropical**

Leonardo Moura dos Santos Soares¹, Alexandre Aleixo²*, John Bates³, Marcos Pésio⁴

¹ Curso de Pós-graduação em Zoologia - Universidade Federal do Pará / Museu Paraense Emílio Goeldi, Caixa Postal 399, CEP 66040-170, Belém, PA, Brasil. E-mail: leonardomss65@hotmail.com

² Coordenação de Zoologia, Museu Paraense Emílio Goeldi, Caixa Postal 399, CEP 66040-170, Belém, PA, Brazil.

³ Life Sciences, Field Museum of Natural History, 1400 S. Lake Shore Dr., Chicago, IL, USA, 60605.

⁴ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Ecologia e Zoologia de Vertebrados, Av. Augusto Correia, n 1, Guamá – Belém – PA CEP 66075-110

* Corresponding author

RESUMO

A origem da grande diversidade de espécies da região Neotropical combinado com os vários padrões de distribuição geográfica tem despertado o interesse de vários naturalistas para tentar explicar tal complexidade. E essa diversificação Neotropical foi fortemente ligada à evolução da paisagem, através do soerguimento dos Andes e os processos climáticos. Nesse estudo utilizamos dados moleculares a fim de revisar a taxonomia do gênero *Monasa* e tentar compreender como um grupo amplamente distribuído pode ter sido afetado pelos eventos geológicos e climáticos. Foram delimitadas 12 linhagens bem suportadas estatisticamente, e que a taxonomia tradicional não representa a diversidade de linhagens desse grupo. Com exceção de *Monasa atra*, todas as espécies mostraram estruturação filogeográfica. Foram recuperadas duas linhagens em *M. flavirostris*, duas linhagens em *M. nigrifrons* e 7 linhagens em *M. morphoeus*. Essas linhagens estão separadas pelos principais rios amazônicos. *M. flavirostris* foi a primeira linhagem a se diversificar, seguido por *M. morphoeus* que é o táxon irmão de *M. atra* e *M. nigrifrons*.

INTRODUÇÃO

A origem da grande diversidade de espécies da região Neotropical combinado com os vários padrões de distribuição geográfica tem despertado o interesse de vários naturalistas para explicar tal complexidade (Wallace, 1852; Haffer, 1969; Bates, 1998, 2001). E mostraram que os principais rios da Amazônia, geralmente, formam barreiras geográficas para várias espécies de vertebrados co-distribuídos entre áreas adjacentes, às vezes essas espécies, até mesmo, compartilham distribuições geográficas semelhantes (Bates, 2004; Wier *et al.*, 2015). Em outras palavras, a história evolutiva da região Neotropical permitiu a formação áreas de endemismos (Cracraft, 1985; Silva *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, novos padrões de evolução da região Neotropical vieram à tona para tentar explicar a origem dessa biodiversidade, tais como mudanças nos padrões de drenagem e sedimentação em grandes zonas húmidas que existiam na Amazônia Ocidental durante o Mioceno (Hoorn *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2006), e a importância da elevação dos Andes sobre padrões de drenagem nas terras baixas (Antonelli e Sanmartín, 2011; Hoorn *et al.*, 2010; Hoorn *et al.*, 2013). A soerguimento dos Andes também pode ter desempenhado um papel importante nas mudanças climáticas em toda a região, já que os Andes forma uma barreira que mantém a umidade do Oceano Atlântico. Portanto, esses eventos que ocorreram durante o plio-pleistoceno parecem ter sido importantes na evolução da biota Neotropical (Antonelli *et al.*, 2010).

A diversificação das aves neotropicais foi fortemente ligada à evolução da paisagem dessa região (Ribas *et al.*, 2012). A especiação em diferentes táxons amplamente distribuída e que ocupam uma gama de habitats, pode fornecer informações relevantes como a contribuição relativa das diferentes barreiras na geração de diversidade de espécies (Smith *et al.*, 2014).

A alta diversidade de espécies em regiões tropicais e os poucos estudos taxonômicos, mesmo para os grupos taxonômicos bem estudados, como aves, pode ser atribuído tanto à falta de dados que permitam definir claramente unidades taxonômicas ou inventários de biodiversidade inadequados (Tobias *et al.*, 2008). Mesmo para grupos presumivelmente bem descritos, os estudos moleculares indicam que muitos clados taxonômicos reconhecidos não são monofiléticos, necessitando, portanto, estudos taxonômicos mais detalhados (Bravo *et al.*, 2012; d'Horta *et al.*, 2013). Além disso, estudos filogeográficos muitas vezes revelam alta divergências genéticas intraespecíficas através da paisagem compatível com os níveis de diferenciação observadas entre as espécies reconhecidas (Smith *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2012).

A família Bucconidae é composta por 35 espécies (na sua maioria monotípicas) distribuídas em 12 gêneros, e exclusivamente Neotropical, o que a torna um excelente modelo para se testar hipóteses sobre a origem da biota desta região. Os táxons que compõem a família Bucconidae ocorrem desde o sul do México ao norte da Argentina, alcançando sua maior diversidade no norte da América do Sul, mais especificamente na Amazônia. Espécies desta família habitam principalmente matas (de sub-bosque a copas) e clareiras (Ridgely, 1981). Várias espécies de Bucconidae com ampla distribuição exibem uma complexa variação geográfica e apresentam discordâncias quanto ao número e distribuição dos táxons válidos (Rasmussen e Collar, 2002). O gênero *Monasa* foi descrito por Vieillot em 1816 e distribuiu-se na região Neotropical, estendendo-se desde a Costa Rica até a Mata Atlântica (Rasmussen e Collar, 2002). E são reconhecidas quatro espécies biológicas: *Monasa atra* Boddaert (1783), *M. morphoeus* Hahn e Küster, (1823), *M. nigrifrons* Spix (1824) e *M. flavirostris* Strickland (1950).

Essa incerteza sobre as relações filogenéticas associadas à ampla distribuição de algumas espécies, a grande diversidade de padrões de distribuição e a significativa

variação morfológica intraespecífica já reconhecida, indicam que estudos mais detalhados do gênero *Monasa* servirá como um excelente modelo para abordar comparativamente os principais eventos e processos históricos que moldaram a diversificação da biota Neotropical (Rasmussen e Collar, 2002). Neste estudo, inferimos as relações filogenéticas, tempos de divergência e biogeografia dentro *Monasa* usando genes mitocondriais e nucleares, permitindo uma maior capacidade de avaliar com detalhes as relações filogenéticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Nós reconstruímos a filogenia do gênero *Monasa* baseado em 166 amostras representando as quatro espécies do gênero e 6 das 10 subespécies reconhecidas para o gênero (Ver Apêndice S1 em Material suplementar).

Quatro subespécies reconhecidas em *Monasa morphoeus*, distribuídos em leste Honduras e leste Nicarágua até o oeste do Panamá (*M. m. Grandior*), Caribe, Leste Panamá e noroeste da Colômbia (do leste ao Sul Córdoba, *M. m. fidelis*), do sudeste do Panamá ao Oeste Colômbia (Sul do alto rio San Juan, *M. m. pallescens*), região norte e central Colômbia (Sul do Vale Magdalena até o Norte Tolima, *M. m. sclateri*) e Mata Atlântica (do sul da Bahia ao Rio de Janeiro, *M. m. morphoeus*) não foram amostradas devido à falta de tecidos disponíveis.

O DNA genômico total foi extraído utilizando procedimentos descritos em (Sambrook *et al.*, 1989). Para a maioria das amostras, foram sequenciados fragmentos de cinco genes: dois genes mitocondriais (mtDNA) genes codificadores de proteínas citocromo b (*Cit b*) e NADH desidrogenase subunidade 2 (ND2) e três loci autossômicos nucleares: fator transformador de crescimento beta 2 intron 5 (TGFB2), gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase intron 11 (G3PDH) e receptor muscular de tirosina kinase (MUSK). Para cada marcador molecular, sequências “*forward*” e “*reverse*” foram sequenciadas e estas sequências de DNA gerados serão disponibilizadas no GenBank (Apêndice S1, Informações de Apoio, os números pendentes).

Análises filogenéticas

A fim de evidenciar quaisquer problemas na edição das sequências foi feita uma comparação com sequências dos genes que estiverem disponíveis no GenBank, assim como a verificação de códons de parada através do programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). No programa *Data Analysis and Molecular Biology and Evolution - DAMBE* (Xia e Xie, 2001) foi feita uma plotagem gráfica das transições e transversões em função das distâncias genéticas para cada marcador em separado, objetivando avaliar o sinal filogenético das sequências e possível saturação de bases. Posições polimórficas dos genes nucleares correspondentes aos indivíduos heterozigotos foram codificadas de acordo com os códigos de ambiguidade da IUPAC e posteriormente foram determinadas a fase gamética usando metodologia descrita em (Stephens *et al.*, 2001; Stephens e Donnelly, 2003), onde foram inferidos os haplótipos com o programa PHASE (Stephens e Scheet, 2005) usando SeqPHASE para formatar os arquivos de entrada.

O cálculo da distância genética não corrigidas (*p*) foi realizado no programa MEGA 5. A reconstrução filogenética foi feita pelo método de máxima verossimilhança (MV) realizada no aplicativo RAxML 7.0.4 (Stamatakis, 2006), através de uma busca heurística com 1.000 réplicas de *bootstrap* e por uma análise bayesiana (BI) executada no aplicativo MrBayes 3.1.2, onde foram feitas três corridas com quatro cadeias cada (uma fria e três quentes; (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Nas análises de MV e IB foram utilizados modelos evolutivos designados pelo programa JMODELTEST 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012), em uma análise prévia dos dados, para cada um dos genes.

Como uma alternativa à abordagem tradicional concatenada, uma IB baseada em coalescência foi feita para estimar a “árvore de espécies” (Edwards *et al.*, 2007). Foi utilizado o programa BEAST v. 1.6.0 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees; Drummond e Rambaut, 2007), permitindo a inferência de árvores de espécies a partir de árvores de genes discordantes, utilizando-se a teoria da coalescência (Heled e Drummond, 2010).

Árvores de espécies e tempos de divergência

Nós usamos o programa *BEAST (Heled e Drummond, 2010), implementado em BEAST 1.8 (Drummond *et al.*, 2012) para reconstruir uma árvore de espécies utilizamos entre 1 e 4 indivíduos ($n = 37$) a partir de cada uma das espécies atualmente reconhecidas ou linhagem filogeográfica inferida a partir de nossos dados completos de mtDNA e multilocus. Os modelos evolutivos foram estimados usando o programa JMODELTEST 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012; ND2: GTR + G; *Cit b*: HKY + G; TGFB2: GTR + G; MUSK: HKY + G e G3PDH: HKY + G).

Nós utilizamos o relógio *relaxed uncorrelated lognormal* e *Yule speciation prior* para cada árvore de gene. Para calibrar a árvore de espécies, foi utilizada a taxa de substituição *Cit b* de 1.105×10^{-2} (substituições / site / Minha (2,21% de variação entre linhagens por Milhões de anos; Weir e Schluter, 2008; Weir *et al.*, 2009). Para esta análise, foram realizadas corridas de 100 milhões de gerações e amostradas cada 1000 gerações. O Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond, 2007) foi utilizado para confirmar o *likelihood* e estacionariedade da corrida. Além disso, foi utilizado para verificar o *burn-in* apropriado e se tamanho efetivo da amostragem foi suficiente (> 200). Depois de descartar os primeiros 10 milhões de gerações (10%) como *burn-in*, os valores dos parâmetros das amostras da distribuição posteriori foram sumarizados usando *Tree Annotator* 1.8 (Heled e Drummond, 2010)

Delimitação de espécies baseado em coalescência

Nós utilizamos o programa BP&P versão 2.0 que incorpora uma abordagem de modelagem Bayesiana para gerar probabilidades de especiação de táxons intimamente relacionados utilizando um banco de dados *multilocus* (Yang e Rannala, 2014). O programa leva em conta incerteza das árvores de genes e ordenação das linhagens. Além disso, assume que não há fluxo gênico entre as espécies após a divergência. O BP&P inclui os parâmetros de tempo de divergência (τ) e tamanho populacional ($\theta = 4N_e \mu$), onde N_e é o tamanho efetivo da população e μ a taxa de mutação por sítio por geração. As análises formam rodadas para 500,000 gerações, amostrando-se uma árvore a cada 500 gerações e especificando um *burn-in* das primeiras 25, 000 gerações. Foram realizadas análises preliminares usando algoritmos 0 e 1, com diferentes parâmetros de ajuste e utilizando a topologia da árvore de espécies com base no conjunto de dados *multilocus* para especificar a árvore inicial.

Foi implementado a abordagem de Leaché e Fujita (2010) onde as análises foram realizadas utilizando três combinações de *priors* que representam diferentes tamanhos populacionais e diferentes idades para o enraizamento da árvore de espécies. O BP&P gera uma distribuição posterior de modelos de especiação que contém números de espécies diferentes. As probabilidades de especiação são estimadas a partir da soma das probabilidades de todos os modelos de especiação em cada nó na árvore guia. As linhagens irmãs que obtiverem probabilidades posterior $> 0,95$ em todos os três cenários anteriores de diferentes tamanhos populacionais e idades foram classificadas como espécies.

Genética de populações e demografia histórica

Para testar a evidência de variação nos tamanhos populacionais durante passado, usamos os testes D de Tajima (Tajima, 1989), Fs de Fu (Fu, 1997) e R2 (Ramos-Onsins e Rozas, 2002), com significância a ser avaliados com base em 10.000 simulações coalescentes (supondo neutralidade e equilíbrio). Para tanto, usamos o programa DNAsp 5,10 (Librado e Rozas, 2009). Nós reconstruímos a história demográfica das populações de *M. morphoeus* usando Extended Bayesian Skyline Plots; (EBSP; Drummond *et al.*, 2012) incorporado ao programa BEAST 1.7 (Drummond *et al.*, 2012). Foram utilizados quatro marcadores (mtDNA, MUSK e TGFB2) simultaneamente e, usando um relógio strito com uma taxa de evolução de 2,21% por milhão de anos (Weir e Schluter de 2008) fixados para mtDNA e uma taxa estimada para outros genes. Os modelos evolutivos utilizados para nesta análise, também foram selecionados usando JMODELTEST 2.1.1 (Darriba *et al.*, 2012). Corremos as análises para 50 milhões de gerações, e inspecionamos os arquivos de log no Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond, 2007).

RESULTADOS

Análises filogenéticas

As relações filogenéticas dentro de *Monasa* foram determinadas através das análises de Inferência Bayesiana (IB) e Máxima Verossimilhança (ML) com base no DNA mitocondrial (mtDNA) e conjunto de dados de sequências concatenadas (total de três análises; fig. 1, 2 e 3), incluindo dois genes mitocondriais (*Cit b* e ND2) e dois locus nucleares (MUSK e TGFB2). Foram amostradas 4 de 9 subespécies descritas para o gênero *Monasa*, além das espécies monotípicas *M. flavirostris* e *M. atra*. Os resultados sugerem que as quatro espécies reconhecidas para o gênero são monofileticas e determinadas com alto suporte estatístico $pp > 0,95$ (mtDNA); $pp > 0,95$ (multilocus) e $bt = 100$ (mtDNA); Fig. 1, 2 e 3). Nossos resultados também revelaram que todas as

espécies do gênero *Monasa* são monofiléticas, com *M. flavirostris* irmã das outras espécies do gênero (pp mtDNA = 0,59; p multilocus = 0,6; bt mtDNA = 87; Figuras 2 e 3), seguido por *M. morphoeus* (pp mtDNA = 1,0; pp multilocus = 1,0; bt mtDNA = 100). As espécies *M. atra* e *M. nigrifrons* foram recuperadas como espécies irmãs e com alta probabilidade posterior nas três análises realizadas (Figuras 1, 2 e 3). Além disso, observamos que todas as espécies, exceto *M. atra* (Área de Endemismo Guiana) tem estruturação filogeográfica intraespecífica, sendo recuperados um total de 11 clados para as amostras utilizadas neste estudo com alto apoio estatístico pp > 0,95 (mtDNA); pp > 0,95 (multilocus) e bt = 100 (mtDNA). Sete subespécies são reconhecidas para a espécie politípica *M. morphoeus*, mas apenas 2 foram incluídos no estudo (*M. m. rikeri* e *M. m. peruana*) devido à indisponibilidade de tecidos para as outras subespécies. Em *Monasa morphoeus* foi possível encontrar um cenário bem mais complexo, revelando uma forte estruturação filogenética; onde todas as linhagens recuperadas coincidem com as conhecidas áreas de endemismos já descritas para a Amazônia. Estas distintas linhagens divergem entre se por uma “distância P” que variou entre 0,7-2,1% (Tabela 2). Estas linhagens estão, assim, distribuídas: Área de Endemismo Belém (R1), Área de Endemismo Xingu / Área de Endemismo Tapajós (R2), Área de Endemismo Rondônia *M. m. peruana* (P1), Área Endemismo de Inambari *M. m. peruana* (P2), Área de Endemismo Imeri *M. m. peruana* (P4), Área de Endemismo Napo *M. m. peruana* (P3) e Área de endemismo Jaú *M. m. peruana* (P5; Silva *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2012). Entretanto, os nós mais basais dentro do complexo *M. morphoeus* foram recuperados com baixos valores de probabilidade posterior, portanto, não sendo possível resgatar as relações de parentesco entre os clados dessa espécie.

Estimativas de diversificação e a árvore de espécies

Nós recuperamos a árvores de espécies (ST) para o gênero *Monasa* utilizando 5 cinco marcadores moleculares: 2 genes mitocondriais (*Cit b* e ND2) e 3 genes nucleares (MUSK, TGFB2 e G3PDH; Figura 4). Os grupos estatisticamente bem suportados recuperados na análise IB e ML foram usados como espécies *priors*. Nossos resultados recuperaram *M. flavirostris* mais basal. Além disso, outros dois clados foram recuperados: um formado por *M. nigrifrons* / *M. atra* e o segundo clado formado pela espécie politípica *M. morphoeus*. Esta composta por dois subclasses com alta probabilidade posterior (pp = 0,93; Figura 4). A primeira divisão ocorreu a cerca de 1,9 Ma (IC = 1,2-2,7) separando *M. flavirostris* das outras espécies *M. atra*, *M. nigrifrons* e a espécie politípica *M. morphoeus*. A segunda divisão ocorreu a cerca de 1,6 Ma (IC = 1,0 - 2,1) separando *M. atra* / *M. nigrifrons* da espécie politípica *M. morphoeus*. A terceira divisão ocorreu a cerca de 1,2 Ma (IC = 1,8-0,35) separando as duas populações disjuntas em *M. flavirostris*. O quarto evento de diversificação ocorreu a cerca de 1,0 Ma (IC = 1,5-0,4) separando as espécies *M. atra* e *M. nigrifrons*. O quinto evento de diversificação ocorreu a cerca de 0,9 Ma (IC = 1,2-0,6) separando os dois clados principais dentro de *M. morphoeus*. A sexta divisão ocorreu cerca de 0,7 Ma (1,0-0,35) separar o subclades *M. m. peruana* (P1) dos dois clados *M. m. rikeri* (R1 e R2). E por fim um evento de diversificação que ocorreu a cerca de 0,5Ma (0,3-0,8) separando *M. m. peruana* (P2); restrita a área de endemismo Inambari) das populações *M. m. peruana* (P3), *M. m. peruana* (P4) e *M. m. peruana* 5 (P5) que ocorrem ao norte do rio Solimões (Figura 5).

Delimitação de espécies usando BP&P

Nossos resultados foram semelhantes para as três análises utilizando o programa BP&P, onde foram utilizados dois algoritmos e três combinações diferentes de valores: τ

e θ , assumindo uma probabilidade posterior 95%. Os resultados aqui obtidos foram significativos para as quatro espécies reconhecidas do gênero *Monasa*. Mas, para as populações reciprocamente monofiléticas em *M. morphoeus* recuperados pelo IB, ML e ST, encontramos resultados robustos com altas probabilidades apenas para a separação entre os dois clados principais (*M. m. rikeri* (R1), *M. m. rikeri* (R2) e *M. m. peruana* (P1) e (*M. m. peruana* (P2), *M. m. peruana* (P3), *M. m. peruana* (4) e *M. m. peruana* (P5)); para a divisão entre o clado *M. m. peruana_1* e os clados *M. m. rikeri* (R1) e *M. m. rikeri* (R2); e para a divisão entre *M. m. peruana* (P2) e os clados *M. m. peruana* (P3), *M. m. peruana* (P4), *M. m. peruana* (P5). Para *M. flavirostris*, encontramos um alto apoio para os dois clados (*M. flavirostris* (F1) e *M. flavirostris* (F2)). Já para o clado formado por *M. atra*, *M. nigrifrons* (N1) e *M. nigrifrons* (N2) encontramos alta suporte para a divergência entre *M. atra* e o clado formado por *M. nigrifrons* (N1) e *M. nigrifrons* (N2) (Figura 5).

Genética de populações e demografia histórica

Os três testes de neutralidade D de Tajima, Fs de Fu e R2 indicaram que a evolução dos quatro marcadores mtDNA, MUSK e TGFB2 desviam da neutralidade (Tabela 2). O teste D de Tajima e de Fs de Fu apresentaram valores negativos, sugerindo expansão recente das populações de *M. morphoeus peruana* (P1), *M. m. peruana* (P3) e *M. m. peruana* (P4) pelo fato dos valores Fs de Fu terem sido estatisticamente significativos e negativo. O teste R2 apresentou valores baixos e significativos para as mesmas populações, suportando um cenário demográfico semelhante. A análise do EBSP empregando os quatro marcadores juntos (populações ou marcadores não-polimórficos foram excluídos das análises) revelou um sinal de expansão populacional recente a partir de cerca de 100.000 anos atrás para a população *M. m. rikeri* (R2) e *M. m. peruana* (P2), enquanto que para *M. m. peruana* (P3) esta expansão populacional ocorreu nos últimos

50 mil anos (Figura 6), sugerindo um papel significativo para a mudança clima do Pleistoceno.

DISCUSSÃO

Diversificação do gênero Monasa na Amazônia

As espécies atualmente descritas para o gênero *Monasa* são monofiléticas e quase todas, exceto *M. atra* (Figura 1), estão fortemente estruturadas em linhagens evolutivas significativas. (Figuras 1, 2 e 3). Em *M. flavirostris* e *M. nigrifrons*, dois filogrupos distintos foram recuperados dentro de cada espécie (Figuras 1 e 3). Enquanto que em *M. nigrifrons* os filogrupos distintos ocorreram em regiões separadas pelo rio Tapajós, que pode ter influência direta na separação desses filogrupos. Esses mesmo rio também teve influência na diversificação de outras linhagens de aves amazônicas (Carneiro *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2012; Thom e Aleixo, 2015). Já os limites das linhagens em *M. flavirostris* (Figura 1) correspondeu às populações alopátricas que ocorrem nas áreas de endemismo Inambari e oeste da área de endemismo Napo e Imeri. Os filogrupos distintos em *M. flavirostris* divergiram em 3,5% em seu mtDNA (Tabela 1), tendo também alto apoio nas análises do BP & P (Figura 5) para os três cenários analisados e também apresentou alto apoio estatísticos e valores de divergências significativos na árvore de espécie (Figura 4). Esses dois clados pertencem à forma nominal (Rasmussen e Collar, 2002), demonstrando a existência de diversidade críptica. E isso pode ter sido influenciado pela dinâmica do soerguimento dos Andes que alterou toda a paisagem na região oeste da Amazonia, inclusive no curso dos rios no oeste da Amazônia, e isolou as populações em diferentes áreas de endemismos (Hoorn *et al.*, 2010; Chaves *et al.*, 2011). Além disso, a diversificação desse grupo pode estar relacionada a formação do rio Solimões, e este está intimamente relacionado com a formação da drenagem

transcontinental amazônica durante o Plio-Pleistoceno tardia (Campbell *et al.*, 2006; Hoorn *et al.*, 2010; Latrubesse *et al.*, 2010). Estes eventos são compatíveis com o tempos de diversificação recuperados para os dois clados de *M. flavirostris* que foi 1,2 Ma (IC = 1,8-0,35; Figura 4).

Dentro de *M. morphoeus* foram recuperadas sete linhagens com alto apoio estatístico e reciprocamente monofiléticas na análise da de IB, ML e Árvore de espécie (Figuras 2 e 4). No entanto, apenas dois nomes estão disponíveis para esta diversidade analisada: uma incluindo populações a leste do rio Tapajós áreas de endemismos Belém, Xingu e Tapajós (pertencentes a subespécie *M. m. rikeri*), e outra incluindo as populações do oeste rio Tapajós, nas áreas endemismos Rondônia, Inambari, Napo, Imeri e Jaú (pertencentes a subespécie *M. m. peruana*).

Nossos dados apoiam plenamente a independência evolutiva da *M. m. rikeri* (*R1* e *R2*), tratado como uma subespécie de *M. morphoeus*. Além de estarem separados por uma alta divergência em sequência de mtDNA (2,1%; Tabela 1), bem como por apresentar alto apoio para os três cenários nas análises do BP&P (Figura 5). Esses táxons também apresentam caracteres plumagem distintos (Rasmussen e Collar, 2002). Um estudo taxonômico mais abrangente será realizado comparando caracteres morfológicos e moleculares em *M. flavirostris* e *M. morphoeus* que podem ser divididas de forma segura em duas ou mais espécies respectivamente. As linhagens de *Monasa morphoeus* reconhecidos neste estudo estão restritas as áreas de endemismos delimitadas pelos rios amazônicos ao longo da sua distribuição, sugerindo um papel importante dos principais rios amazônicos como barreiras na diversificação. Além disso, estes resultados são concordantes quando comparados com outros estudos já realizados nesta mesma região com outras linhagens de terra-firme (Carneiro *et al.*, 2012; Fernandes *et a.*, 2012; Ribas *et al.*, 2012; d'Horta *et al.*, 2013; Thom e Aleixo, 2015). Apesar da forte estruturação

filogenética entre os táxons terminais, a ausência de alguns táxons como *M. m. morphoeus*, *M. m. grandior*, *M. m. fidelis*, *M. m. pallescens* e *M. m. sclateri*, podem ter influenciado na baixa estruturação filogenética nos ramos basais dentro do complexo *M. morphoeus* (Figuras 2 e 4).

A diversificação dos dois principais filogrupos em *M. morphoeus*; filogrupos 1 (*M. m. rikeri* (R1), *M. m. rikeri* (R2) e *M. m. peruana* (P1) e filogrupos 2 (*M. m. peruana* (P2), *M. m. peruana* (P3), *M. m. peruana* (P4), *M. m. peruana* (P5) ocorreu acerca de 0,93Ma. (IC 0,6 – 1,2) e é limitada pelo rio Madeira. Esta região sofreu grandes mudanças após o rompimento do arco do Purus (Wanderli-Filho *et al.*, 2010) que era uma barreira importante para a evolução de drenagem da bacia Amazônica e esta foi dividida por ele até o Plioceno (Hoorn *et al.*, 2010; Latrubesse *et al.*, 2010). Essas mudanças provocaram a atual formação do rio Amazonas, levando a uma completa reorganização dos rios (Hoorn *et al.*, 2010). Os dados filogeográficos aqui apresentados são consistentes com diversas divisões independentes no moderno curso moderno do Rio Madeira como também foi sugerido para várias outras linhagens de aves (Fernandes *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013; Thom e Aleixo, 2015).

Uma outra diversificação dentro do complexo *M. morphoeus* pode ter sido influenciada pelo rio Solimões, a cerca de 0,7 Ma. separando o filogrupos de *M. m. peruana* (P2) que ocorre na área de endemismo Inambari, dos filogrupos *M. m. peruana* (P3), *M. m. peruana* (P4), *M. m. peruana* (P5) que ocorrem nas áreas de endemismos Napo, Imeri e Jaú, respectivamente. É provável que o ancestral de *M. morphoeus* tenha ocupado todo o oeste da Amazônia após o rompimento do arco do Purus e a conformação da atual bacia do rio Amazonas/ Solimões tenha influenciado na separação desses clados (Latrubesse *et al.*, 2010). Além disso, há fortes evidências de que o baixo curso do rio Negro migrou de oeste para leste (~ 150 km de sua posição atual; Almeida-Filho e

Miranda, 2007), como resultado de atividades tectônicas, com uma idade estimada de 0,4 Ma. para a sedimentação inicial do baixo curso do rio Negro. Todas estas evidências antecederam a idade estimada para a separação das linhagens e são, portanto, consistentes com a hipótese de ter influenciado na diversificação que ocorreu entre os filogrupos *M. m. peruana* (P4), *M. m. peruana* (P5) a cerca de 84 mil anos. Isso também pode explicar o "efeito de barreira" mais forte na porção do baixo rio Negro (Ribas *et al.*, 2012).

Incongruências taxonômicas

Nossos dados mostraram que *M. m. peruana* (P1), que ocorre na área de endemismo Rondônia, está mais relacionado as linhagens *M. m. rikeri* (R1 e R2) do que com as outras linhagens de *M. m. peruana* que ocorrem no oeste da Amazônia; mostrando, portanto, uma incongruência com a taxonomia tradicional. As relações filogenéticas aqui apresentadas precisam ser interpretadas com cautela, devido a ausência de táxons descritos como subespécies de *M. morphoeus*, mas que apresentam significativa variação morfológica intraespecífica (Figura 4; Rasmussen e Collar, 2002). Em *Monasa nigrifrons* também foi observado uma incongruência taxonômica já que a subespécie *M. nigrifrons canescens* trata-se de um sinônimo de *M. n. nigrifrons* (N2) que ocorre em toda a região oeste da Amazônia. Nesse estudo temos amostras de localidades próximas a localidade do holótipo de *M. n. canescens* na região leste da Bolívia (LSUMZ 37667 e LSUMZ 37620).

AGRADECIMENTOS

We thank the curator and curatorial assistants of the Field Museum of Natural History, Chicago, USA (FMNH); Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil (INPA); Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves, Universidade de São Paulo, Brazil (LGEMA); Louisiana State University Museum of Natural Science (LSUMZ), Baton Rouge, USA; Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Brazil (MPEG); and Smithsonian National Museum of Natural History (SNMNH), Washington, USA, for allowing us to borrow tissues samples and study specimens under their care. Field and laboratory work related to this paper were generously funded by CNPq (grants #310593/2009-3; “INCT em Biodiversidade e Uso da Terra da Amazônia” 574008/2008-0; # 563236/2010-8; and # 471342/ 2011-4), FAPESPA (ICAAF 023/2011 and 010/2012), and through the collaborative grant "Dimensions US-Biota-São Paulo" (#1241066) supported by the US National Science Foundation (NSF), National Aeronautics and Space Administration (NASA), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) to AA and JMB. Support to LMSS graduate research was provided by a Capes PhD fellowship and CNPQ (#207461/2014-7). AA is supported by a CNPq research productivity fellowship (#310880/2012-2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonelli, A., Quijada-Mascareñas, A., Crawford, A.J., Bates, J.M., Velasco, P.M., Wüster, W., 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In: Hoorn, C., Wesselingh, F.P. (Eds.), *Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past*. Wiley-Blackwell, London, UK, pp. 386–404.

Antonelli, A., Sanmartin, I., 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Neotropical plant evolution*. 60, 403–414.

Batalha-Filho, H., Fjeldså, J., Fabre, P.H., Miyaki, C.Y., 2013. Connections between the Atlantic and Amazonian forest avifaunas represents distinct historical events. *J. Ornithol.* 154, 41–50.

Bates, J.M., Hackett, S.J., Cracraft, J., 1998. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *J. Biogeogr.* 25, 783–793.

Bates, J.M., 2001. Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic pattern of diversification. In: Viera, I., D’Incao, M.A., Silva, J.M.C., Oren, D. (Eds.), *Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia*. Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, Brasil, pp. 119–138.

Bates, J. M., J. Haffer, and E. Grismer., 2004. Avian mitochondrial DNA sequence divergence across a headwater stream of the Rio Tapajós, a major Amazonian river. *J. Ornithol.* 145, 199–205.

Borges, S.H. & Da Silva, J.M.C. (2012) A New Area of Endemism for Amazonian Birds in the Rio Negro Basin. *The Wilson Journal of Ornithology*, 124, 15-23.

Chaves, J.A., Weir, J.T. & Smith, T.B. (2011) Diversification in *Adelomyia* hummingbirds follows Andean uplift. *Molecular Ecology*, 20, 4564-76.

Campbell K. E. Jr., Frailey C. D., Romero-Pittman L., 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 239, 166–219.

Carneiro, L.S., Gonzaga, L.P., Rêgo, P.S., Sampaio, I., Schneider, H., Aleixo, A., 2012. Systematic revision of the Spotted Antpitta (Grallariidae: *Hylopezus macularius*), with description of a cryptic new species from Brazilian Amazonia. *Auk* 129, 338–351.

Cracraft, J., 1985. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: areas of endemism. *Ornitol. Neotrop.* 36, 49–84.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods.* 9, 772.

d’Horta, F., Cuervo, A.M., Ribas, C.C., Brumfield, R.T., Miyaki, C.Y., 2013. Phylogeny and comparative phylogeography of *Sclerurus* (Aves: Furnariidae) reveals constant and cryptic diversification in an old radiation of rain forest understory specialists. *J. Biogeogr.* 40, 37–49.

Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.

Edwards, S.V., Liu, L., Pearl, D.K., 2007. High-resolution species trees without concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5936–5941.

Fernandes, A.M., Wink, M., Aleixo, A., 2012. Molecular phylogeography of the Chestnut-tailed Antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. *J. Biogeogr.* 39, 1524–1535.

Flot, J.F., 2010. Seqphase: a web tool for interconverting phase input/output files and fasta sequence alignments. *Molecular Ecology Resources*, 10, 162–166.

Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925.

Garrick, R.C., Sunnucks, P., Dyer, R.J., 2010. Nuclear gene phylogeography using PHASE: Dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 118.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.

Haffer, J., 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science* 165, 131–137.

Hellmayr, C. E. 1910. The birds of the Rio Madeira. *Novit. Zool.* 17, 257–428.

Heled, J., Drummond, A., 2010. Bayesian inference of species trees from multi-locus data. *Mol. Biol. Evol.* 27, 570–580.

Hoorn, C., Wesselingh, F. P., ter Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartin, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C. L., Figueiredo, J. P., 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330, 927–931.

Hoorn C., Mosbrugger V., Mulch A., Antonelli A., 2013. Biodiversity from mountain building. *Nat. Geosci.* 6, 154–154.

Huelsenbeck, J.P., Rannala, B., 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic Biology*, 53, 904–913.

Latrubesse E. M., Cozzuol M., Silva-Caminha S. A. F., Rigsby C. A., Absy M. A., Jaramillo C., 2010. The late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth Sci. Rev.* 99, 99–124.

Leaché, A., Fujita, M., 2010. Bayesian species delimitation in West African geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proc. R. Soc. B* 277, 3071–3077.

Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.

Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.

Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer v1.4. <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2092–2100.

Rasmussen, P., Collar, N., 2002. Family Bucconidae (Puffbirds). *Handbook of the birds of the world* (ed. by J. Del Hoyo, A. Elliot and J. Sargatal). Lynx Edicions.

Ribas, C.C., Aleixo, A., Nogueira, A.C.R., Miyaki, C.Y., Cracraft, J., 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proc. R. Soc. B* 279, 681–689.

Rissler, L.J., Apodaca, J.J., 2007. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, 56, 924–942.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference

under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.

Rull, V., 2013. Palaeoclimates and Amazon biodiversity. *J. Biogeogr.* 40, 1413–1414.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 2, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Silva, J. M. C., Rylands, A. B., Fonseca, G. A. B., 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conserv. Biol.* 19:689–694.

Smith, B.T., Klicka, J., 2010. The profound influence of the late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of New World birds. *Ecography* 33, 333–342.

Smith, B. T., Ribas, C. C., Whitney, B. M., Hernandez-Banos, B. E., Klicka J., 2013. Identifying biases at different spatial and temporal scales of diversification: a case study in the Neotropical parrotlet genus *Forpus*. *Molecular Ecology*, 23, 483-494.

Smith, B.T., McCormack, J.E., Cuervo, A.M., Hickerson, M.J., Aleixo, A., Cadena, C.D., Pérez-Eman, J., Burney, C.W., Xie, X., Harvey, M.G., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Derryberry, E.P., Prejean, J., Fields, S., Brumfield, R.T., 2014. The drivers of tropical speciation. *Nature* 515, 406–409.

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.

Stephens, M., Donnelly, P., 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Human Genet.* 73, 1162–1169.

Stephens, M., Scheet, P., 2005. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *American Journal of Human Genetics*, 76, 449–462.

Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Human Genet.* 68, 978–989.

Tajima, F., 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *803 Genetics*, 123, 597–601.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Thom, G., Aleixo, A., 2015. Cryptic speciation in the white-shouldered antshrike (*Thamnophilus aethiops*, Aves – *Thamnophilidae*): the tale of a transcontinental radiation across rivers in lowland Amazonia and the Northeastern Atlantic Forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 82, 95–110.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.

Tobias, J.A., Bates, J.M., Hackett, S.J., Seddon, N., 2008. Comment on “The latitudinal gradient in recent speciation and extinction rates of birds and mammals”. *Science* 319, 901.

Wanderley-Filho, JR, Eiras JF., Cunha, PRC, van der Ven, PH. 2010. The Paleozoic Solimões and Amazonas basins and the Acre foreland basin of Brazil. In: Hoorn, C., Wesselingh, F. Amazonia: landscape and species evolution. WileyBlackwell. 482p

Wallace, A. R., 1852. On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society London*, 20, 107-110.

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

Weir, J.T., 2009. Implications of genetic differentiation in Neotropical montane forest birds. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 96, 410–433.

Weir, J. T., Faccio, M. S., Pulido-Santacruz, P., Alfredo O. Barrera-Guzma, A. O., Aleixo, A., 2015. Hybridization in headwater regions, and the role of rivers as drivers of speciation in Amazonian birds. *Evolution*. 69, 1823–1834.

Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371–373.

Yang, Z., Rannala, B., 2014. Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 3125-3135

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média dos pares por distância p não corrigida (mtDNA) entre e dentro dos clados principais do gênero *Monasa* recuperados pelas análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança.

Tabela 2. Diversidade e parâmetros demográficos das linhagens do gênero *Monasa* para os quais pelo menos cinco indivíduos foram sequenciados para os genes nucleares (MUSK e TGFB2) mitocondrial (*Cit b* e ND2) e. Lin. = linhagens / clades; N = número de alelos faseada; número N° de haplótipos; H = diversidade haplótipica; π = diversidade nucleotídica; D = D de Tajima; Fs = Fs de Fu; R2 = Ramos-Onsins e Rozas. Os níveis de significância para D de Tajima, Fs de Fu e R2 e $P < 0,05$ estão representadas em negrito.

Lista de Figuras

Figura 1. Relações filogenéticas entre os clados principais das espécies *M. flavirostris* e *M. atra* derivados de 1) Inferência Bayesiana (mtDNA), 2) Máxima Verossimilhança com base em sequências de mtDNA e 3) todos os loci combinadas respectivamente. Valores de suporte nodais correspondem a probabilidades posteriores e bootstraps pseudo-repetições obtidas, respectivamente, através do mtDNA e probabilidade posterior através da análise de Inferência Bayesiana com o conjunta dos dados concatenados. O mapa a direita representa a distribuição geográfica dos clados e as respectivas amostras utilizadas nesse estudo.

Figura 2. Relações filogenéticas entre os clados principais das espécies polítípica *M. morphoeus* derivados de 1) Inferência Bayesiana (mtDNA), 2) Máxima Verossimilhança com base em sequências de mtDNA e 3) todos os loci combinadas respectivamente. Valores de suporte nodais correspondem a probabilidades posteriores e bootstraps pseudo-repetições obtidas, respectivamente, através do mtDNA e probabilidade posterior através da análise de Inferência Bayesiana com o conjunta dos dados concatenados. O mapa a direita representa a distribuição geográfica dos clados e as respectivas amostras utilizadas nesse estudo.

Figura 3. Relações filogenéticas entre os clados principais das espécies *M. nigrifrons* derivados de 1) Inferência Bayesiana (mtDNA), 2) Máxima Verossimilhança com base em sequências de mtDNA e 3) todos os loci combinadas respectivamente. Valores de suporte nodais correspondem a probabilidades posteriores e bootstraps pseudo-repetições obtidas, respectivamente, através do mtDNA e probabilidade posterior através da análise de Inferência Bayesiana com o conjunta dos dados concatenados. O

mapa a direita representa a distribuição geográfica dos clados e as respectivas amostras utilizadas nesse estudo.

Figura 4. *Multi-locus* árvore de espécies coalescente baseado em (mtDNA, MUSK, TGFB2 e G3PDH; ramos em azul correspondem aos intervalos de confiança de 95%. Círculos pretos representam valores de probabilidade posterior $pp \geq 95\%$ para a árvore de espécie e os quadrados brancos correspondem aos valores de probabilidade posterior $pp \leq 75\%$ para a árvore de espécie.

Figura 5. Resultados filogeográfico das análises de (BP&P). Números nos ramos representam o número de vezes que um dado nó foi recuperado com uma probabilidade de especiação ≥ 0.95 baseada em três análises realizadas utilizando dois algoritmos (0 e 1) e três combinações de *priors* no tamanho das populações ancestrais e tempos de divergência (para mais detalhes ver métodos).

Figura 6. História demográfica dos clados de *Monasa* para os quais pelo menos cinco indivíduos foram amostrados, inferidas por meio *Extended Bayesian Skyline Plots* baseado na mtDNA (*Cit b* e ND2), MUSK e TGFB2. Linha sólida preto representa o valor médio, enquanto que o intervalo de cinza corresponde ao intervalo de confiança de 95%. O eixo X corresponde ao tempo em milhões de anos antes do presente. O eixo Y representam tamanho efetivo da população.

Tabela 1.

Clados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>M. flavirostris</i> 1											
2 <i>M. flavirostris</i> 2	0,035										
3 <i>M. atra</i>	0,109	0,105									
4 <i>M. nigrifrons</i> 1	0,103	0,098	0,026								
5 <i>M. nigrifrons</i> 2	0,104	0,098	0,028	0,008							
6 <i>M. m. rikeri</i> 1	0,104	0,091	0,087	0,085	0,087						
7 <i>M. m. rikeri</i> 2	0,101	0,092	0,084	0,086	0,088	0,007					
8 <i>M. m. peruana</i> 2	0,111	0,1	0,085	0,085	0,083	0,024	0,021				
9 <i>M. m. peruana</i> 3	0,112	0,098	0,082	0,082	0,084	0,022	0,019	0,016			
10 <i>M. m. peruana</i> 1	0,106	0,097	0,079	0,082	0,082	0,019	0,016	0,015	0,014		
11 <i>M. m. peruana</i> 4	0,108	0,099	0,084	0,084	0,086	0,021	0,018	0,021	0,017	0,016	
12 <i>M. m. peruana</i> 5	0,109	0,101	0,085	0,085	0,087	0,020	0,017	0,014	0,012	0,011	0,009

Tabela 2.

Lin.	Gene	N	H	Hd	π	D	Fs	R2
<i>M. m. rikeri 2</i>	mtDNA	11	7	0,9	0,0041	-1,621	-2,303	0,125
	Musk	18	3	0,386	0,00068	-0,7396	-0,675	0,136
	TGFB2	18	3	0,386	0,0006	-0,7396	-0,675	0,136
<i>M. m. peruana 1</i>	mtDNA	26	6	0,354	0,0018	-2,0545	-1,924	0,079
	Musk	32	11	0,867	0,00307	-0,8407	-4,569	0,086
	TGFB2	32	11	0,867	0,0030	-0,8407	-4,569	0,086
<i>M. m. peruana 2</i>	mtDNA	12	6	0,85	0,0024	-0,6128	-0,724	0,127
	Musk	12	2	0,17	0,00028	-1,1405	-0,476	0,276
	TGFB2	12	2	0,167	0,0002	-1,1405	-0,476	0,276
<i>M. m. peruana 3</i>	mtDNA	9	4	0,583	0,0013	-0,91	-0,286	0,154
	Musk	12	7	0,88	0,00312	-1,2068	-2,81	0,121
	TGFB2	12	7	0,879	0,00312	-1,2068	-2,81	0,121
<i>M. m. peruana 4</i>	mtDNA							
	Musk	9	5	0,806	0,00206	-0,689	-1,995	0,142
	TGFB2	9	5	0,806	0,00206	-0,689	-1,995	0,142
<i>M. atra</i>	mtDNA							
	Musk	17	10	0,838	0,00301	-1,871	-6,027	0,073
	TGFB2	21	15	0,943	0,00645	-1,03421	-7,555	0,087

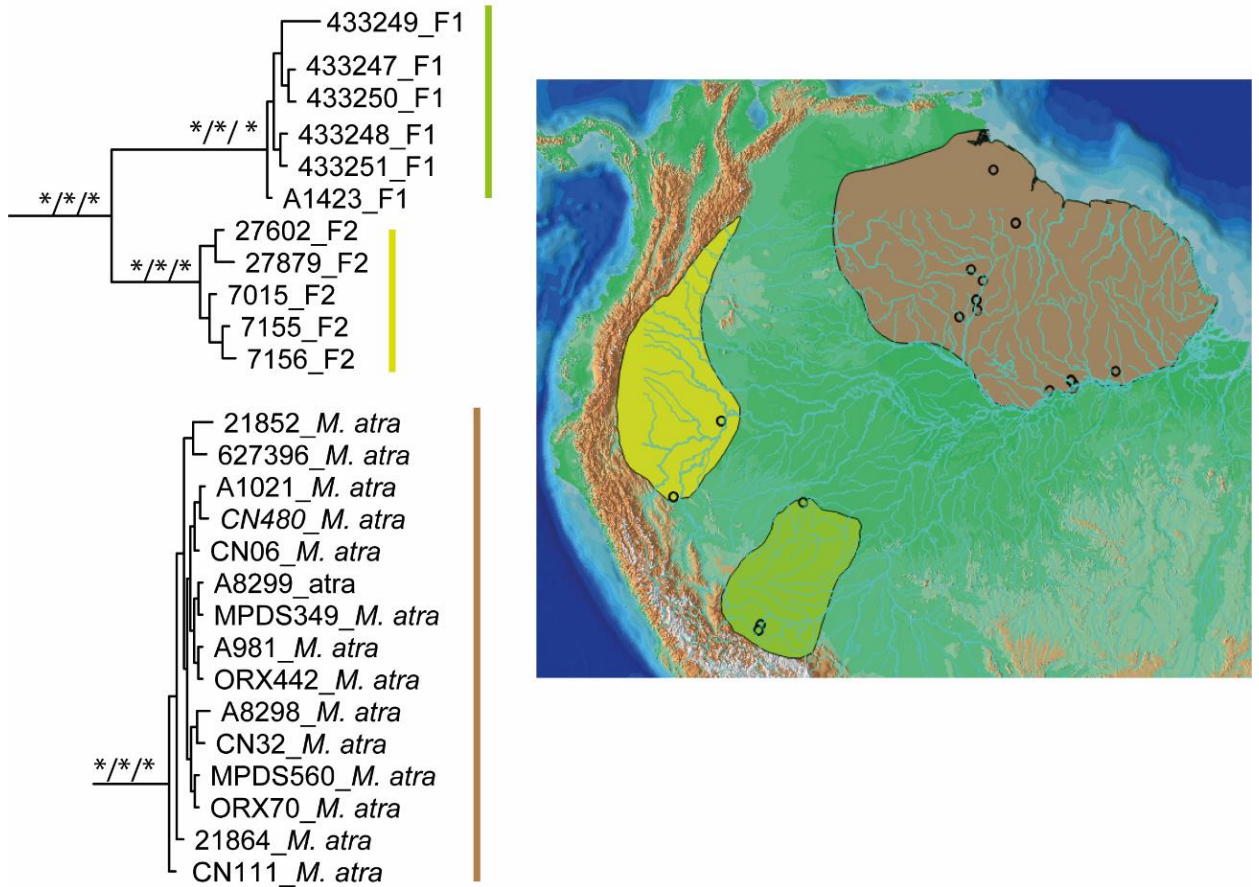


Figura 1.

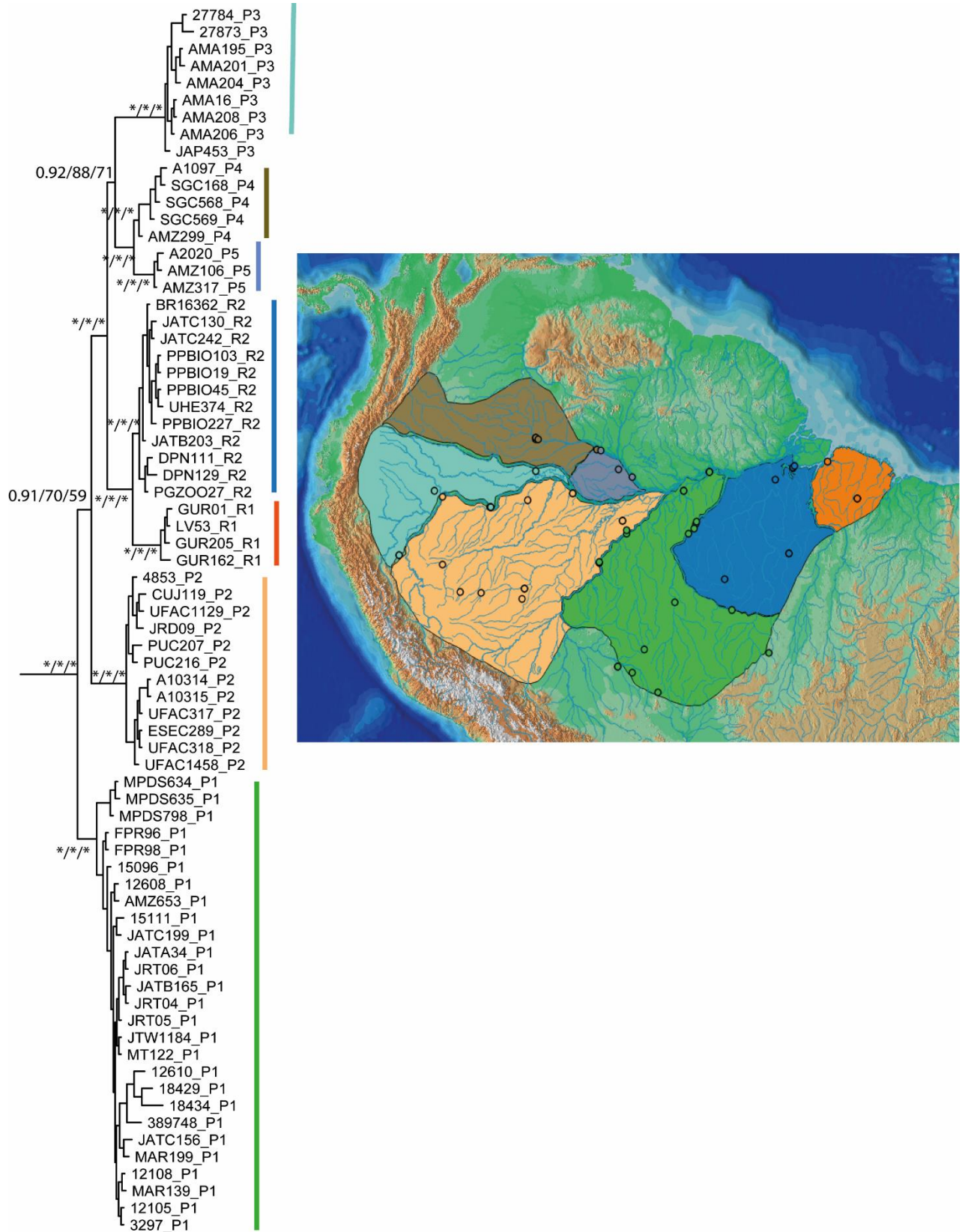


Figura 2.

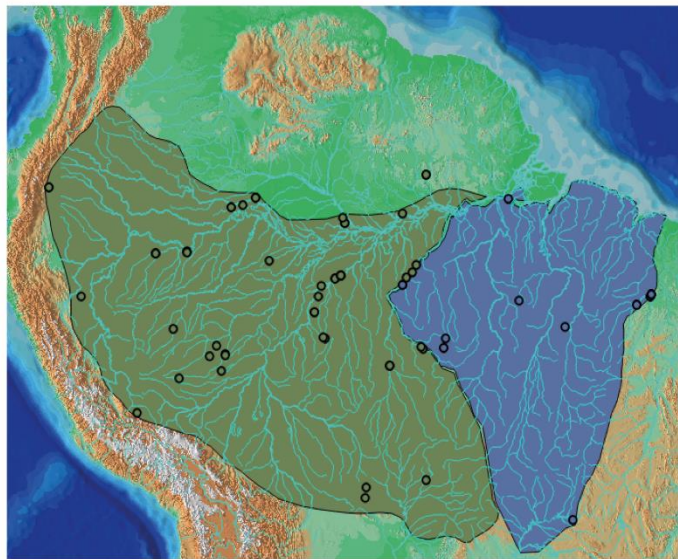


Figura 3.

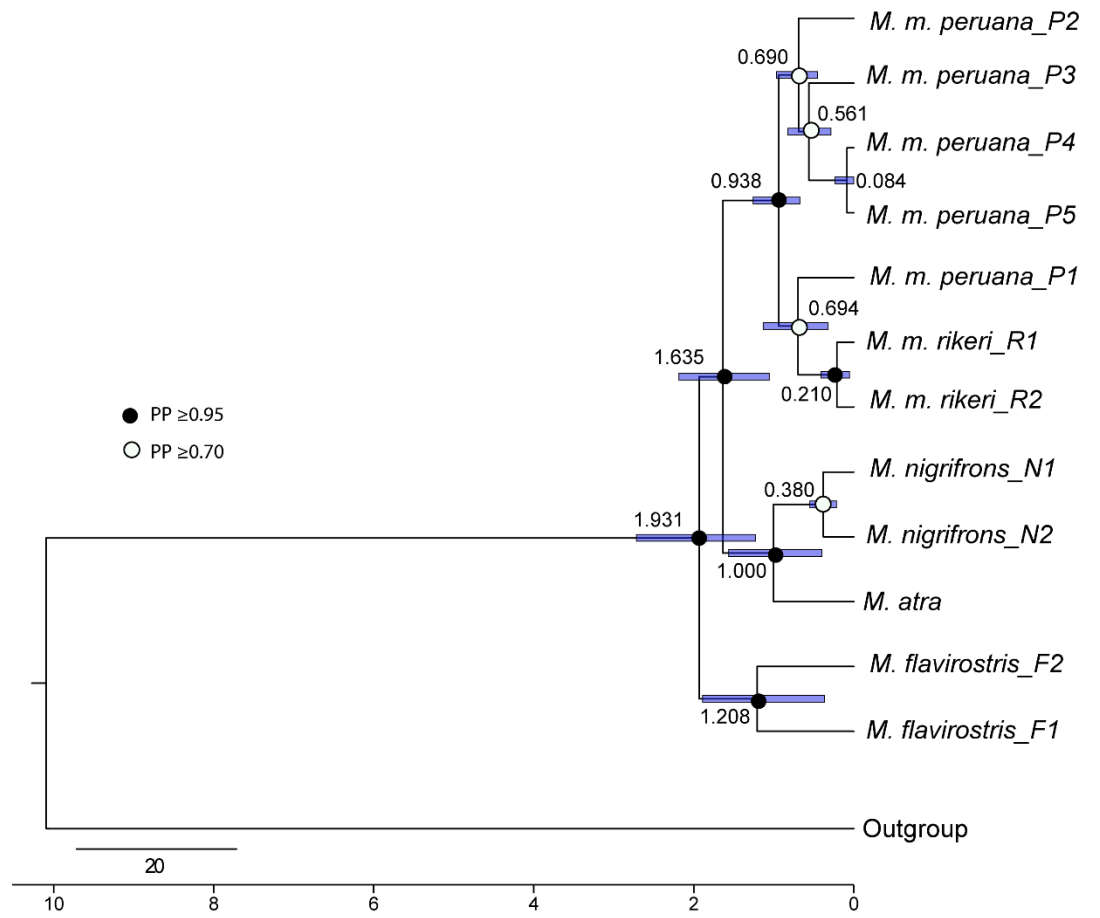


Figura 4.

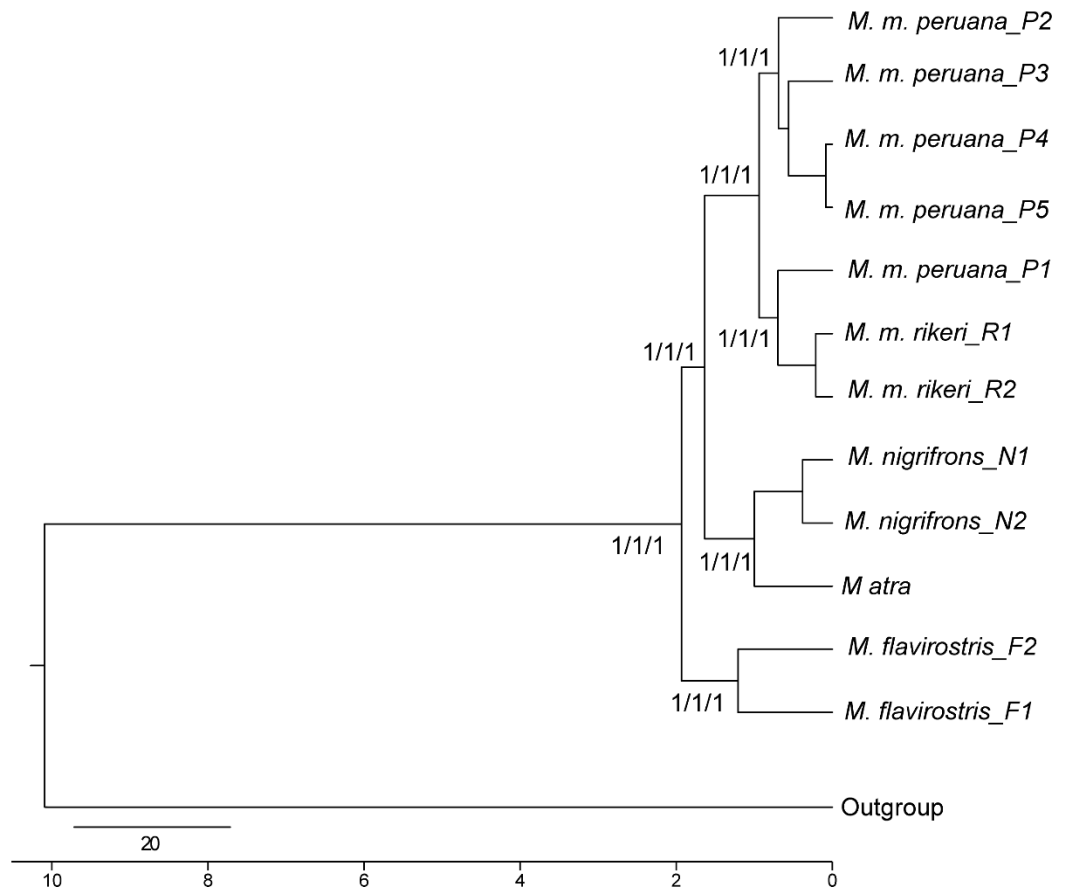


Figura 5.

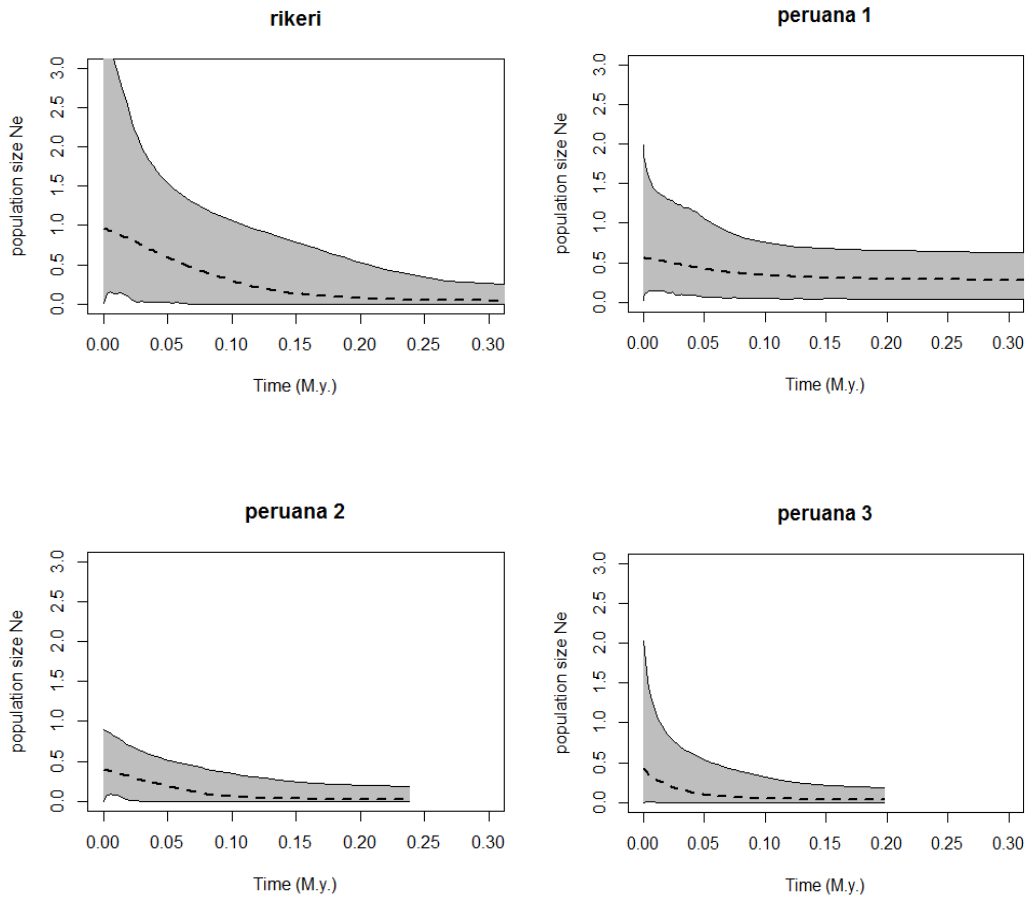


Figura 6.

Material suplementar

O DNA total foi extraído utilizando procedimentos padrões com a técnica de fenolclorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989) e amplificados via PCR. Foi utilizado o *Kit Master Mix* com as seguintes concentrações: 50 mM de tris HCl (PH 9.0), 50 mM NaCl, 5mM de MgCl₂, 200 µM de cada DNTPs. A amplificação segue os seguintes passos: 5 minutos iniciais a 95°C para a homogeneização do bloco e completa desnaturação das fitas de DNA, em seguida, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a temperatura de anelamento específica (Tabela 1) para cada conjunto de *primers* e 1 minuto a 72°C, seguido de uma etapa final de 7 minutos, a 72°C, para a polimerização de moléculas que possivelmente tenham se dissociado antes do final da síntese total do fragmento.

Foram selecionados dois genes mitocondriais: citocromo b (*citb*; ~1014 pb), NADH desidrogenase 2 (ND2; ~1042 pb), e três genes nucleares: Fator de crescimento transformador Beta 2 (TGFB2; ~610 pb), Receptor muscular específico de tirosina-kinase intron 3 (MUSK; ~600 pb) e Gliceraldeido-3-fosfo-dehidrogenase intron 11 (G3PDH; ~350 pb). Os fragmentos gênicos resultantes da reação de PCR tiveram suas sequências nucleotídicas determinadas utilizando-se o kit *BigDye® XTerminator v3.1 cyclosequencing* (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante, e lidos no Sequenciador Automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para maior segurança na definição entre mutações e erros de sequenciamento, ambas as fitas foram sequenciadas. O trabalho foi sendo desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Museu Paraense Emilio Goeldi – (LBM-MPEG) e no *Pritzker DNA Laboratory em The Field Museum Natural History*.

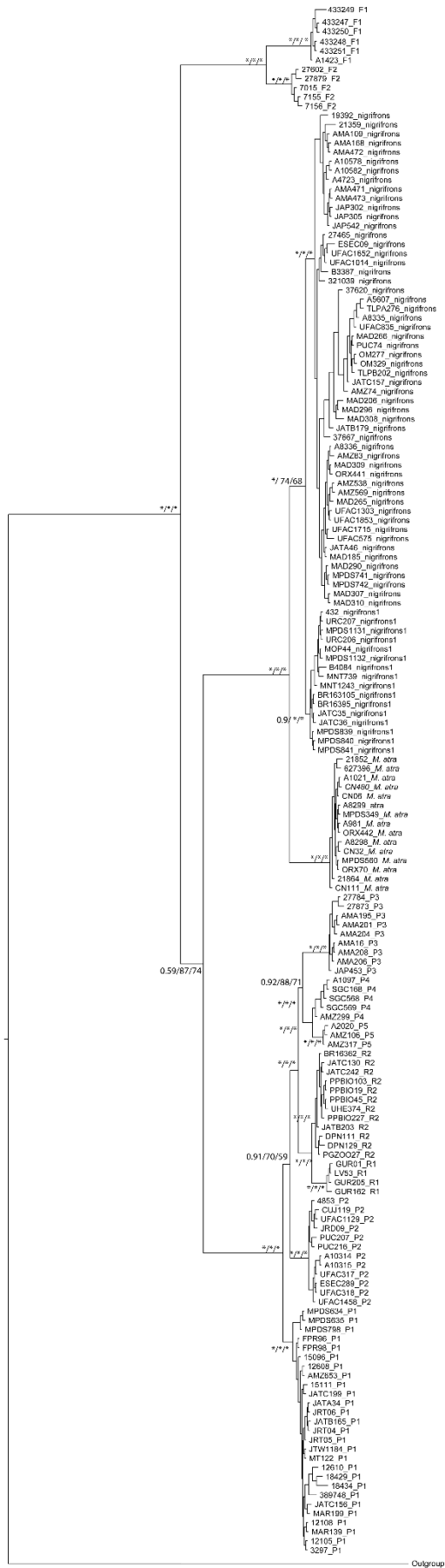


Figura S1. Relações filogenéticas entre os clados do gênero *Monasa* derivados de 1) Inferência Bayesiana (mtDNA), 2) Máxima Verossimilhança com base em sequências de mtDNA e 3) todos os loci combinadas respectivamente. Valores de suporte nodais correspondem a probabilidades posteriores e bootstraps pseudo-repetições obtidas, respectivamente, através do mtDNA e probabilidade posterior através da análise de Inferência Bayesiana com o conjunta dos dados concatenados.

Apêndice S1

Voucher	Localização	Espécies	Táxons	long	lat
LV 053	Barcarena, vila do conde, Abaetetuba	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R1	-48,619	-1,5008
GUR 001	Centro Novo, REBIO Gurupi (03°42'12,8"S;46°45'44"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R1	-46,762	-3,7033
GUR 162	Centro Novo, REBIO Gurupi (03°42'12,8"S;46°45'44"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R1	-46,762	-3,7033
GUR 205	Centro Novo, REBIO Gurupi (03°42'12,8"S;46°45'44"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R1	-46,762	-3,7033
BR163-062	Altamira, 30 km SW Castelo dos Sonhos, Fazenda Jamanxin (8°23'55,5"S,55°23'08"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-55,107	-8,4724
JATC 130	Jacareacanga, margem direita Rio Tapajós, Comunidade São Martim (06°06'31,76"S;57°36'49,88"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-57,602	-6,1102
JAT(C) 242	Itaituba, margem direita Tapajós, Rio Rato (05°13'49,18"S;56°55'55,9"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-56,932	-5,2303
PPBIO 103	Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-50,812	-1,8728
PPBIO 19	Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-50,812	-1,8728
PPBIO 45	Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-50,812	-1,8728
PPBIO 227	Portel, FLONA do Caxiuanã, Plot PPBIO (01°57'S; 51°36'W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-50,812	-1,8728
UHE374	Rio Xingu, margem direita, Senador José Porfírio (3°31'47.2"S, 51°43'58.6"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-51,938	-2,5645
PGZOO 027	Melgaço, FLONA Caxiuanã (01°44'S;51°27"W)	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-50,713	-1,7685
DPN 111	Município de Ourilândia do Norte	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-51,059	-6,9594
DPN 129	Município de Ourilândia do Norte	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-51,059	-6,9594
JATB 203	PA, Jacareacanga, margem direita Rio Tapajós	<i>M. morphoeus rikeri</i>	R2	-56,932	-5,2303
LGEMA 12108	Vilhena	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-60,173	-12,615
LGEMA 12105	Vilhena	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-6E+07	-12,615
JTW1184	Matupa, Fazenda São Jerônimo, Cachimbo (S-10,28237; W-54,68021)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-54,68	-10,282
MT 122	Querência, Fazenda Tanguro (12°49'13,9"S;52°21'14,7"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-52,354	-12,82
AMZ 653	Cotriguaçu, margem esquerda Rio Juruena, Fazenda São Nicolau (09°50'17"S;58°15'13"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-58,254	-9,8381

JAT(C) 199	Penedo, margem esquerda Tapajós (05°27'21,61"S;57°04'12"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-57,07	-5,4558
JAT(C) 156	Itaituba, Jatobá, margem esquerda Rio Tapajós (05°04'23,07"S;56°51'21,24"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-56,87	-5,0703
LGEMA 3297	Pontes e Lacerda	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-59,332	-15,168
MAR 199	Manicoré, Rodovia do Estanho, km 126 (08°39'01,3"S, 61°25'12,5"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-61,293	-5,7909
MAR 139	Manicoré, Rodovia do Estanho, km 137 (08°41'44,4"S, 61°24'16,6"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-61,282	-5,5723
LSUMZ 18434	Velasco; Parque Nacional Noel Keonpff Mercado 86 km ESE of Florida	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-60,972	-13,999
LSUMZ 18429	Velasco; Parque Nacional Noel Keonpff Mercado 86 km ESE of Florida	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-60,972	-13,999
JAT (A) 034	Jacareacanga, margem esquerda Rio Tapajós, Vila Mamãe-anã (05°44'18,7"S;57°21'19,9"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-57,413	-5,7586
JATC 165	Jacareacanga, margem esquerda Tapajós, Comunidade Terra Preta	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1		
JRT004	PA, Mun. Juruti, Base Capiranga, Igarapé Mutum (02°36'S-56°11'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-56,085	-2,1254
JRT005	PA, Mun. Juruti, Base Capiranga, Igarapé Mutum (02°36'S-56°11'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-56,085	-2,1254
JRT006	PA, Mun. Juruti, Base Capiranga, Igarapé Mutum (02°36'S-56°11'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-56,085	-2,1254
LSUMZ 15096	Velasco; 13 km SW Piso Firme	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-61,845	-13,609
LSUMZ 15111	Velasco; 13 km SW Piso Firme	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-61,845	-13,609
FPR 096	Maués, Flona do Pau Rosa, Comunidade Sta. Teresa (03°54'52"S;58°17'41"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-57,722	-3,2283
FPR 098	Maués, Flona do Pau Rosa, Comunidade Sta. Teresa (03°54'52"S;58°17'41"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-57,722	-3,2283
MPDS 634	Município de Humaitá, T. Indígena Parintintin, Aldeia Pupunha, Castanhal (07°28'S, 62°49'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-63,029	-7,4823
MPDS 635	Município de Humaitá, T. Indígena Parintintin, Aldeia Pupunha, Castanhal (07°28'S, 62°49'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-63,029	-7,4823
MPDS 798	Humaitá, Território Indígena Ipixuna, Aldeia Canavial, Miriti (06°33'S, 62°03'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-63,034	-7,466
LSUMZ 12610	Velasco; 50 km ESE Florida, Arroyo del Encanto	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-61,84	-13,646
LSUMZ 12608	Velasco; 50 km ESE Florida, Arroyo del Encanto	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	-61,84	-13,646
389748	Brasil, Rondônia, Cachoeira Nazaré, margem oeste do rio Jiparana	<i>M. morphoeus peruana</i>	P1	61.920244	10.239802

INPA A 10314	BR 319, km 300, Grade PPBio, Módulo 6, parcela N500	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-61,566	-4,993
INPA A 10315	BR 319, km 300, Grade PPBio, Módulo 6, parcela N501	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-61,566	-4,993
UFAC 317	Senador Guiomard, Ramal Nabor Júnior, km 26 (09°46'47,5"S,67°13'06,9"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-67,731	-9,0088
UFAC 318	Senador Guiomard, Ramal Nabor Júnior, km 26 (09°46'47,5"S,67°13'06,9"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-67,731	-9,0088
ESEC 289	ESEC Rio Acre, ca. 78 km W Assis Brasil (11°03'24,5"S,70°16'16,6"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-67,904	-9,6387
UFAC 1458	Santa Rosa, margem esquerda Rio Purus, foz do Chandless (09°06'57,4"S;69°49'53,9"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-70,488	-9,2865
PUC 207	Tefé, Base Petrobras/Urucu, Papagaio (04°51'S, 65° 04'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-64,72	-3,4038
PUC 216	Tefé, Base Petrobras/Urucu, Papagaio (04°51'S, 65° 04'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-64,72	-3,4038
CUJ 119	RDS Cujubim, margem E Rio Jutai (05°38'19"S,69°10'59"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-67,555	-3,7985
JRD 009	Jordão, Távora (09°12'34,2"S;71°48'08,7"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-71,802	-9,2094
UFAC 1129	Mâncio Lima, Estrada do Barão, Comunidade S. Domingos (07°33'10,0S;72°59'00,6"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-72,892	-7,6191
LSUMZ 4853		<i>M. morphoeus peruana</i>	P2	-72,918	-3,5867
AMA 195	Tabatinga, Assentamento do INCRA (04°11'54,8"S;69°53'47,4"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-69,89	-4,1872
AMA 201	Tabatinga, Assentamento do INCRA (04°11'54,8"S;69°53'47,4"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-69,89	-4,1872
AMA 204	Tabatinga, Assentamento do INCRA (04°11'54,8"S;69°53'47,4"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-69,89	-4,1872
AMA 016	Tabatinga, Assentamento do INCRA (04°11'54,8"S;69°53'47,4"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-69,896	-4,1983
AMA 206	Tabatinga, Assentamento do INCRA (04°11'54,8"S;69°53'47,4"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-69,89	-4,1872
AMA 208	Tabatinga, Assentamento do INCRA (04°11'54,8"S;69°53'47,4"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-69,89	-4,1872
JAP 453	Japurá, Rio Acanauí (01°56'12,4"S;66°36'18,8"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-67,022	-2,0705
LSUMZ 27873	77 km WNW Contamana, 7o 5' S, 75o 39' W	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-75,651	-7,0431
LSUMZ 27784	Ca 77 km WNW Contamana, 7 degrees, 05' S, 75 degrees, 39' W	<i>M. morphoeus peruana</i>	P3	-75,651	-7,0431
INPA A 1097	Margem esquerda do Rio Negro, ca 10 km E São Gabriel da Cachoeira, estrada da Olaria	<i>M. morphoeus peruana</i>	P4	-67,026	-0,205
SGC168	São Gabriel da Cachoeira, BI-1 (0°08'S;67°01'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P4	-67,016	-0,117

SGC169	São Gabriel da Cachoeira, BI-1 (0°08'S;67°01'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P4	-67,016	-0,117
SGC569	São Gabriel da Cachoeira, T.I. médio Rio Negro, Arabo (0°14'S;66°51'W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P4	-66,851	-0,2145
AMZ 299	Rio Cuiuni, margem direita, Barcelos (00°47'43"S,63°09'53"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P4	-63,164	-0,7976
INPA A 2020	Parque Nacional do Jaú; margem direita Rio Jaú, "trilha do Nazaré"	<i>M. morphoeus peruana</i>	P5	-61,814	-1,9698
AMZ 106	Novo Airão, Igarapé-Açu (02°51'13"S,60°51'05"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P5	-60,941	-2,4163
AMZ 317	Rio Cuiuni, margem direita, Barcelos (00°47'43"S,63°09'53"W)	<i>M. morphoeus peruana</i>	P5	-62,93	-0,8569
LSUMZ 27879	79km WNW Contamana, 7o 8' S, 75o 41' W	<i>Monasa flavirostris</i>	F2	-75,476	-7,1333
LSUMZ 27602	79 km WNW Contamana, 7o 8' S, 75o 41' W	<i>Monasa flavirostris</i>	F2	-75,476	-7,1333
LSUMZ 7155	Quebrada Oran,ca. 5km N Rio Amazonas, 85km N Iquitos	<i>Monasa flavirostris</i>	F2	-73,228	-3,7888
LSUMZ 7156	Quebrada Oran,ca. 5km N Rio Amazonas, 85km NE Iquitos	<i>Monasa flavirostris</i>	F2	-73,228	-3,7888
LSUMZ 7015	Quebrada Oran,ca. 5km N Rio Amazonas, 85km NE Iquitos	<i>Monasa flavirostris</i>	F2	-73,228	-3,7888
FMNH 433247	Peru, Cuzco, Consuelo, 15.9 km SW Pilcopata	<i>Monasa flavirostris</i>	F1	-71,483	-13,017
FMNH 433248	Peru, Madre de Dios, Moskitania, 13.4 km NW Atalaya, I bank Alto Madre de Dios	<i>Monasa flavirostris</i>	F1	-71,383	-12,767
FMNH 433251	Peru, Madre de Dios, Moskitania, 13.4 km NW Atalaya, I bank Alto Madre de Dios	<i>Monasa flavirostris</i>	F1	-71,383	-12,767
FMNH 433249	Peru, Paucartambo, Consuelo, 15.9 km SW Pilcopata	<i>Monasa flavirostris</i>	F1	-71,483	-13,017
FMNH 433250	Peru, Paucartambo, Consuelo, 15.9 km SW Pilcopata	<i>Monasa flavirostris</i>	F1	-71,483	-13,017
A1423	AM: médio Rio Moaco; margem direita; 260 Km W Pauini	<i>Monasa flavirostris</i>	F1	-69,401	-7,3676
INPA A 1021	Brasil, RR, ESEC Niquiá, margem direita do Rio Branco, localidade "Palhal"	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-62,038	0,81333
CN 480	Alenquer, ESEC Grão-Pará (00°09'S;55°11'W)	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-54,69	-1,5818
INPA A 8298	Margem esquerda do Rio Branco; ca 30 km S Caracará	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-61,254	1,57389
INPA A 8299	Margem esquerda do Rio Branco; ca 30 km S Caracará	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-61,254	1,57389
ORX 70	Faro, Vila Maracanã, Rio Xingu (02°04'71,7"S;56°37'16,1"W)	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-56,635	-2,1748

A 981	Parque Nacional Viruá, margem direita do Rio Anauá, 95 km S de Caracará, localidade "Campinho"	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-61,188	1,11028
ORX 442	Urucará, Lago Marajatuba (02°22'18"S;57°38'17,4"W)	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-57,777	-2,4053
CN 111	FLOTA de Faro, ca 70 km NW de Faro (01°42'S;57°12'W)	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-56,766	-1,9552
CN 06	FLOTA de Faro, ca 70 km NW de Faro (01°42'S;57°12'W)	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-56,766	-1,9552
CN 32	FLOTA de Faro, ca 70 km NW de Faro (01°42'S;57°12'W)	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-56,766	-1,9552
MPDS 0560	RR, Mun. Mucajaí - região da Vila Tamandaré, Sítio João Lucas (02°35'N-61°00'W)	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-60,92	2,43343
MPDS 0349	RR, Mun. Alto Alegre - Faz. Paraense (02°41'N-61°16'W) - Terra Firme e Savana	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-61,493	2,91493
21864	Guyana, State Or province	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-59,365	4,97852
21852	Guyana	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-59,365	4,97852
627396	Guyana, Kusad Mountain, NE Flank, South Rupununi, Savannah	<i>Monasa atra</i>	<i>atra</i>	-60,429	7,35124
BR163-105	Altamira, 30 km SW Castelo dos Sonhos, Fazenda Jamanxin (8o24'54,9"S,55o19'20,2"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-55,322	-9,4153
BR163-95	Altamira, 30 km SW Castelo dos Sonhos, Fazenda Jamanxin (8o24'54,9"S,55o19'20,2"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-55,322	-9,4153
MOP 044	Ourilandia do Norte, Serra do Puma	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-51,059	-6,9597
MPDS 1131	Guadalupe, Mata do Jegue (6°45'08,8"S;43°38'23,4"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-43,64	-6,75
MPDS 1132	Guadalupe, Mata do Jegue (6°45'08,8"S;43°38'23,4"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-43,64	-6,75
MPDS 0839	São João dos Patos, Povoado Jatobá dos Noletos, Serra da Raposa (6°36'029"S;43°36'51"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-43,618	-6,6087
MPDS 0840	São João dos Patos, Povoado Jatobá dos Noletos, Serra da Raposa (6°36'029"S;43°36'51"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-43,618	-6,6087
MPDS 0841	São João dos Patos, Povoado Jatobá dos Noletos, Serra da Raposa (6°36'029"S;43°36'51"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-43,618	-6,6087
432	Fazenda Pouso Alegre, Rio das Almas, Montes claros de Goiás, 15°50'50''S 51°39'28''W	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-51,658	-1,5847
B4084	Brasil, Minas Gerais, Araguari UHE Amador Aguiar I	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-48,013	-18,471
MNT 0693	Brasil, Tocantins, Presidente Kennedy	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-48,484	-8,3189

MNT 1243	Brasil, Pará, Novo progresso, Serra do cachimbo, Base da Aeronautica	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-55,173	-8,9222
JAT(C) 035	Jacareacanga, margem direita Rio Tapajós, Comunidade São Martim (06°06'31,76"S;57°36'49,88"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-57,612	-6,1116
JAT(C) 036	Jacareacanga, margem direita Rio Tapajós, Comunidade São Martim (06°06'31,76"S;57°36'49,88"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-57,612	-6,1116
URC 0206	PI: Mun.Uruçuí; Vale do Rio Pratinha	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-44,419	-7,1806
URC 0207	PI: Mun.Uruçuí; Vale do Rio Pratinha	<i>Monasa nigrifrons</i>	N1	-44,419	-7,1806
JAP 302	Japurá, Rio Mapari (02°02'59,6"S;67°15'47,1"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-67,263	-2,0499
JAP 305	Japurá, Rio Mapari (02°02'59,6"S;67°15'47,1"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-67,263	-2,0499
UFAC 1303	Porto Acre, AC 010 linha 07, Reserva Humaitá (09°45'47,8"S;67°36'32,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-67,609	-9,7633
UFAC 1652	Senador Guiomard, Br 364 km 80, Ramal Oco do Mundo km 16 (9°50'12,2"S;67°10'18,5"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-67,609	-9,8367
UFAC 1715	Capixaba, Br 317 km 164, Ramal da Gameleira km 04 (10°38'12,6"S;67°48'55,8"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-67,816	-10,637
AMZ 74	Novo Airão, Igarapé-Açu (02°51'13"S,60°51'05"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-60,85	-2,8503
AMZ 083	Novo Airão, Igarapé-Açu (02o51'13"S,60o51'05"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-60,85	-2,8503
PUC 074	Tefé, Base Petrobras/Uruçu, Igarapé Lontra (04° 52'S, 65° 07'W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-65,117	-4,8667
UFAC 575	Bujari, Floresta Estadual do Antimary, Limoeiro (09°21'09,0"S,68°05'40,2"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-68,095	-9,3525
MPDS 741	Humaitá, T. Indígena Parintintin, Aldeia Traíra-Bacupaí (7°33'S, 62°34'W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-62,567	-7,55
MPDS 742	Humaitá, T. Indígena Parintintin, Aldeia Traíra-Bacupaí (7°33'S, 62°34'W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-62,567	-7,55
UFAC 1014	Porto Walter, Igarapé Cruzeiro do Vale, Colônia Dois Portos (08°20'35,7"S;72°36'19,7"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-8,3431	-72,605
ESEC 009	ESEC Rio Acre, Acampamento 1 (11°03'05.2"S, 70°12'59"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-70,216	-11,051
JAP 542	Japurá, Rio Acanauí (01°56'12,4"S;66°36'18,8"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-66,605	-1,9367
UFAC 1853	Feijó, Rio Envira, Novo Porto, Foz do Ig. Paraná do Ouro (8°27'35,5"S;70°33'22,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-70,556	-8,4597
TLP(B) 202	Paranaíta, Rio Teles Pires, margem direita (09°29'113"S;56°28'355"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-56,476	-9,4864
TLP(A) 276	Paranaíta, Rio Teles Pires (09°24'0,05"S;56°33'53,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-56,565	-9,4
MAD 185	Humaitá, São Salvador, margem oeste Rio Madeira (06°44'04,4"S;62°21'07,6"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-62,352	-6,7344

AMA 109	Tabatinga, margem norte Rio Solimões, Teresina (04°21'39,8"S;69°45'39,5)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-69,761	-4,3608
AMA 168	Tabatinga, margem sul Rio Solimões, Teresina (04°24'54,9"S;69°44'21,7)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-69,739	-4,415
AMA 471	Estirão do Equador, Atalaia do Norte (04°29'12,1"S;71°33'02,3"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-71,551	-4,4867
AMA 472	Estirão do Equador, Atalaia do Norte (04°29'12,1"S;71°33'02,3"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-71,551	-4,4867
AMA 473	Estirão do Equador, Atalaia do Norte (04°29'12,1"S;71°33'02,3"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-71,551	-4,4867
ORX 441	AM; Mun. Urucará; Lago Marajatuba; Vila Marajatuba (2° 22' 18,0" S 57° 38' 17,4" W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-57,638	-2,3717
OM 277	Machadinho D'Oeste, margem direita Rio Jiparaná (08°54'32,9"S;62°0'0,03"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-62	-8,9283
OM 329	Machadinho D'Oeste, margem esquerda Rio Jiparaná (08°55'42"S;62°04'39"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-62,078	-8,9117
MAD 206	Manicoré, Maloca do Baeta, margem oeste Rio Madeira (06°11'20,8"S;62°11'24,5"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-62,19	-6,1889
MAD 265	Mancoré, Democracia, margem leste Rio Madeira (05°48'26,7"S;61°25'20,2"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,422	-5,8072
MAD 266	Mancoré, Democracia, margem leste Rio Madeira (05°48'26,7"S;61°25'20,2"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,422	-5,8072
MAD 290	Mancoré, Ribamar, margem leste Rio Madeira (05°36'46,5"S;61°07'17,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,121	-5,6128
MAD 296	Mancoré, Ribamar, margem leste Rio Madeira (05°36'46,5"S;61°07'17,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,121	-5,6128
MAD 307	Mancoré, Ribamar, margem leste Rio Madeira (05°36'46,5"S;61°07'17,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,121	-5,6128
MAD 308	Mancoré, Ribamar, margem leste Rio Madeira (05°36'46,5"S;61°07'17,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,121	-5,6128
MAD 309	Mancoré, Ribamar, margem leste Rio Madeira (05°36'46,5"S;61°07'17,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,121	-5,6128
MAD 310	Mancoré, Ribamar, margem leste Rio Madeira (05°36'46,5"S;61°07'17,9"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-61,121	-5,6128
AMZ 569	Nova Bandeirantes, margem direita Rio Juruena, Fazenda Geripá (10°22'57"S;58°19'36"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-58,327	-10,383
AMZ 538	Nova Bandeirantes, margem direita Rio Juruena, Fazenda Geripá (10°22'57"S;58°19'36"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-58,327	-10,383
INPA A 4723	AM; Novo Airão, Parque Nacional do Jaú, Ilha fluvial, Ilha Panema	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-60,967	-2,5808
INPA A 8335	RR; Margem direita do rio Branco próximo a foz do rio Maú; ca 180 km S Caracará	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-56,304	-0,3428
INPA A 8336	RR; Margem direita do rio Branco próximo a foz do rio Maú; ca 180 km S Caracará	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-56,304	-0,3428
INPA A 10578	AM, Parque nacional do Jaú; rio Negro; ilha das Onças	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-65,88	-1,5594
INPA A 10582	AM, Parque nacional do Jaú; rio Negro; ilha das Onças	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-65,88	-1,5594
INPA A 5607	Rio Branco, margem direita Niquiá	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	61,34450	1,11450

B3387	Brasil, Mato grosso, Retiro Novo	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-56,304	-16,367
JAT(C) 157	Itaituba, Jatobá, margem esquerda Rio Tapajós(05°04'23,07"S;56°51'21,24"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-56,856	-5,0731
JAT(A) 046	Jacareacanga, margem esquerda Rio Tapajós, Vila Mamãe-anã (05°45'31,5"S;57°24'45,8"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-57,413	-5,7586
JAT(B) 179	Itaituba, margem direita Rio Tapajós, Comunidade Penedo	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-57,083	-5,4504
UFAC 835	Rio Branco, Transacreana (AC-090) km 70, Ramal Jarinal km 11 (09°54'02,1"S,68°28'32,1"W)	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-68,476	-9,9006
LSUMZ 37667	Ca 126km ENE San Jose de Chiquitos, 17 degrees 20' S, 59 degrees 41' W	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-59,686	-16,796
LSUMZ 27465	NE bank upper Rio Cushabatay, 84 km WNW Contamana, 7o 9' S, 75o 44' W	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-75,74	-6,7573
LSUMZ 37620	Mina don Mario, 126 km ENE San Jose de Chiquitos, 17 degrees 20'S, 59 degrees 41'W	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-59,696	-17,332
FM 321039	Madre de dios, peru	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2	-72,572	-12,883
19392	Equador, Napo	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2		
21359	Equador, Napo	<i>Monasa nigrifrons</i>	N2		