



Pós-Graduação
ZOOLOGIA
MPEG/UFPA



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

JEFERSON COSTA CARNEIRO

FILOGENIA E HISTÓRIA BIOGEOGRÁFICA DO GRUPO *Callicebus moloch*
(PRIMATES, PITHECIIDAE)

BELÉM – PA

2015

JEFERSON COSTA CARNEIRO

**FILOGENIA E HISTÓRIA BIOGEOGRÁFICA DO GRUPO *Callicebus moloch*
(PRIMATES, PITHECIIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Zoologia do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Horacio Schneider.

Coorientador: Prof. Dr. José de Sousa e Silva Júnior.

BELÉM – PA

2015

JEFERSON COSTA CARNEIRO

FILOGENIA E HISTÓRIA BIOGEOGRÁFICA DO GRUPO *Callicebus moloch*

(PRIMATES, PITHECIDAEE)

Prof. Dr. Horacio Schneider (Orientador)

Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Alexandre Aleixo

Museu Paraense Emílio Goeldi

Prof. Dr. Anthony Brome Rylands

Conservation International, IUCN SSC Primate Specialist Group

Prof. Dra. Izeni Pires Farias

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Jean Philippe Boubli

University Salford

Prof. Dra. Teresa Cristina de Ávila-Pires

Museu Paraense Emílio Goeldi

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa de Pós-graduação da Universidade Federal do Pará em convênio com o Museu Paraense Emílio Goeldi, pela oportunidade do mestrado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Museu Paraense Emílio Goeldi e principalmente ao Campus Universitário de Bragança (UFPA) por toda estrutura concedida para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Horacio Schneider e Prof. Dr. José de Sousa e Silva Júnior (Cazuza), pelos ensinamentos e críticas construtivas.

Ao Centro de Primatas do Rio de Janeiro na pessoa do Dr. Alcides Pissinatti, assim como o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), o Museu Paraneze Emílio Goeldi (MPEG), e o banco de amostras de primatas do Campus de Bragança pelas amostras fornecidas para realização do estudo.

À Iracilda Sampaio e Horacio Schneider. Pessoas especiais que eu tive a sorte de encontrar pelos caminhos da vida. O que eu escrever aqui será demasiadamente pouco para agradecer o que estes dois seres humanos têm feito por mim, meu muito obrigado sempre!

E por fim, agradeço à minha família. Meus alicerces, meus pais (Claudionor Carneiro e Noemia F. Campelo), Bibi, também não me esqueci de você. Minha esposa, Simone S. Carneiro, companheira para todas as horas. E para finalizar realmente, os meus filhos que tanto amo (Eduarda, Vinícius e Emanuelle).

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	IV
Sumário.....	V
Lista de tabelas.....	VII
Lista de figuras.....	VIII
Resumo.....	XI
Abstract.....	XII

Capítulo I

1. Introdução geral.....	1
1.1. Sistemática do gênero <i>Callicebus</i> Thomas, 1903.....	1
1.2. Sistemática do grupo <i>Callicebus moloch</i>	4
1.3. Distribuição geográfica do grupo <i>C. moloch</i>	7
1.4. Hipóteses sobre a biodiversidade Amazônica.....	8
1.5. Áreas de endemismo do bioma Amazônico.....	10
1.6. Marcadores moleculares para reconstruções filogenéticas.....	11
1.6.1. DNA mitocondrial (mtDNA).....	12
1.6.2. SINEs e elementos <i>Alu</i>	13
1.7. Referências bibliográficas.....	14

Capítulo II

Resumo.....	23
Abstract.....	24
2.1. Introdução.....	25
2.2. Material e métodos.....	26
2.3. Resultados e discussão.....	27
2.4. Conclusão.....	29
2.5. Referências.....	29
Tabelas (artigo 1).....	34
Figuras (artigo 1).....	36

Capítulo III

Resumo.....	43
Abstract.....	44
3.1. Introdução.....	45
3.1.1. Modelos biogeográficos para diversificação na Amazônia.....	45

3.1.2. Taxonomia do grupo <i>Callicebus moloch</i>	46
3.1.3. Distribuição geográfica do grupo <i>C. moloch</i>	47
3.2. Material e métodos.....	48
3.2.1. Amostras e marcadores moleculares.....	48
3.2. 2. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA.....	48
3.2.3. Alinhamento das sequências, análises filogenéticas.....	49
3.2.4. Delimitação de espécies.....	50
3.2.5. Árvore de espécie, tempo de divergência e análises biogeográficas.....	51
3.3. Resultados.....	53
3.3.1. Banco de dados, dados faltantes e saturação.....	53
3.3.2. Análises filogenéticas e divergência genética.....	54
3.3.3. Delimitação de espécies.....	54
3.3.4. Árvore de espécies e tempo de divergência.....	55
3.3.5. Análises biogeográficas.....	55
3.4. Discussão.....	56
3.4.1. Teste da hipótese dos rios amazônicos formados durante o Pleistoceno	56
3.4. 2. Quantos e quais grupos de espécies para <i>Callicebus</i> ?.....	58
3.4.3. Cenário biogeográfico e origem do grupo <i>C. moloch</i>	59
3.4.4. Conservação.....	61
3.5. Conclusão.....	62
3.6. Referências.....	62
Tabelas (artigo 2).....	72
Figuras (artigo 2).....	85

Lista de Tabelas

Introdução Geral

Tabela 1. Arranjos taxonômicos para o gênero *Callicebus* propostos por HERSHKOVITZ (1963; 1988; 1990); KOBAYASHI (1995); KOBAYASHI; LANGGUTH (1999); VAN ROOSMALEN et al. (2002) ; GROVES (2005); SILVA JÚNIOR et al., (2007).

Capítulo II

Tabela 1. Classificação taxonômica do gênero *Callicebus* (Groves, 2001; Silva Júnior et al., 2007).

Tabela 2. Marcadores moleculares utilizados neste estudo.

Capítulo III

Tabela 1. Classificação taxonômica do gênero *Callicebus* (Groves, 2005; Silva Júnior et al., 2007).

Tabela 2. Lista das amostras utilizadas neste estudo e suas respectivas procedências, coordenadas e localidade. Amostras com coordenada ou localidade desconhecidas estão em branco.

Tabela 3. Tempo de divergência entre táxons amazônicos do gênero *Callicebus* e os rios que os separam.

Tabela S1. Lista dos primers utilizados neste estudo.

Tabela S2. Esquema de particionamento do banco de dados testado no PartitionFinder.

Tabela S3. Lista das amostras sequenciadas para cada marcador.

Tabela S4. Distância genética entre os grupos de espécies do gênero *Callicebus*.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. As espécies do grupo *C. moloch*. Autorizado por Stephen Nash.

Figura 2. Filogenia dos grupos *C. moloch* e *C. personatus*. Figura retirada de KOBAYASHI (1995).

Figura 3. A distribuição geográfica do grupo *Callicebus moloch* (IUCN, 2014; GUALDABARROS et al., 2012; DALPONTE et al., 2014).

Figura 4. Hipótese de áreas de endemismo para o bioma Amazônico. Ilustração modificada de SMITH et al. (2014).

Capítulo II

Fig. 1 Distribuição geográfica dos grupos de espécies do gênero *Callicebus*.

Fig. 2 Dois tamanhos de fragmentos amplificados com os mesmos *primers*, devido à presença ou ausência de um elemento *Alu*.

Fig. 3 Gel de agarose com os fragmentos da inserção *Alu* *Callicebus4* em 14 espécies do gênero *Callicebus*.

Capítulo III

Figura 1. Distribuição do grupo *C. moloch* (IUCN, 2015; Dalponte, 2014).

Figura 2. Localização das amostras utilizadas neste estudo.

Figura 3. Filogenia do grupo *C. moloch*: a) Análise de máxima verossimilhança e b) Inferência bayesiana. Os valores de *bootstrap* e probabilidade a posterior são mostrados nas respectivas árvores.

Figura 4. Análises de delimitação de espécie. Ao lado dos nós são mostradas as probabilidades posteriores com três cenários de tamanho populacional e tempo de divergência. Os asteriscos representam valores acima de 95%.

Figura 5. Árvore de espécies com estimativas de tempo de divergência. Os valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos nós e as barras azuis indicam os 95% HPD do tempo de divergência de cada nó.

Figura 6. Análise biogeográfica do gênero *Callicebus*. São mostrados na legenda as áreas ancestrais e suas respectivas cores. Circunferências nos nós da árvore indicam a área ancestral, circunferências na cor preta indicam pequena resolução no nó. Método S-DIVA.

Figura S1. Filogenia do gênero *Callicebus*. Os clados coloridos mostrados serviram de base para as árvores guias nos testes de delimitação de espécies.

A dissertação está organizada em três capítulos. O primeiro é a introdução geral do tema de estudo. O segundo trata das relações filogenéticas entre os grupos de espécies do gênero *Callicebus* e as implicações biogeográficas, na forma de um artigo a ser submetido à revista *Primates*. O terceiro capítulo também é um artigo e será submetido à revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*. No terceiro capítulo investigamos as relações filogenéticas do grupo *Callicebus moloch*, inferimos a história biogeográfica do grupo e relacionamos os achados com os eventos biogeográficos que atuaram na formação da biodiversidade Amazônica atual. A introdução geral foi formatada segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Ao final dos capítulos que serão submetidos à publicação, estão em anexo as normas das revistas mencionadas acima.

RESUMO

Callicebus é um gênero de primata neotropical pertencente à família Pitheciidae, atualmente com 32 espécies reconhecidas. Estas espécies estão organizadas em grupos supraespecíficos, sendo dois subgêneros (*Torquatus* e *Callicebus*) e cinco grupos de espécies: *C. torquatus*, *C. moloch*, *C. cupreus*, *C. donacophilus* e *C. personatus*. A organização dos grupos foi realizada com base em dados morfológicos e de distribuição geográfica. Nesta dissertação de mestrado, fizemos inferências a partir de dados moleculares. No primeiro capítulo, apresentamos uma introdução geral sobre a problemática taxonômica de *Callicebus*. No segundo capítulo realizamos inferências filogenéticas com base na presença e ausência de uma região molecular conhecida como elemento *Alu*, um transposon do genoma de primatas. Com base na análise desses marcadores *Alu*, descobrimos que os grupos *C. moloch* e *C. cupreus* são estreitamente relacionados e que *C. torquatus* é o grupo basal no gênero. No terceiro capítulo, a partir de uma abordagem multilocus investigamos as relações filogenéticas do grupo *C. moloch* e aplicamos o tempo de diversificação entre as espécies para testar a hipótese de formação das bacias hidrográficas da Amazônia durante o Plio-Pleistoceno. Nossos resultados corroboram a hipótese de formação dos rios amazônicos nos últimos 3 Ma. No entanto, nem todos os eventos de diversificação em *Callicebus* podem ser explicados pela teoria dos rios. Além disto, verificamos que os diferentes grupos de espécies de *Callicebus* são todos derivados de radiações na região Amazônica em diferentes momentos durante o Mioceno superior. Nossos resultados também sugerem que o conhecimento atual da diversidade de *Callicebus* está subestimado, e que espécies que diversificaram recentemente estão negligenciadas taxonomicamente.

ABSTRACT

Callicebus is a genus of Neotropical primate of the family Pitheciidae. Thirty-two species are currently recognized. They are classified in two subgenera, *Torquatus* and *Callicebus*, and five species groups: *C. torquatus*, *C. moloch*, *C. cupreus*, *C. donacophilus* and *C. personatus*. The arrangement of subgenera and groups is based on morphology and geographic distributions. The first section, we is introduction to the taxonomy of *Callicebus*. In the second section, I present an article for submission to the journal *Primates* concerning the chapter presence or absence of a molecular region known as an *Alu* element. An *Alu* element is a transposon in the genome of primates. Because of this particular characteristic of *Alu* insertion, I discovered that the *C. moloch* and *C. cupreus* groups are closely related and that *C. torquatus* is the basal group in the genus. In the third section, from a multilocus approach I investigated the phylogenetic relationships of the *C. moloch* group and the time of diversification between the species, in order to test the hypothesis of formation of the Amazon River basin during the Plio-Pleistocene. Our results support the hypothesis of origin of Amazonian rivers in the last 3 Ma. However, not all diversification events in *Callicebus* can be explained by the theory of rivers. The results also indicate that the different species groups are derived from a radiation in the Amazonian region at different times during the upper Miocene. The phylogenetic analysis identified a number of potential taxa that a number of taxa which the current knowledge of species diversity in *Callicebus* is underestimated, and that recently diversified species are taxonomically neglected.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Sistemática do Gênero *Callicebus* Thomas, 1903

O gênero *Callicebus* foi proposto por THOMAS (1903) para abrigar as espécies de zogue-zogues até então alocadas dentro de outros gêneros de primatas do Novo Mundo, como *Callithrix* e *Saguinus*. *Callicebus* é um gênero integrante da Parvordem Platyrrhini, e sua posição filogenética com relação aos demais gêneros de Platyrrhini foi tema de discussão desde meados do século XX. HERSHKOVITZ (1963) considerou *Callicebus* como um membro da família Cebidae, mas autores subsequentes (ROSENBERGER, 1981) obtiveram resultados discordantes daqueles de HERSHKOVITZ (1963) sobre o posicionamento de *Callicebus*. ROSENBERGER (1981) considera *Callicebus* o grupo irmão de *Aotus*, e estes estariam filogeneticamente ligados aos Pitheciidae. FORD (1986) corroborou os resultados de ROSENBERGER (1981) acerca do estreito relacionamento entre *Callicebus* e *Aotus*, considerando-os, entretanto, como um clado basal em relação aos demais Platyrrhini. KAY (1990) também considerou *Callicebus* como o clado mais basal entre os Platyrrhini. Com o advento dos primeiros estudos que utilizaram sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) para reconstruir a filogenia dos Platyrrhini, *Callicebus* foi alocado na família Pitheciidae, sendo considerado como o táxon basal da família, na subfamília Callicebinae (SCHNEIDER et al., 1993; 1996; 2000; HARADA et al., 1995; GOODMAN et al., 1998).

Um dos primeiros estudos a propor uma organização infragenérica para *Callicebus* foi o de HERSHKOVITZ (1963). Hershkovitz analisou 100 espécimes de museus, e reconheceu a validade de três espécies. Posteriormente, com acesso a 1.200 espécimes de diversas coleções científicas, HERSHKOVITZ (1988; 1990) aumentou substancialmente o seu conhecimento sobre a diversidade do gênero, e reconheceu 13 espécies 16 táxons terminais. Elas foram organizadas em grupos de espécies, de acordo com suas semelhanças morfológicas. Os pesquisadores que realizaram revisões posteriores mantiveram a organização das espécies em grupos com auterações no número de grupos e número de táxons dos mesmos (GROVES 2001; 2005; VAN ROOSMALEN et 2002; SILVA JÚNIOR et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Arranjos taxonômicos para o gênero *Callicebus* propostos por HERSHKOVITZ (1963¹, 1988, 1990), KOBAYASHI (1995) e KOBAYASHI & LANGGUTH (1999), VAN ROOSMALEN et al. (2002), GROVES (2005) e SILVA JÚNIOR et al. (2007).

HERSHKOVITZ (1963) ¹	HERSHKOVITZ (1988, 1990)	KOBAYASHI (1995); KOBAYASHI; LANGGUTH (1999)	VAN ROOSMALEN et al. (2002)	GROVES (2001, 2005)	SILVA JUNIOR et al. (2007)
	Grupo <i>Callicebus modestus</i>			Subgênero <i>Callicebus</i> Grupo <i>Callicebus modestus</i>	Subgênero <i>Callicebus</i>
-----	<i>C. modestus</i>			<i>C. modestus</i>	
	Grupo <i>Callicebus donacophilus</i>	Grupo <i>Callicebus donacophilus</i>	Grupo <i>Callicebus donacophilus</i>	Grupo <i>Callicebus donacophilus</i>	Grupo <i>Callicebus donacophilus</i>
<i>C. moloch donacophilus</i>		<i>C. modestus</i>	<i>C. modestus</i>		<i>C. modestus</i>
-----	<i>C. d. donacophilus</i>	<i>C. d. donacophilus</i>	<i>C. donacophilus</i>	<i>C. donacophilus</i>	<i>C. donacophilus</i>
-----	<i>C. d. pallescens</i>	<i>C. d. pallescens</i>	<i>C. pallescens</i>	<i>C. pallescens</i>	<i>C. pallescens</i>
-----	<i>C. oenanthe</i>		<i>C. oenanthe</i>	<i>C. oenanthe</i>	<i>C. oenanthe</i>
-----	<i>C. olallae</i>	<i>C. olallae</i>	<i>C. olallae</i>	<i>C. olallae</i>	<i>C. olallae</i>
	Grupo <i>Callicebus moloch</i>	Grupo <i>Callicebus moloch</i>	Grupo <i>Callicebus moloch</i>	Grupo <i>Callicebus moloch</i>	Grupo <i>Callicebus moloch</i>
<i>C. m. moloch</i>	<i>C. moloch</i>	<i>C. moloch</i>	<i>C. moloch</i>	<i>C. moloch</i>	<i>C. moloch</i>
-----	<i>C. cinerascens</i>	<i>C. cinerascens</i>	<i>C. cinerascens</i>	<i>C. cinerascens</i>	<i>C. cinerascens</i>
<i>C. m. cupreus</i>	<i>C. cupreus cupreus</i>	<i>C. brunneus</i>	<i>C. brunneus</i>	<i>C. brunneus</i>	<i>C. brunneus</i>
<i>C. m. discolor</i>	<i>C. c. discolor</i>	<i>C. hoffmannsi hoffmannsi</i>	<i>C. hoffmannsi</i>	<i>C. hoffmannsi</i>	<i>C. hoffmannsi</i>
<i>C. m. ornatus</i>	<i>C. c. ornatus</i>	<i>C. h. baptista</i>	<i>C. baptista</i>	<i>C. baptista</i>	<i>C. baptista</i>
-----	<i>C. caligatus</i>	-----	<i>C. bernhardi</i>	<i>C. bernhardi</i>	<i>C. bernhardi</i>
<i>C. m. brunneus</i>	<i>C. brunneus</i>	-----	-----	-----	-----
<i>C. m. hoffmannsi</i>	<i>C. hoffmannsi hoffmannsi</i>	-----	-----	-----	-----
-----	<i>C. h. baptista</i>	-----	-----	-----	-----
-----	<i>C. dubius</i>	-----	-----	-----	-----
(<i>C. personatus</i>)	<i>C. personatus personatus</i>	-----	-----	-----	-----
-----	<i>C. p. melanochir</i>	-----	-----	-----	-----
-----	<i>C. p. nigrifrons</i>	-----	-----	-----	-----

	<i>C. p. barbarabrownae</i>				
		Grupo Callicebus cupreus	Grupo Callicebus cupreus	Grupo Callicebus cupreus	Grupo Callicebus cupreus
		<i>C. c. cupreus</i>	<i>C. cupreus</i>	<i>C. cupreus</i>	<i>C. cupreus</i>
		<i>C. c. discolor</i>	<i>C. caligatus</i>	<i>C. caligatus</i>	<i>C. caligatus</i>
		<i>C. ornatus</i>	<i>C. discolor</i>	<i>C. discolor</i>	<i>C. discolor</i>
			<i>C. ornatus</i>	<i>C. ornatus</i>	<i>C. ornatus</i>
			<i>C. dubius</i>	<i>C. dubius</i>	<i>C. dubius</i>
			<i>C. stephennashi</i>	<i>C. stephennashi</i>	<i>C. stephennashi</i>
					<i>C. aureipalatii</i>
		Grupo Callicebus personatus	Grupo Callicebus personatus	Grupo Callicebus personatus	Grupo Callicebus personatus
		<i>C. personatus</i>	<i>C. personatus</i>	<i>C. personatus</i>	<i>C. personatus</i>
		<i>C. melanochir</i>	<i>C. melanochir</i>	<i>C. melanochir</i>	<i>C. melanochir</i>
		<i>C. nigrifrons</i>	<i>C. nigrifrons</i>	<i>C. nigrifrons</i>	<i>C. nigrifrons</i>
		<i>C. barbarabrownae</i>	<i>C. barbarabrownae</i>	<i>C. barbarabrownae</i>	<i>C. barbarabrownae</i>
		<i>C. coimbrai</i>	<i>C. coimbrai</i>	<i>C. coimbrai</i>	<i>C. coimbrai</i>
				Subgênero Torquatus	Subgênero Torquatus
	Grupo Callicebus torquatus	Grupo Callicebus torquatus	Grupo Callicebus torquatus	Grupo Callicebus torquatus	Grupo Callicebus torquatus
<i>C. torquatus torquatus</i>	<i>C. t. torquatus</i>	<i>C. t. torquatus</i>	<i>C. torquatus</i>	<i>C. torquatus</i>	<i>C. torquatus</i>
<i>C. t. lugens</i>	<i>C. t. lugens</i>	<i>C. t. lugens</i>	<i>C. lugens</i>	<i>C. lugens</i>	<i>C. lugens</i>
	<i>C. t. lucifer</i>	<i>C. t. lucifer</i>	<i>C. lucifer</i>	<i>C. lucifer</i>	<i>C. lucifer</i>
	<i>C. t. purinus</i>	<i>C. t. purinus</i>	<i>C. purinus</i>	<i>C. purinus</i>	<i>C. purinus</i>
	<i>C. t. regulus</i>	<i>C. t. regulus</i>	<i>C. regulus</i>	<i>C. regulus</i>	<i>C. regulus</i>
<i>C. t. medemi</i>	<i>C. t. medemi</i>	<i>C. t. medemi</i>	<i>C. medemi</i>	<i>C. medemi</i>	<i>C. medemi</i>

¹ Hershkovitz (1963) tratou somente das formas das bacias do Orinoco e Amazonas.

O gênero *Callicebus*, outrora integrado por três espécies (HERSHKOVITZ, 1963), atualmente é composto por 32: as 29 espécies reconhecidas por Silva-Júnior et al. (2007) (Tabela 1), mais três espécies recém-descritas *C. caquetensis*, *C. vieirai* e *C. miltoni*. Este incremento no número de espécies válidas foi decorrente de dois motivos principais. Além da descoberta de espécies novas, a razão principal se encontra na utilização do conceito filogenético de espécie, que resultou na elevação de todas as subespécies à categoria de espécies plenas (VAN ROOSMALEN et al., 2002; RYLANDS et al., 2012).

Embora o conhecimento sobre a diversidade do gênero *Callicebus* tenha avançado nos últimos anos, muitas questões ainda permanecem obscuras, como as relações filogenéticas entre os grupos de espécies e as relações de parentesco dentro de cada grupo. GROVES (2001, 2005) concluiu que o grupo *C. torquatus* apresenta características morfológicas muito distintas das demais espécies, então propôs uma divisão do gênero *Callicebus* em dois subgêneros, i) subgênero *Torquatus* composto pelas espécies do grupo *C. torquatus*, e ii) subgênero *Callicebus* composto pelas espécies dos grupos *C. moloch*, *C. cupreus*, *C. donacophilus* e *C. personatus*. Este arranjo foi seguido por SILVA JÚNIOR et al. (2007).

1.2. Sistemática do grupo *Callicebus moloch*

HERSHKOVITZ (1988, 1990) identificou 14 táxons pertencentes ao grupo *C. moloch*. Posteriormente KOBAYASHI (1995), utilizando dados morfométricos do crânio, redefiniu o grupo, dividindo-o em três (Tabela 1). Separou as espécies da Mata Atlântica num novo grupo *C. personatus*, e retirou três formas do oeste da Amazônia num grupo *C. cupreus*. Assim o grupo *C. moloch* ficou reduzido a cinco táxons. Nas décadas seguintes foram descritas mais três espécies, e atualmente o grupo *C. moloch* é composto pelas seguintes espécies: *C. moloch* (Hoffmannsegg, 1807); *C. cinerascens* (Spix, 1823); *C. brunneus* (Wagner, 1842); *C. hoffmannsi* Thomas, 1908; *C. baptista* Lönnberg, 1939; *C. bernhardi* M. van Roosmalen, T. van Roosmalen & Mittermeier, 2002; *C. vieirai* Gualda-Barros, Nascimento & Kerr 2012, e *C. miltoni* Dalponte, Silva & Silva-Júnior, 2014 (Figura 1).

Estudos citogenéticos também têm contribuído ao conhecimento das relações filogenéticas de *Callicebus* (DE BOER, 1974; PIECZARKA; NAGAMACHI, 1988; MINEZAWA et al., 1989; BARROS et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; BONVICINO et al., 2003; NAGAMACHI et al., 2003). Há uma grande variação no número diplóide (2n) entre

espécies de grupos diferentes. Segundo DE BOER (1974) *C. donacophilus* possui $2n= 50$. BONVICINO et al. (2003) encontrou que *C. lugens* possui $2n= 16$. Esta grande diferença do número diploide é incomum para espécies do mesmo gênero. Dentro dos grupos há pequena ou nenhuma variação interespecífica no número diplóide (BARROS et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; NAGAMACHI et al., 2003). Até o momento, apenas duas espécies do grupo *C. moloch* (*C. moloch* e *C. brunneus*) possuem cariótipos descritos, ambos com $2n= 48$ cromossomos (PIECZARKA & NAGAMACHI, 1988; MINEZAWA et al., 1989).

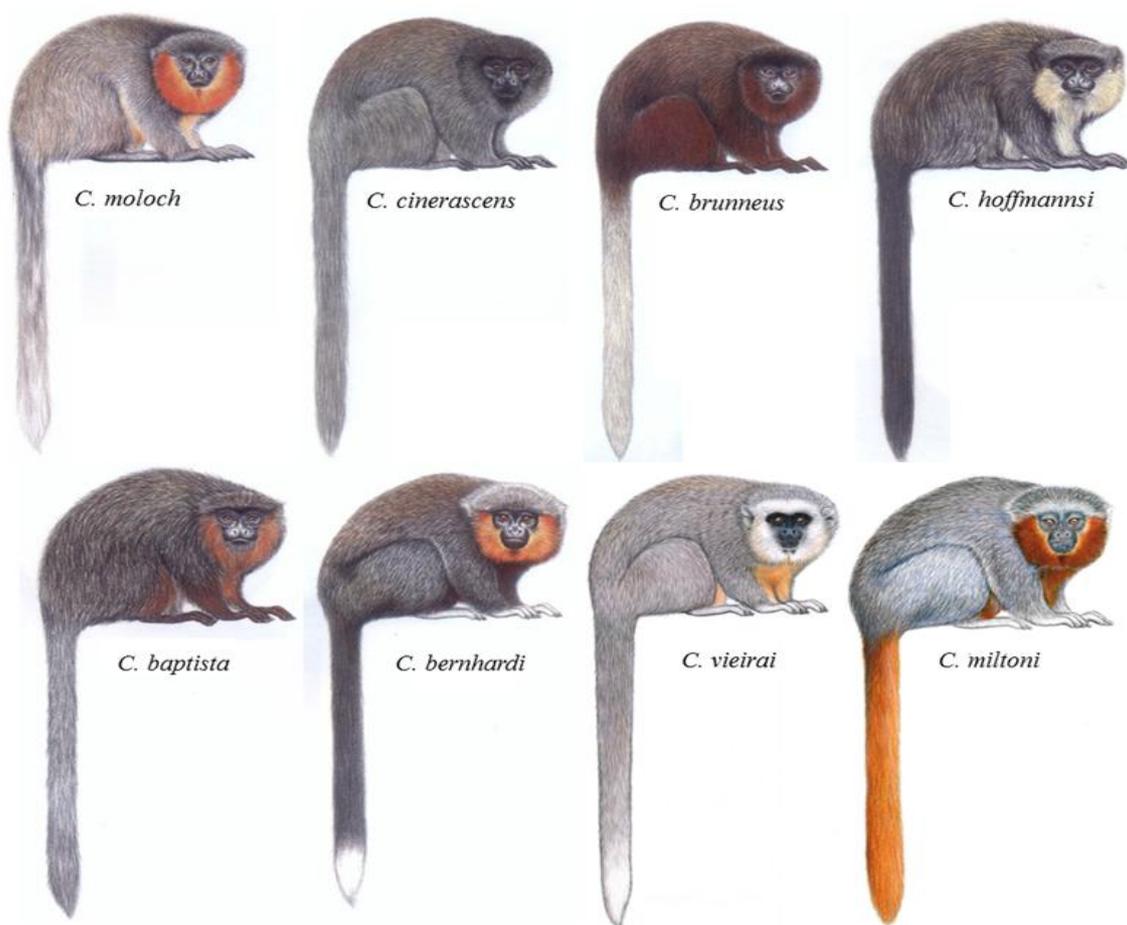


Figura 1. As espécies do grupo *C. moloch*. Autorizado por Stephen Nash.

O trabalho de KOBAYASHI (1995) é o único até o momento que propôs uma hipótese de relacionamento filogenético para o gênero *Callicebus* e as espécies dos atuais cinco grupos de espécies (Figura 2). O dendograma de KOBAYASHI (1995) baseado em medidas do crânio sugere que os grupos *C. torquatus* e *C. personatus* são táxons irmãos e que o grupo *C. moloch* e o táxon irmãos do clado onde encontram-se as espécies dos grupos *C. cupreus* e *C. donacophilus*. As relações dentro do grupo *C. moloch* são: (*C. cinerascens*, *C. moloch* (*C. brunneus*, (*C. h. hoffmannsi*, *C. h. baptista*))). Nosso estudo é o primeiro que investiga a filogenia do grupo a partir de dados moleculares.

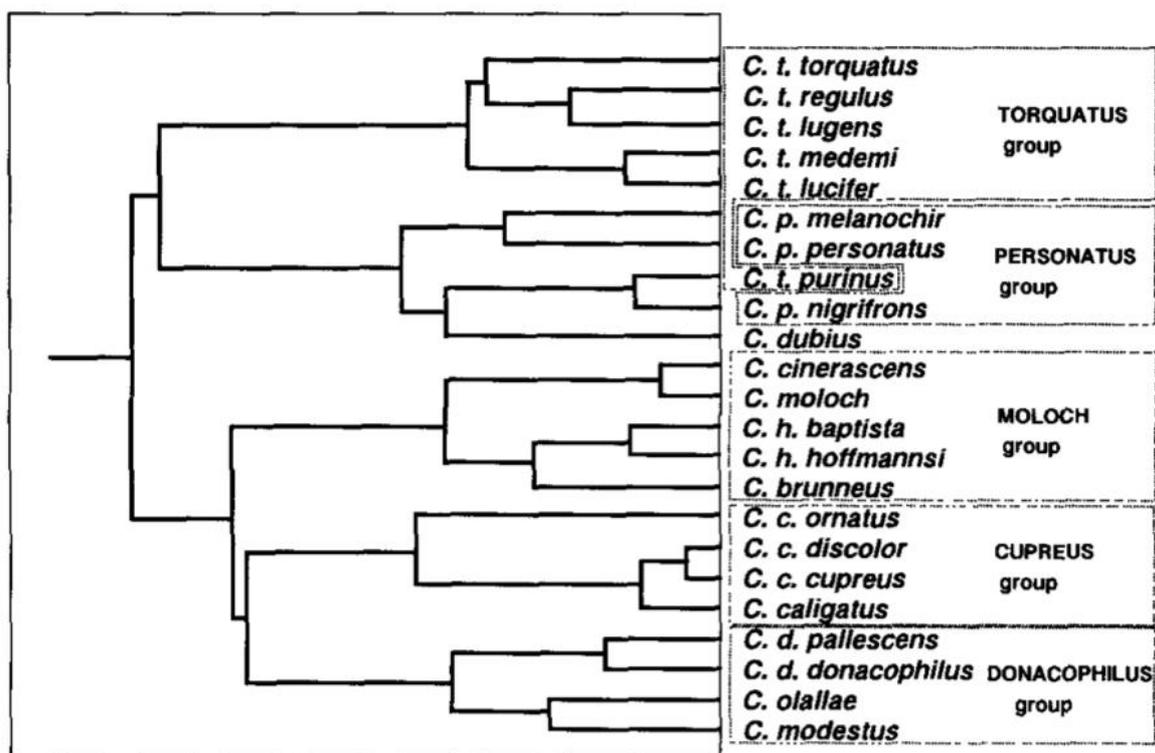


Figura 2. Filogenia do gênero *Callicebus*. Figura retirada de KOBAYASHI (1995).

1.3. Distribuição geográfica do grupo *C. moloch*

A maioria das espécies do gênero *Callicebus* habita florestas de terra firme (NORCONK, 2007). No período das cheias na Bacia Amazônica, áreas de várzeas em algumas regiões podem alcançar até 10 km de largura a partir das margens dos rios (VAN ROOSMALEN et al., 2002). Neste período, a disponibilidade de recursos nas áreas de várzeas é maior. Por isso, algumas espécies de *Callicebus* aventuram-se neste ambiente em busca de alimento (VAN ROOSMALEN et al., 2002). No entanto, é pequena a probabilidade destes primatas se deslocarem de uma margem para outra dos rios, os quais desempenham um papel relevante na atual distribuição das espécies amazônicas (NORCONK, 2007). As espécies do grupo *C. moloch* têm suas áreas de ocorrência aparentemente limitadas pelos principais rios da porção sul do bioma Amazônico (Figura 3).

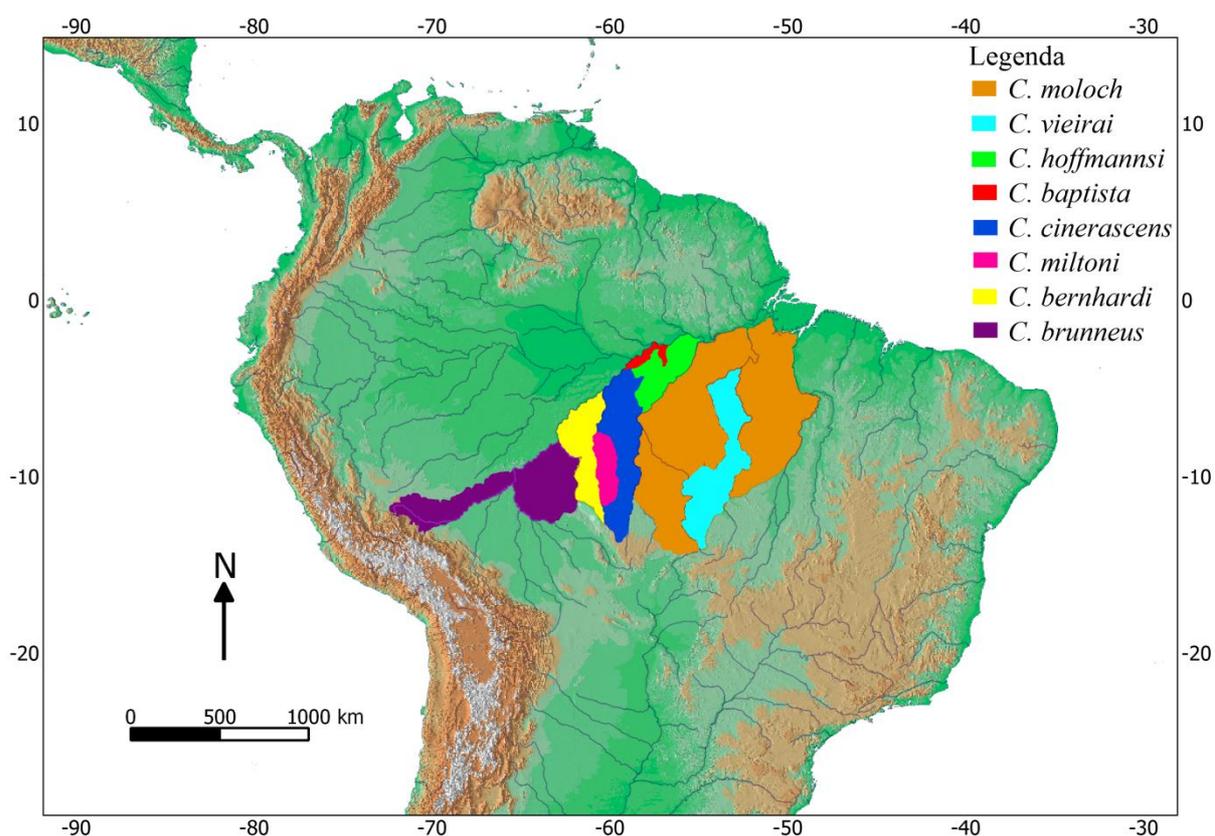


Figura 3. Distribuição geográfica do grupo *Callicebus moloch* (IUCN, 2014; GUALDA-BARROS et al., 2012; DALPONTE et al., 2014).

A distribuição geográfica do grupo *C. moloch* é alopátrica em relação aos outros grupos do gênero *Callicebus*. Dentro do grupo *C. moloch*, as espécies também estão aparentemente distribuídas alopatricamente, exceto *C. miltoni* e *C. cinerascens* que ocupam a mesma margem do rio Aripuanã. Contudo, os limites de distribuição de algumas espécies ainda não são bem conhecidos, como é o caso de *C. cinerascens* e *C. bernhardi* uma vez que existe deficiência de amostragem em diversas áreas. Estudos recentes por NORONHA et al. (2007), MONÇÃO et al. (2008), e SAMPAIO et al. (2012) têm promovido avanços significativos neste conhecimento, resultando em correções das presumidas distribuições geográficas de *C. cinerascens*, *C. bernhardi*

Callicebus moloch ocorre na região entre o rio Araguaia-Tocantins e o rio Tapajós (HERSHKOVITZ, 1990), exceto na região entre os rios Iriri e Xingu, que é ocupada por *C. vieirai* (GUALDA-BARROS et al., 2012). De acordo com GUALDA-BARROS et al. (2012), *C. vieirai* estende-se ao sul até a margem esquerda do rio Teles Pires. Os limites sul e sudeste, tanto de *C. moloch* quanto *C. vieirai* ainda não são conhecidos. *Callicebus hoffmannsi* ocorre entre os rios Tapajós e Abacaxis (HERSHKOVITZ, 1988, 1990; NORONHA et al., 2007), sendo limitada ao norte pelo Paraná do Urariá e Paraná do Ramos. De acordo com VAN ROOSMALEN et al. (2002), *C. baptista* tem uma distribuição disjunta. Ocorre na ilha Tupinambaranas, formada pelos rios Amazonas, Madeira, Canumã, os paranás do Urariá e do Ramos, com algumas populações ocorrendo ao sul do Paraná do Ramos, entre os rios Andirá e Uíra-Curupá. *C. cinerascens* ocorre entre no lado esquerdo do rio Aripuanã, e entre os rios Madeira, Abacaxis e Tapajós (NORONHA et al., 2007). Mais recentemente, SAMPAIO et al. (2012) estenderam a distribuição de *C. cinerascens* até a margem direita do rio Guaporé, deixando *C. bernhardi* e *C. brunneus* completamente isoladas das demais espécies do grupo; *C. bernhardi* ocorre entre os rios Roosevelt-Aripuanã e Jiparaná, sendo limitada ao norte pelo rio Madeira, e com limite sul ainda não determinado (HERSHKOVITZ, 1990). *Callicebus brunneus* ocorre entre os rios Madeira e Madre de Dios, Guaporé e Jiparaná. Possivelmente, o limite sul é a Serra dos Pacaás Novos; e *C. miltoni* ocupa a área entre os rios Roosevelt e Aripuanã (DALPONTE et al., 2014).

1.4. Hipóteses sobre a biodiversidade Amazônica

Por que a Amazônia é tão biodiversa? Esta questão intriga pesquisadores há centenas de anos. Naturalmente algumas hipóteses surgiram para tentar explicar os padrões de biodiversidade observados. As hipóteses estão associadas aos eventos de especiação ao longo

do tempo. Não restam dúvidas sobre o papel da especiação alopátrica, para a biodiversidade atual, desta forma a especiação alopátria conduz a grande maioria das hipóteses de biodiversidade. Contudo, os eventos de especiação ocorrem a partir de mudanças genéticas fixadas numa população e reforçadas principalmente por fatores ecológicos, evolução geológica e modificações no clima (BUSH, 1994). Dentre as principais hipóteses discutidas na literatura podemos citar: rios, refúgios, rio-refúgios, paleogeográfica, perturbação dos rios, hidrogeológica, estabilidade, perturbação intermediária, museu, densidade de dossel, perturbação-vicariância, pressão de predadores e gradientes ecológicos, (HAFFER; PRANCE, 2002; NORES, 1999; ENDLER, 1977; COLINVAUX, 1993). Para o escopo deste trabalho vamos detalhar as quatro primeiras teorias citadas acima.

WALLACE (1852) estudando primatas na Amazônia observou a influência dos rios como fatores limitantes da distribuição de algumas espécies de primatas, e a partir desta observação ele formulou a *hipótese dos rios*, posteriormente desenvolvida por SICK (1967) com base em estudos com aves. Segundo esta hipótese, populações ancestrais amplamente distribuídas pela bacia Amazônica foram fragmentadas pela formação dos rios, o que permitiu a especiação das populações que habitavam margens opostas.

HAFFER (1969) e VANZOLINI (1970) propuseram uma elegante explicação, conhecida como *hipótese dos refúgios*. Esta hipótese está associada aos ciclos de Milankovitch, responsáveis pelos períodos glaciais e interglaciais no planeta. Nos períodos glaciais o clima era mais seco e a floresta recuava para setores mais úmidos da Amazônia, os “refúgios”, estas áreas úmidas eram isolados por savanas. Este processo fragmentou populações que anteriormente estavam amplamente distribuídas, propiciando especiação alopátrica. Nos períodos interglaciais, o clima voltava a ser mais úmido e as florestas voltavam a expandir sua área e as espécies acompanhavam a expansão (HAFFER; PRANCE, 2002).

A *hipótese dos refúgios-rios*, proposta por AYRES & CLUTTON-BROCK (1992) combina as duas hipóteses anteriores. Segundo os autores as regiões das cabeceiras dos rios ficavam desflorestadas durante períodos de climas secos, semelhante as áreas de savanas, entretanto, a região central da Amazônia permanecia com vegetação de floresta e os baixos cursos dos rios seriam os responsáveis pela fragmentação das populações.

A *hipótese Paleográfica* pode ser dividida em três modelos: (a) modelos das ilhas; (b) modelo dos arcos; (c) modelo do lago.

O modelo de ilhas (NORES, 1999) propõe que em períodos de incursões marinhas, quando a água do mar atingiu níveis de aproximadamente 100 metros mais altos que os atuais, a floresta Amazônica tornou-se fragmentada em numerosas ilhas e arquipélagos, separando populações por tempo suficiente para a especiação. O modelo dos arcos (PATTON; SILVA, 2001) trata dos arcos estruturais como os que ligavam os escudos das Guianas e do Brasil, segundo os autores, os arcos seriam delimitações de sub-bacias geológicas, o que indicaria zonas ecológicas diferentes. O modelo do lago (MARROIG; CERQUEIRA, 1997; FRAILEY, 1988) postula que a Amazônia foi coberta por um grande lago, a floresta teria ficado restrita às regiões periféricas, com populações separadas em ilhas de florestas nas margens irregulares desse lago.

1.5. Áreas de endemismo do bioma Amazônico

Os fatores abióticos que levaram a grande biodiversidade Amazônica ainda são tema de intenso debate. Entretanto, é consenso que tais fatores modelaram a distribuição de diversos organismos no passado. Portanto, esperamos encontrar uma congruência entre as áreas de distribuição das espécies contemporâneas, das quais os ancestrais foram influenciados diretamente pelas mesmas mudanças no meio (SILVA, 2005). Esta congruência geográfica associada com os aspectos históricos evolutivos chama-se *área de endemismo* (AE).

Os primeiros naturalistas que chegaram na Amazônia perceberam que este bioma não se tratava de uma entidade biogeográfica única. WALLACE (1852) reconheceu quatro áreas de endemismo: Guianas, Equador, Peru e Brasil, tais áreas o autor chamou de “distritos”, os limites dos distritos de Wallace são os rios Amazonas, Solimões, Negro e Madeira. CRACRAFT (1985) e HAFFER, (1985) com informações da distribuição de espécies de aves amazônicas identificaram sete áreas de endemismo para este bioma, e tais áreas tinham similaridades com os distritos de Wallace. Entretanto, o distrito Equador foi dividido em Imeri e Napo, o distrito Brasil foi dividido em Rondônia, Pará e Belém e o Peru foi renomeado Inambari. Posteriormente, SILVA (2002) sugeriu a divisão da área de endemismo Pará em Tapajós e Xingu (Figura 4).



Figura 4. Hipótese de áreas de endemismo para o bioma Amazônico. Ilustração modificada de SMITH et al. (2014).

1.6. Marcadores moleculares para reconstruções filogenéticas

A Sistemática Zoológica tem como primeiro grande desafio descrever a diversidade biológica existente, e áreas como a Morfologia, Etologia e Ecologia são o alicerce (MAYR, 1969). Contudo, o passo seguinte era a organização, de uma maneira lógica, de toda a diversidade já encontrada e a que estivesse por ser descoberta. Neste ponto, foi fundamental a mudança de paradigma provocada pela teoria evolutiva de Darwin, além das contribuições do conceito filogenético de espécie, que impulsionaram o conhecimento sobre as relações de parentesco como o ponto central das reconstruções filogenéticas (HENNIG, 1966). Outras áreas do conhecimento também contribuíram significativamente para o entendimento da história evolutiva dos organismos. Entre estas, destacam-se a Paleontologia, Embriologia, Fisiologia e Genética (NELSON, 1978; MOORE et al., 1998). A Genética iniciou sua contribuição para sistemática principalmente através dos estudos sobre polimorfismo de proteínas (KIMURA; OHTA, 1971). No entanto, após o trabalho de WATSON; CRICK (1953), no qual estes desvendaram a estrutura da molécula de DNA, e posteriores avanços que se seguiram na pesquisa sobre a síntese de DNA *in vitro*, uma nova

perspectiva foi oferecida aos pesquisadores, que puderam refinar suas análises ao nível da composição nucleotídica de regiões genômicas (AVISE, 2004).

As regiões genômicas podem ser classificadas de diversas formas. Por exemplo, se a região é codificante ou não-codificante, se é do genoma mitocondrial, do cloroplasto ou nuclear. Se for nuclear pode ser classificada pelo nível de repetições: i) cópia única ou não (repetitiva); ii) moderadamente repetitiva (os elementos intercalados longos -LINEs- e os elementos intercalados curtos -SINEs-); iii) altamente repetitiva (mini e microssatélites) (SNUSTAD; SIMMONS, 2012). Contudo, independente da classificação adotada, regiões genômicas possuem caráter hereditário e são conhecidas como marcadores moleculares. Nas últimas décadas, o número de filogenias que utilizaram dados moleculares como base para suas inferências cresceu de forma exponencial e uma boa representação deste crescimento é o acúmulo de sequências de DNA disponíveis em bancos de dados públicos, como GenBank. Isto, associado ao aumento na capacidade computacional de análises de dados, tem propiciado avanços na resolução da árvore da vida. Para a sistemática dos macacos do Novo Mundo, os dados moleculares também têm fornecido significativos avanços (PERELMAN et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2012; BOUBLI et al., 2012).

1.6.1. DNA mitocondrial (mtDNA)

Grande parte do material genético dos organismos eucariotos está concentrado no núcleo, mas uma parte encontra-se em organelas celulares, tais como a mitocôndria e cloroplasto. De acordo com a hipótese que melhor explica a presença de DNA nestas organelas é que em algum momento da história evolutiva, estas organelas eram organismos vivos que teriam sido englobados por outra célula, sem ser digeridos, e que permaneceram como simbioses MARGULIS (1981).

As mitocôndrias têm papel de destaque nos processos metabólicos das células eucariontes, sendo fundamentais para o fornecimento de energia para a célula. Na maioria dos animais, mitocôndrias possuem uma dupla bicamada lipídica e uma molécula de DNA com formato circular, com dimensão de 15 a 20 quilobases (kb). O genoma mitocondrial é relativamente pequeno se comparado ao genoma nuclear (TAANMAN, 1999; VAN OVEN; KAYSER, 2009). Nos vertebrados a composição do mtDNA é bastante similar para a maioria dos organismos, sendo de 37 genes, dos quais dois codificam RNAs ribossomais, 22 RNAs transportadores e 13 polipeptídios, além de uma região não codificante chamada a região

controle (ANDERSON et al., 1981; JANKE et al., 1994; BROWN, 2008). De maneira geral, o DNA nuclear é mais conservado do que o mitocondrial pelo fato do mtDNA possuir elevada taxa de mutação associada à produção de radicais livres dentro da organela, e um sistema de reparo não tão eficiente quanto o do DNA nuclear (MASON, 2003; BALABAN et al., 2005). Além disso, numa única geração de células há várias gerações de mitocôndrias (JOHNSON; JOHNSON, 2001). O mtDNA possui variações significativas nas taxas de mutação quando comparadas diferentes regiões desta molécula (PESOLE et al., 1999). Esta característica propicia sua utilização para investigações filogenéticas, filogeográficas e de genética de populações (AVISE et al., 1987).

1.6.2. SINEs e elementos *Alu*

Na década de 1940, Barbara McClintock observou que algumas regiões do genoma do milho tinham a capacidade de se mover de um local para outro no genoma GRIFFITHS et al. (2006). A partir de então foram descobertos vários elementos de transposição, tanto em procariotos como eucariotos. Os elementos transponíveis podem ser classificados de duas maneiras CAPY et al. (1998). A primeira é com relação à autonomia. Quando este possui a maquinaria necessária para se replicar é chamado autônomo. O não autônomo necessita de um auxílio para que aconteça a replicação. A segunda maneira de classificar está relacionada ao intermediário que é utilizado para a transposição, se é a partir de DNA ou RNA.

Os elementos transponíveis que utilizam o RNA como molde para sua replicação, chamam-se retrotransposons, dentre estes, há um grupo conhecido por (SINEs) elementos intercalados curtos, SINEs são reconhecidos por possuírem tamanho menor que 500 Pares de bases (pb) (XING et al., 2005). Estudos demonstraram que quase todos os SINEs originaram-se de RNA transportador, exceto os elementos *Alu*, que são elementos móveis, oriundos de uma mutação no RNA 7SL (OHSHIMA et al., 1993; OKADA, 1991). Elementos *Alu* são específicos de primatas (KRIEGS et al., 2007), portanto esta mutação estava presente no ancestral comum de todos os primatas atuais e tem se propagado desde então. Atualmente, elementos *Alu* correspondem a cerca de 10% da totalidade dos genomas de primatas (SALEM et al. 2003; RAY et al., 2005). Embora os *Alu* não possuam sistema de replicação autônoma, estes utilizam a transcriptase reversa de outro elemento transponível para replicar-se, o LINE L1. Após a replicação, a cópia é inserida numa posição aleatória do genoma hospedeiro, em um processo de “copiar e colar” (BOEKE, 1997; DEWANNIEUX et al. 2003; OHSHIMA; OKADA, 2005).

Elementos *Alu* são caracterizados por possuírem na extremidade 3' aproximadamente 20 – 30 repetições de bases nitrogenadas Adenina. Essa região é conhecida como cauda poli-A (BOEKE, 1997; DEWANNIEUX et al., 2003). Inserções *Alu* são eventos únicos e irreversíveis HAMDI et al. (1999) e SHEDLOCK & OKADA (2000). Portanto, a ausência da inserção caracteriza o estado ancestral. Quando dois táxons compartilham uma inserção em loci ortólogos, temos um forte indício de ancestralidade em comum. Estas características tem propiciado a utilização de *Alus* para investigações filogenéticas (SINGER et al., 2003; RAY et al., 2005; OSTERHOLZ et al., 2009; MARTINS et al., 2014).

1.7. Referências bibliográficas

ANDERSON, S.; BANKER, A. T.; BARRELL, B. G.; DE BRUIJN M. H. L.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPEDON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F.; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R.; YOUNG, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–465, 1981.

AVISE, J. **Molecular markers, Natural History, and Evolution**. University of Georgia, ed. 2, 2004.

AVISE, J.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ecology and Systematics**, v. 18, pp. 489–522, 1987.

AYRES, J. M. C.; CLUTTON-BROCK, T. H. River boundaries and species range size in Amazonian primates. **American Naturalist**. v. 140, pp. 531–537, 1992.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, pp. 483–95, 2005.

BARROS, R. M. S.; PIECZARKA, J. C; BRIGIDO, M. C. O.; MUNIZ, J. A. P. C.; RODRIGUES, L. R. R.; NAGAMACHI C. Y. A new karyotype in *Callicebus torquatus* (Cebidae, Primates). **Hereditas**, v. 133, pp. 55–58. 2000.

BOEKE, J. LINEs and Alus – the poly A connection. **Nature Genetics**, v. 16, pp. 6–7, 1997.

BONVICINO, C. R; PENNA-FIRME, V; NASCIMENTO, F. F; LEMOS, B; STANYON, R; SEUÁNEZ, H. N. The lowest diploid number (2n=16) yet found in any primate: *Callicebus lugens* (Humboldt, 1811). **Folia Primatol.** v. 74, pp. 141–149, 2003.

BOUBLI, J. P; RYLANDS, A. B; FARIAS, I; ALFARO, M. E; LYNCH ALFARO J. W. *Cebus* phylogenetic relationships: a preliminary reassessment of the diversity of the untufted capuchin monkeys. **American Journal Primatology**. v. 74, pp. 381–393, 2012.

BROWN, K. H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 2, pp. 355–374, 2008.

BUSH, M. B. Amazonian speciation—a necessarily complex model. **Journal of Biogeography**. v. 21, pp. 5–17, 1994.

CAPY, P. Dynamics and evolution of transposable elements. **1st France Landes Bioscience**, p. 197, 1998.

COLINVAUX, P. A. Pleistocene biogeography and diversity in tropical forests of South America. In: ed. P. **Goldblatt**. Biological relationships between Africa and South America. Yale University Press, New Haven, CT. Pp. 473–499, 1993.

COYNE, J.; ORR, H. A. **Speciation**. Sunderland, MA: Sinauer Associates. v. 37, 2004.

CRACRAFT, J. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American areas of endemism. **Ornithology** v. 36, pp. 49–84, 1985.

DALPONTE, J. C.; SILVA, F. E.; SILVA JÚNIOR, J. S. New species of titi monkey, genus *Callicebus* Thomas, 1903 (Primates, Pitheciidae), from southern Amazonia, Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo**, v. 54, pp. 457–472, 2014.

DE BOER, L. E. M. Cytotaxonomy of the Platyrrhini (Primates). **Genen Phaenen** v. 17, pp. 1–115, 1974.

DEFLER, T. R.; BUENO, M. L.; GARCÍA, J. . *Callicebus caquetensis*: a new and Critically Endangered titi monkey from southern Caquetá, Colombia. **Primate Conservation** n. 25, pp. 1–9, 2010.

DEWANNIEUX, M.; ESNAULT C.; HEIDMANN, T. LINE-mediated retrotransposition of marked *Alu* sequences. **Nat. Genet.** v. 35, p. 41–48, 2003.

ENDLER, J. A. **Geographic Variation, Speciation and Clines**. Princeton University Press, Princeton, 1997.

FORD, S. M. Systematics of the New World monkeys. In: Swindler, D. R.; Erwin, J. (Eds.), **Comparative Primate Biology, Systematics, Evolution and Anatomy** v. 1. Alan R. Liss, New York, pp. 73–135, 1986.

FRAILEY, C. D.; LAVINA, E. L.; RANCY, A.; DE SOUSA, J. P. A proposed Pleistocene/Holocene lake in the Amazon basin and its significance to Amazonian geology and biogeography. **Acta Amazonica** v. 18 n. 3–4, pp. 119–143.

GOODMAN, M.; PORTER, C. A.; CZELUSNIAK, J.; PAGE, S. L.; SCHNEIDER, H.; SHOSHANI, J.; GUNNELL, G.; GROVES, C. P. Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 9, pp. 585–598, 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. Introdução a Genética. **Guanabara Koogan** v. 9 edition, p. 764, 2006.

GROVES, C. P. Order Primates. In: **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**, 3rd edition, Wilson, D. E.; Reeder D. M. (eds.), Baltimore, MD: **The John Hopkins University Press**, pp. 111–184, 2005.

GUALDA-BARROS, J.; NASCIMENTO, F. O. de ; AMARAL, M. A. K new species of *Callicebus* Thomas, 1903 (Primates, Pitheciidae), from the states of Mato Grosso and Pará, Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo**, pp. 261–279, 2012.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science** v. 165, pp. 131–137, 1969.

HAFFER, J. Avian zoogeography of the Neotropical lowlands. **Ornithology** v. 36, pp. 113–146, 1985.

HAFFER, J.; PRANCE, G. T. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. **Estudos Avançados** v. 16, pp. 175–206, 2002.

HAMDI, H.; NISHIO, H.; ZIELINSKI, R.; DUGAICZYK, A. Origin and phylogenetic distribution of *Alu* DNA repeats: irreversible events in the evolution of primates. **Journal of Molecular Biology** v. 289, n. 4, p. 861–71, 18 jun. 1999.

HARADA, M. L.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SAMPAIO, I.; CZELUSNIAK, J.; GOODMAN, M. DNA Evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the sister-grouping of *Cebus* and *Saimiri* from unlinked nuclear genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 4, pp. 331–349, 1995.

HENNIG, W. **Phylogenetic Systematics**. Urbana: **University of Illinois, press**, 263pp., 1966.

HERSHKOVITZ, P. A systematic and zoogeographic account of the monkeys of the genus *Callicebus* (Cebidae) of the Amazonas and Orinoco River basins. **Mammalia** v. 27, pp. 1–80, 1963.

HERSHKOVITZ, P. Origin, speciation, and distribution of South American titi monkeys, genus *Callicebus* (Family Cebidae, Platyrrhini). **Proc. Acad. Natl. Sci. Philadelphia** v. 140, pp. 240–272, 1988.

HERSHKOVITZ, P. Titis, New World monkeys of the genus *Callicebus* (Cebidae, Platyrrhini): a preliminary taxonomic review. **Fieldiana Zoology, New Series** v. 55, p. 1–109, 1990.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature (IUCN), Species Survival Commission (SSC), Gland, Switzerland, and Cambridge, UK. Website: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso: 16 de março de 2014.

- JANKE, A.; FELDMAIER-FUCHS, G.; THOMAS, W. K.; VON-HAESELER, A.; PAABO, S. The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. **Genetics** v. 137, pp. 243–256, 1994.
- JOHNSON, A. A.; JOHNSON, K. A. Exonuclease proofreading by human mitochondrial DNA polymerase. **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 41, p. 38097–107. 2001.
- KAY R. F. The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthroipoidea). **J. Hum. Evol.** v. 19, pp.175–208, 1990.
- KIMURA, M.; OHTA, T. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. **Nature** v. 229, pp. 467–469, 1971.
- KOBAYASHI, S. A phylogenetic study of titi monkeys, genus *Callicebus*, based on cranial measurements: I. Phyletic groups of *Callicebus*. **Primates** v. 36, pp. 101–120, 1995.
- KOBAYASHI, S.; LANGGUTH, A. A new species of titi monkey, *Callicebus* Thomas, from north-eastern Brazil (Primates, Cebidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 16(2): 531–551, 1999.
- KRIEGS, J. O.; CHURAKOV, G.; JURKA, J.; BROSIUS, J.;SCHMITZ, J. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. **Trends in Genetics** v. 23, pp. 158–161, 2007.
- MARGULIS, L. **Symbiosis in Cell Evolution**. W.H. Freeman, New York, 452pp. 1981.
- MARROIG, G.; CERQUEIRA, R. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon lagoon hypothesis: a piece of the puzzle of Amazonian diversification. **J. Comp. Biol.** v. 2, pp. 103–119, 1997.
- MARTINS, A. M.; AMORIM, N.; CARNEIRO, J.; MELLO-AFFONSO, R. A.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. *Alu* elements and the phylogeny of capuchin (*Cebus* and *Sapajus*) monkeys. **American Journal of Primatology** DOI:10.1002/ajp.22352, 2014.
- MASON, P. A. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 1052–1058, 2003.
- MAYR, E.; ASHLOCK, P. D. Principles of Systematic Zoology. **Systematic Biology**. Edition, de Queiroz. v. 41, 2nd edition, p. 264–266, 1969.
- MINEZAWA, M.; JORDAN, C. O. C.; BORDA, C. J. V. Karyotypic study of titi monkeys, *Callicebus moloch brunneus*. **Primates**. v. 30, pp. 81–88, 1989.
- MONÇÃO, G. R.; SELHORST, V.; SOARES-FILHO, J. A. R. Expansão da distribuição geográfica de *Callicebus bernhardi* a oeste do rio Ji-Paraná, estado de Rondônia, Brasil. **Neotropical Primates**. v.15, pp. 67–68, 2008.
- MOORE, L. R.; ROCAP, G.; CHISHOLM, S. W. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. **Nature**. v. 393, pp. 464–467, 1998.

NAGAMACHI, C. Y.; RODRIGUES, L. R. R.; GALETTI Jr. P. M. Cytogenetic studies in *Callicebus personatus nigrifrons* (Platyrrhini, Primates). **Caryologia** v. 56, pp. 47–52, 2003.

NELSON, G. Ontogeny, Phylogeny, Paleontology, and the biogenetic law. **Systematic Biology** v. 27, p. 324–345, 1978.

NORCONK, M. A.; Sakis, uakaris, and titi monkeys: behavioral diversity in a radiation of primate seed predators. In: **South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation**. Springer Science + Business Media, New York, 2007.

NORES, M. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. **Journal of Biogeography** v. 26, pp. 475–485, 1999.

NORONHA, M. A.; SPIRONELLO, W. R.; FERREIRA, D. C. New occurrence records and eastern extension to the range of *Callicebus cinerascens* (Primates, Pitheciidae). **Neotropical Primates** v. 14, n. 3, p. 137–139, 2007.

OHSHIMA, K.; KOISHI, R.; MATSUO, M.; OKADA, N. Several short interspersed repetitive elements (SINEs) in distant species may have originated from a common ancestral retrovirus: Characterization of a squid SINE and a possible mechanism for generation of tRNA-derived retroposons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 90, n. 13, p. 6260–6264, 1993.

OHSHIMA, K.; OKADA, N. SINEs and LINEs: symbionts of eukaryotic genomes with a common tail. **Cytogenetic and Genome Research** v. 110, n. 1–4, p. 475–90, 2005.

OKADA, N. SINEs: Short interspersed repeated elements of the eukaryotic genome. **Trends in Ecology and Evolution** v. 6, n. 11, pp. 358–61, 1991.

OSTERHLOZ, M.; WALTER, L.; ROOS, C. Retropositional events consolidate the branching order among New World monkey genera. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 50, p. 507–513, 2009.

PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F. Molecular phylogenetics and the diversification of Amazonian mammals. In: Vieira, I. C. G., Silva, J. M. C., Oren, D. C. & D'Incao, M. A. (orgs.), *Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia*. Belém: **Museu Paraense Emílio Goeldi**, pp. 139–164, 2001.

PERELMAN, P.; JOHNSON, W. E.; ROOS, C.; SEUÁNEZ, H N.; HORVATH, J. E. MOREIRA, M.A.M.; KESSING, B.; PONTIUS, J.; ROELKE, M.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.; O'BRIEN, S.J.; PECON-SLATTERY, J. A Molecular Phylogeny of Living Primates. **PLoS Genetics** v. 7, doi:10.1371 /journal.pgen. 1001342, 2011.

PESOLE, G. PESOLE, G.; GISSI, C.; DE CHIRICO, A.; SACCONI, C.; Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. **Journal of Molecular** v. 48, pp. 427–434, 1999.

PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, C. Y. The karyotype of *Callicebus moloch moloch* (Cebidae, Primates). **Rev. Brasil. Genet.** v. 11, pl. 653– 659, 1988.

RAY, D. A.; JINCHUAN XING, HEDGES, D. J.; HALL, M. A.; LABORDE, M. E.; ANDERS, B. A.; WHITE, B. R. STOILOVA, N.; FOWLKES, J. D.; LANDRY, K. E.; CHEMNICK, L. G.; RYDER, O. A.; BATZER, M. A. Alu insertion loci and platyrrhine primate phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 35, n. 1, pp. 117–26, 2005.

RODRIGUES, L. R. R.; BARROS, R. M. S.; PISSINATI, A. Cytogenetic study of *Callicebus hoffmannsi* (Cebidae, Primates) and comparison with *C. m. moloch*. **Cytobios** v. 105, pp. 137– 145, 2001.

ROSENBERGER, A. L. Systematics: the higher taxa. In: Coimbra-Filho A. F.; Mittermeier, R. A. (eds.): **Ecology and Behaviour of Neotropical Primates**, Vol. 1. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências** p. 2–7, 1981.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA-JÚNIOR, J. S. Taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook** v. 45, pp. 1748–1090, 2012.

SALEM, A. H.; RAY, D. A.; XING, J.; CALLINAN, P. A.; MYERS, J. S.; HEDGES, D. J.; GARBER, R. K.; WITHERSPOON, D. J.; JORDE, L. B.; BATZER, M. A.; *Alu* elements and hominid phylogenetics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 100, pp. 12787–12791, 2003.

SAMPAIO, R.; DALPONTE, J. C.; ROCHA, E. C.; HACK, R. O. E.; GUSMÃO, A. C.; AGUIAR, K. M. O.; KUNIY, A. A.; SILVA JÚNIOR, J. S. Novos registros com uma extensão da distribuição geográfica de *Callicebus cinerascens* (Spix, 1823). **Mastozoologia Neotropical** v. 19, pp. 159–164, 2012.

SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SAMPAIO, M. I. C.; HARADA, M. L.; STANHOPE, M.; GOODMAN, M. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 2, pp. 225–242, 1993.

SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; HARADA, M. L.; BARROSO C. M. L.; SCHNEIDER M. P. C.; CZELUSNIAK, J.; GOODMAN, M. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates) based on two unlinked nuclear genes: IRBP intron 1 and ϵ -globin sequences. **Am. J. Phys. Anthropol.** v.100, pp. 153–179, 1996.

SCHNEIDER, H. The current status of the New World monkey phylogeny. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 72, pp. 165–172, 2000.

SCHNEIDER, H.; BERNARDI, J. A. R.; DA CUNHA, D. B.; TAGLIARO, C. H.; VALLINOTO, M.; FERRARI, S. F.; SAMPAIO, I. A molecular analysis of the evolutionary relationships in the Callitrichinae, with emphasis on the position of the dwarf marmoset. **Zoologica Scripta** v. 41, pp. 1–10, 2012.

SHEDLOCK, A. M.; OKADA, N. SINE insertions : powerful tools for molecular systematics. **BioEssays** v. 22, pp. 148–160, 2000

SICK, H. Rios e enchentes na Amazonia como obstaculo para a avifauna. In: **ed. H. Lent. Atas do Simpósio sobre a Biota Amazonica.** conselho de pesquisas Rio de Janeiro (Zoologia) v. 5, pp. 495–520, 1967.

SILVA J. M. C.; NOVAES, F. C.; OREN, D. C. Differentiation of *Xiphocolaptes* (Dendrocolaptidae) across the river Xingu, Brazilian Amazonian: recognition of a new phylogenetic species and biogeographic implications. **Bulletin of the British Ornithologists' Club.** v. 122, pp. 185–194, 2002.

SILVA J. M. C.; RYLANDS A. B.; FONSECA G. A. B. The fate of Amazonian areas of endemism. **Conserv. Biol.** v. 19, pp. 689–694, 2005.

SILVA JÚNIOR, J. S.; FIGUEIREDO, W. M. B.; FERRARI, S. F. **Taxonomy and Geographic Distribution of the Pitheciidae. Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis, and Uacaris.** New York: Cambridge University Press, 2007.

SMITH, B. T.; MCCORMACK, J. E.; CUERVO, A. M.; HICKERSON, M.; 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. The drivers of speciation tropical. **Nature** doi:10.1038/nature13687, 2014.

SINGER, S. S.; SCHMITZ, J.; SCHWIEGK, C.; ZISCHLER, H. Molecular cladistic markers in New World monkey phylogeny (Platyrrhini, Primates). **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 26, pp. 490–501, 2003.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Principles of Genetics.** 6th edition. [S.l: s.n.]. 778pp., 2012.

TAANMAN, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1410, n. 2, pp. 103–23, 1999.

THOMAS O. Notes on South-America monkeys, bats, carnivores and rodents with descriptions of new species. **Annals Magazine of Natural History** v. 12, p. 455–464, 1903.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Human Mutation** v. 30, n. 2, pp. E386–94, 2009.

VAN ROOSMALEN M. G. M.; VAN ROOSMALEN T.; MITTERMEIER R. A. A taxonomic review of the titi monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the description of two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. **Neotropical Primates** v. 10(suppl.), pp.1–52. 2002.

VANZOLINI, P.E. Zoologia sistemática, geografia e a origem das espécies. **Instituto Geográfico São Paulo.** Serie Teses e Monografias v. 3, pp. 1–56, 1970.

WALLACE, A. R. On the monkeys of the Amazon. **Proc. Zool. Soc. Lond.** v. 20, pp. 107–110, 1852.

WALLACE, R .B.; GOMEZ, H.; FELTON, A.; FELTON, A. M. On a new species of titi monkey, genus *Callicebus* Thomas (Primates, Pitheciidae), from western Bolivia with preliminary notes on distribution and abundance. **Primate Conservation** 20, pp.29–39, 2006.

WATSON, J.; CRICK, F. H. C. A structure for DNA. **Nature** v. 171, pp. 736–738, 1953.

XING, J. HUI WANG; KYUDONG HAN; RAY, D. A.; HUANG, C. H.; CHEMNICK, L. G.; STEWART, C.; DISOTELL, T. R.; RYDER, O. A.; BATZER, M. A. A mobile element based phylogeny of Old World monkeys. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 37, n. 3, pp.872880, 2005.

CAPÍTULO II

Elementos *Alu* revelam que a linhagem do grupo *Callicebus personatus* divergiu antes dos grupos *C. moloch*, *C. cupreus* e *C. donacophilus*

Resumo *Callicebus* é um gênero de primata do Novo Mundo da família Pitheciidae. Atualmente, são reconhecidas 32 espécies para o gênero, organizadas em cinco grupos de espécies: *C. torquatus*, *C. moloch*, *C. cupreus*, *C. donacophilus* e *C. personatus*. Os três primeiros grupos ocupam uma grande porção da bacia Amazônica, enquanto o grupo *C. donacophilus* ocupa principalmente a região do Chaco e o grupo *C. personatus* habita a Mata Atlântica. A classificação atual do gênero foi baseada em caracteres morfológicos e de distribuição geográfica. Entretanto, restam dúvidas sobre as relações filogenéticas entre os grupos. O objetivo deste estudo foi investigar as relações de parentesco entre os grupos com base na presença/ausência de oito elementos *Alu*. Os resultados mostram que os grupos *C. moloch*, *C. cupreus* e *C. donacophilus* são estreitamente relacionados e que *C. torquatus* é o grupo basal no gênero. Além disto, verificamos que *C. personatus* não diversificou para Mata Atlântica a partir do grupo *C. moloch*, e que essa diversificação é anterior à origem dos grupos *C. moloch* e *C. cupreus*.

Palavras chaves: Primatas, *Callicebus*, elemento *Alu*.

Abstract There are 32 species of titi monkeys, *Callicebus*. They are currently classified in five species groups: *C. torquatus*, *C. moloch*, *C. cupreus*, *C. donacophilus*, and *C. personatus*. The first three occupy a large portion of the Amazon basin, the *C. donacophilus* group occupies mainly the Chaco region, and the *C. personatus* group inhabits the Atlantic Forest of Brazil. To date the accepted taxonomy has been based on morphological features and geographic distributions; the phylogenetic relationships between the groups are still inconclusive. In this study I investigate the relationships among the species groups based on the presence or absence of eight *Alu* elements. The results suggest that the *C. moloch*, *C. cupreus* and *C. donacophilus* groups are closely related, and that the *C. torquatus* group was first to diverge and is as such basal to the genus. In addition, we verified that *C. personatus* in the Atlantic Forest did not originate from the *C. moloch* group; the lineage arose prior to the appearance of the *C. moloch* and *C. cupreus* groups.

Keywords Primates · *Callicebus* · *Alu* element

Introdução

Os primatas da Parvordem Platyrrhini estão subdivididos em Pitheciidae, Atelidae e Cebidae (Schneider e Sampaio, 2013). *Callicebus* Thomas, 1903, é o gênero mais diverso na família Pitheciidae e um dos mais diversos entre os Platyrrhini (Rylands et al., 2012; Silva-Júnior et al., 2013).-Atualmente são 32 espécies de zogue-zogues, sauás ou guigós, *Callicebus* (Ferrari et al., 2013; Dalponte et al., 2014). Groves (2001, 2005) dividiu as espécies em dois subgêneros (*Callicebus* e *Torquatus*). O subgênero *Torquatus* é composto de seis espécies, e é chamado também o grupo *Callicebus torquatus*. O subgênero *Callicebus* é composto de 26 espécies, Groves (2001) dividiu as em quatro grupos de espécies: *C. moloch*, *C. cupreus*, *C. donacophilus* e *C. personatus* (Tabela 1). Tais agrupamentos foram formados com base em caracteres morfológicos e distribuições geográficas (Van Roosmalen et al., 2002).

Callicebus ocorre na América do Sul. Os grupos *C. torquatus*, *C. cupreus* e *C. moloch* habitam o bioma Amazônico. Algumas espécies do grupo *torquatus* ocorrem em simpatria com ao sul do rio Amazônas. O grupo *C. donacophilus* ocupa a região do Chaco e uma pequena área no sudeste da bacia Amazônica. Enquanto, o grupo *C. personatus* habita a Mata Atlântica, extremo leste da América do Sul (IUCN, 2015) (Fig. 1).

A genética molecular é utilizado como uma ferramenta para investigar a história evolutiva dos organismos. Dentre os diversos marcadores moleculares, os elementos *Alu* têm fornecido importante parcela de contribuição para a sistemática dos primatas (Ray et al. 2005; Osterholz et al. 2009; Martins et al. 2014). *Alus* são regiões genômicas

tranponíveis (Ohshima et al. 1993; Okada, 1991), exclusivos de primatas, e todo evento de inserção é único e irreversível (Hillis, 1999). Portanto, quando investigamos uma inserção *Alu* num grupo de primatas podemos inferir quais são os táxons ancestrais e derivados, apenas pela ausência ou presença da inserção. Além disto, podemos assumir que se dois indivíduos compartilham um *Alu* em loci ortólogos é porque ocorreu a inserção no ancestral em comum de ambos.

Ray et al. (2005) e Osterholz et al. (2009) buscaram elementos *Alus* com base no DNA de várias espécies de primatas, entre estes *C. donacophilus* e *C. moloch*, respectivamente. Com base nestas duas espécies os autores sugeriram que alguns *Alus* são específicos para *Callicebus*. Entretanto, a simples presença de um *Alu* numa espécie não garante que as demais espécies do gênero vão possuir a mesma inserção, a não ser que a inserção esteja presente na espécie basal do gênero. No entanto ainda não temos uma hipótese robusta de relacionamento filogenético entre os grupos de espécies de *Callicebus*. Além disto, estudos citogenéticos já demonstraram que espécies dos diferentes grupos apresentam uma grande variação do número diplóide (Pieczarka e Nagamachi, 1988; Bonvicino et al., 2003).

No presente trabalho nós testamos oito inserções *Alu* identificadas em estudos anteriores (Ray et al., 2005; Osterholz et al., 2009) como exclusivas e pertencentes ao gênero *Callicebus*. Nosso objetivo foi o de verificar se estas inserções estão presentes nas espécies dos diferentes grupos e a partir dos resultados, inferir a relação de parentesco entre os grupos.

Material e métodos

Nós obtivemos DNA de 25 amostras de tecido muscular e sanguíneo de 14 espécies de *Callicebus* (2 *C. moloch*, 2 *C. cinerascens*, 2 *C. bernhardi*, 2 *C. miltoni*, 2 *C. brunneus*,

2 *hoffmannsi*, 2 *C. cupreus*, 2 *C. dubius*, 2 *C. caligatus*, 2 *C. purinus*, 2 *C. lugens*, 1 *C. personatus*, 1 *C. melanochir*, 1 *C. nigrifrons*) adquiridas em Centros de Primatas do Brasil, no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), no Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e na Universidade Federal do Pará. As espécies foram identificadas por caracteres morfológicos, principalmente pelo padrão de pigmentação da pelagem (*sensu* Van Roosmalen, 2002). Todas as amostras utilizadas tinham origem geográfica conhecida e são congruentes com o conhecimento taxonômico atual.

As extrações de DNA foram realizadas pelo kit Wizard Genomic Promega conforme o protocolo do fabricante. Pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) realizamos as amplificações das regiões de interesse. A PCR foi realizada com 15 µl de volume final, contendo aproximadamente 30ng de DNA genômico; 2.4 µl de dNTPs (1.25mM); 1.5 µl de tampão 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl); 1 µl de MgCl₂ (25 mM); 1 µl de cada iniciador (0.2 µM) e 1 U de Taq DNA polimerase. Com uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos com desnaturação de 94 °C por 30 s, a temperatura de hibridação dos iniciadores foi utilizada segundo os protocolos de Ray et al. (2005) e Osterholz et al. (2009) (ver detalhes, Tabela 2) por 30s, extensão de 72 °C por 30s, finalizado os ciclos, uma extensão final de 72 °C por 5min. Posteriormente, as amplificações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5%, assim como, uma amostra de DNA ladder invitrogen 1Kb plus, ambas foram coradas com GelRed. Alguns dos produtos de PCR amplificados foram purificados com polietileno glicol (PEG) e álcool (Paithankar e Prasad, 1991). Após purificação, realizamos as reações de sequência com o *Kit BigDye Terminator Sequencing* (Life technologies), e as amostras foram sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500xl (Life technologies).

Resultados e discussão

Os *primers* descritos por Ray et al. (2005) e Osterholz et al. (2009) não são ancorados nos extremos dos elementos *Alu*. Na verdade, estes marcadores amplificam o elemento *Alu* e suas regiões flanqueadoras, na maioria dos casos a região flanqueadora mede cerca de 150 pares de bases em cada extremidade do *Alu*. Esta característica permite-nos realizar inferências apenas pela verificação de padrões de banda no gel de agarose. O motivo é simples, a espécie que possui o elemento *Alu* no marcador que está sendo testado tem um tamanho de fragmento maior do que as espécies que não possuem a inserção (Fig. 2).

Foram encontrados elementos *Alus* para todas as espécies testadas em sete dos oitos marcadores utilizados, corroborando os estudos de Ray et al. (2005) e Osterholz et al. (2009). Contudo, no marcador Callicebus4 (Tabela 2) foi verificado dois padrões de bandas entre espécies de grupos distintos (Fig. 3), a partir desse resultado nós sequenciamos alguns espécimes que apresentavam os dois padrões para confirmar que a diferença nos tamanhos de fragmentos era decorrente exclusivamente da ausência do *Alu*. Os resultados das sequências confirmam a ausência do *Alu* Callicebus4 para as espécies dos grupos *C. torquatus* e *C. personatus*. Não é conhecido nenhum mecanismo de excisão, que remova *Alus* após a inserção (Shedlock e Okada, 2000; Batzer e Deininger, 2002)—a inserção de um elemento *Alu* é unidirecional (Hill, 1999).

Portanto, os grupos *C. torquatus* e *C. personatus* são basais em relação aos grupos de espécies (*C. moloch* e *C. cupreus*). Por falta de amostras das espécies grupo *C. donacophilus* não podemos afirmar se a inserção Callicebus4 ocorre no grupo.

Entretanto, nossos dados contrariam a hipótese de que os *Callicebus* da Mata Atlântica teriam se diversificado a partir do grupo *C. moloch* (Kobayashi, 1995).

É evidente a limitação dos nossos dados para inferências robustas a respeito da história biogeográfica do gênero, no entanto, vale ressaltar que as espécies do grupo *C. torquatus* são mais distantes filogeneticamente das espécies dos seus vizinhos—os grupos *C. moloch* e *C. cupreus*—que do grupo *C. personatus*.

Atualmente Amazônia e Mata Atlântica são separadas por uma extensa área de matas abertas, vegetação xerófila, e savana tropical, conhecida como diagonal seca da América do Sul, que constitui os biomas Caatinga, Cerrado e Chaco (Ab'Saber, 1977). Entretanto, estudos têm demonstrado a ocorrência de táxons reciprocamente monofiléticos nos dois biomas, sugerindo conexões passadas entre a Amazônia e Mata Atlântica (De Oliveira et al., 1999; Costa, 2003; Batalha-Filho, 2013). Lynch Alfaro et al. (2015) revisaram o conhecimento biogeográfico atual dos Platyrrhini e sugerem que ocorreram várias radiações da Amazônia para Mata Atlântica, com posterior vicariância, durante o Mioceno. Este cenário foi sugerido para os *Sapajus* (Lynch Alfaro et al., 2012) e calitriquídeos (Schneider e Sampaio 2013; Buckner et al., 2015). Com base nos pressupostos acima e nos nossos resultados acreditamos que o grupo *C. torquatus* é o mais basal no gênero. ~~Entretanto, são necessárias novas investigações que possam recuperar a história evolutiva destes primatas.~~

Aqui corroboramos estudos anteriores que sugerem o estreito relacionamento entre os grupos *C. moloch* e *C. cupreus*. Constatamos que a inserção Alu Callicebus4 está ausente nas espécies dos grupos *C. torquatus* e *C. personatus*, e verificamos que *C. personatus* não diversificou na Mata Atlântica a partir do grupo *C. moloch*. E que essa diversificação é anterior à origem dos grupos *C. moloch* e *C. cupreus*.

Referências

Ab'Saber AN (1977) Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfol* 53:1–23

Batalha-Filho H, Fjeldsa J, Fabre PH, Miyaki Y (2013) Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *J Ornithol* 154:41–50

Batzer MA, Deininger PL (2002) *Alu* repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 3:370–379

Bonvicino CR, Penna-Firme V, Do Nascimento FF, Lemos B, Stanyon R, Seuanez HN (2003) The lowest diploid number ($2n=16$) yet found in any primate: *Callicebus lugens* (Humboldt, 1811). *Folia Primatol* 74:141–149

Buckner JC, Alfaro JW, Rylands AB, Alfaro ME (2015) Biogeography of the marmosets and tamarins (Callitrichidae). *Mol Phylogenet Evol* 82:413–425

Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Brazilian Atlantic forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J Biogeog* 30:71–86

Dalponete JC, Felipe Ennes S, Silva Júnior JS (2014) New species of titi monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903 (Primates, Pitheciidae), from southern Amazonia, Brazil. *Pap Avuls Zool, São Paulo* 54:457–472

De Oliveira PE, Barreto AMF, Suguio K (1999) Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian Caatinga: the fossil dunes of the middle São Francisco river. *Palaeogeog Palaeoclimatol Palaeocol* 152:319–337

Ferrari SF, Veiga LM, Pinto LP, Marsh L, Mittermeier RA, Rylands AB (2013) Family Pitheciidae (titis, sakis and uacaris). In: Mittermeier RA, Rylands AB, Wilson DF (eds) *Handbook of the mammals of the world*, vol. 3. Lynx Edicions, Barcelona, pp 432–483

Groves CP (2001) *Primate Taxonomy*. Smithsonian Institution Press, Washington DC

Groves CP (2005) Order Primates. In: Wilson DE, Reeder DM (eds) *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, pp 111–184

Hillis DM (1999) SINEs of the perfect character. *Proc Natl Acad Sci* 96:9979–9981

IUCN (2015) *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2014.3. International Union for Conservation of Nature, (IUCN, Gland, Switzerland, Cambridge, UK <http://www.iucnredlist.org>

Kobayashi S (1995) A phylogenetic study of titi monkeys, genus *Callicebus*, based on cranial measurements: I. phyletic groups of *Callicebus*. *Primates* 36:101–120

Lynch Alfaro JW, Boubli JP, Olson LE, Di Fiore A, Wilson B, Gutiérrez-Espeleta GA, Chiou KL, Schulte M, Neitzel S, Ross V, Schwochow D, Nguyen MTT, Farias I, Janson CH, Alfaro ME (2012) Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *J Biogeog.* 39:272–288

Lynch Alfaro JML, Cortés-Ortiz L, Di Fiore A, Boubli JP (2015) Comparative biogeography of Neotropical primates. *Mol Phylogenet Evol* 82:518–529

Martins AM, Amorim N, Carneiro J, Mello-Affonso RA, Sampaio I, Schneider H (2014) *Alu* elements and the phylogeny of capuchin (*Cebus* and *Sapajus*) monkeys. *Am J Primatol* doi:10.1002/ajp.22352

Ohshima K, Koishi R, Matsuo M, Okada N (1993) Several short interspersed repetitive elements (SINEs) in distant species may have originated from a common ancestral retrovirus: characterization of a squid SINE and a possible mechanism for generation of tRNA-derived retroposons. *Proc Natl Acad Sci* 90:6260–6264

Okada N (1991) SINEs: Short interspersed repeated elements of the eukaryotic genome. *Trends Ecol Evol* 6:358-361

Osterholz M, Walter L, Roos C (2009) Retropositional events consolidate the branching order among New World monkey genera. *Mol. Phylogenet Evol* 50:507-513

Paithankar KR, Prasad KS (1991) Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res* 19:1346

Pieczarka JC, Nagamachi CY (1988) The karyotype of *Callicebus moloch moloch* (Cebidae, Primates). *Rev Brasil Genet* 11:653-659

Ray DA, Jinchuan X, Hedges DJ, Hall MA, Laborde ME, Anders BA, White BR, Stoilova N, Fowlkes JD, Landry KE, Chemnick LG, Ryder OA, Batzer MA (2005) *Alu* insertion loci and platyrrhine primate phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 35:117-26

Rylands AB, Mittermeier RA, Silva Júnior JS (2012) Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *Int Zoo Yearb* 46:11-24

Schneider H, Sampaio I. (2013) The systematics and evolution of New World primates - A review. *Mol Phylogenet Evol* 82:348-357

Shedlock AM, Okada N (2000) SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays* 22:148–160

Silva Júnior JS, Figueredo WMB, Ferrari SF (2013) Taxonomy and geographic distribution of the Pitheciidae. In: Veiga LM, Barnett AA, Ferrari SF, Norconk MA (org.) *Evolutionary biology and conservation of titis, sakis and uacaris*, Cambridge University press, Cambridge, UK, pp 31-42

Van Roosmalen MGM, Van Roosmalen T, Mittermeier RA (2002) A taxonomic review of the titi monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the description of two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotrop Primates* 10(Suppl):1–52

Tabela 1. Classificação taxonômica do gênero *Callicebus* (Groves, 2001; Silva Júnior et al., 2007)

Subgênero <i>Callicebus</i>		Subgênero <i>Torquatus</i>
Grupo <i>C. donacophilus</i>	Grupo <i>C. cupreus</i>	Grupo <i>C. torquatus</i>
<i>C. modestus</i>	<i>C. cupreus</i>	<i>C. torquatus</i>
<i>C. donacophilus</i>	<i>C. caligatus</i>	<i>C. lugens</i>
<i>C. pallescens</i>	<i>C. discolor</i>	<i>C. lucifer</i>
<i>C. oenanthe</i>	<i>C. ornatus</i>	<i>C. purinus</i>
<i>C. olallae</i>	<i>C. dubius</i>	<i>C. regulus</i>
Grupo <i>C. moloch</i>	<i>C. stephennashi</i>	<i>C. medemi</i>
<i>C. moloch</i>	<i>C. aureipalatti</i>	
<i>C. cinerascens</i>	<i>C. caquetensis</i>	
<i>C. brunneus</i>	Grupo <i>C. personatus</i>	
<i>C. hoffmannsi</i>	<i>C. personatus</i>	
<i>C. baptista</i>	<i>C. melanochir</i>	
<i>C. bernhardi</i>	<i>C. nigrifrons</i>	
<i>C. vieirai</i>	<i>C. barbarabrownae</i>	
<i>C. miltoni</i>	<i>C. coimbrai</i>	

Tabela 2. Marcadores moleculares utilizados neste estudo

<i>Molecular markers</i>	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>	<i>Temp.*</i>	<i>Reference</i>
Callicebus1	CTGGGATTACAGGCATGTGC	CATGAGCAAAGCGATGCCTC	56	Osterholz et al., 2009
Callicebus2	TGGACTATGAGTTGAGCAGAC	TATGCTAATTACTCTTCTTGGGC	58	Osterholz et al., 2009
Callicebus3	TCCATTACCAGGCCAGCTAG	GAACTTGCTGGCTTTCATATC	54	Osterholz et al., 2009
Callicebus4	GGAACATAATAGCCTGAAAGG	GATGGACAAAATGTGTAAGAAA	58	Osterholz et al., 2009
Titi_1D_82	TGGGGGCCTGATTACTAAAA	ACCAAAYATAGGCCTCRAATT	60	Ray et al., 2006
Titi_1D_84	GCACCTACCCACGAAAAGAA	ACATTGCCTCTGCAAATTGA	63	Ray et al., 2006
Titi_1D_F2_39	CAGCCAAAGGAGTGCTTCAC	GTAAATGGTGYCCCATAAGG	57	Ray et al., 2006
Titi_Alu1D_2D_13	TGGGGGCCTGATTACTAAAA	ACCAAAYATAGGCCTCRAAT	55	Ray et al., 2006

* Temperatura de hibridação dos marcadores na PCR.

Fig. 1 Distribuição geográfica dos grupos de espécies do gênero *Callicebus*

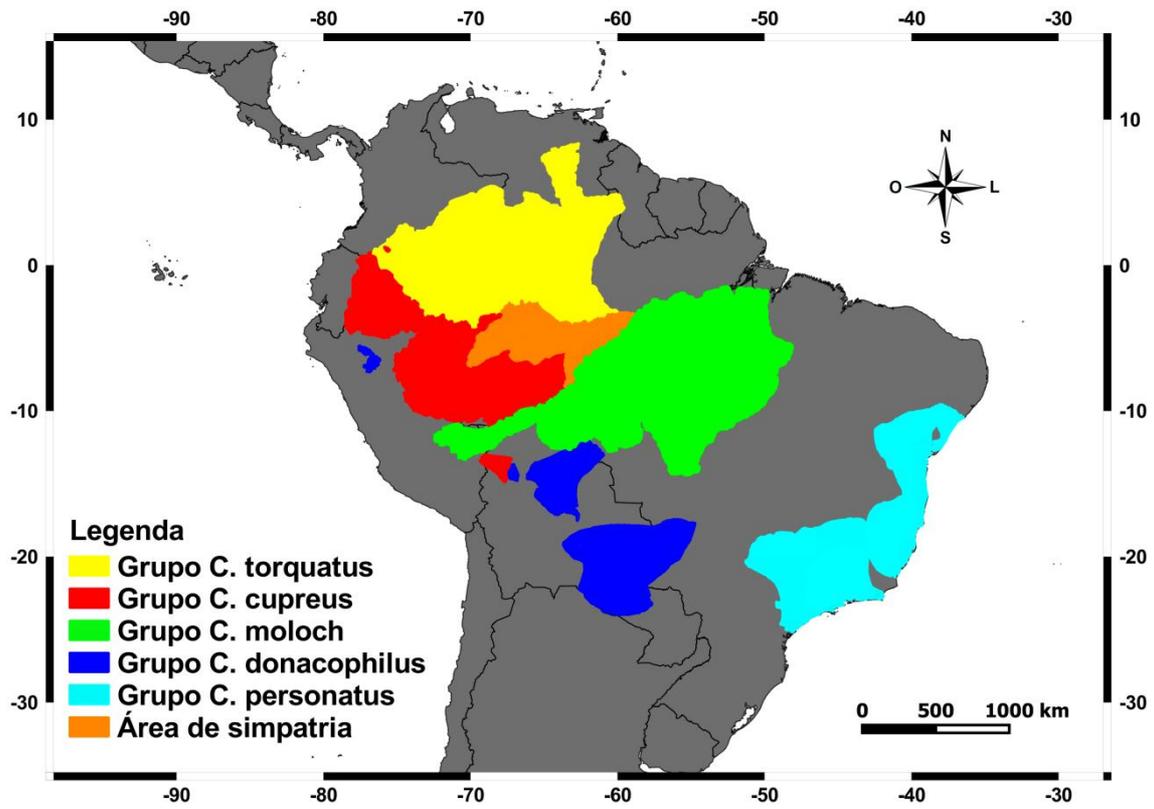


Fig. 2 Ilustração de dois tamanhos de fragmentos com os mesmos *primers*, devido à presença ou ausência de um elemento *Alu*.

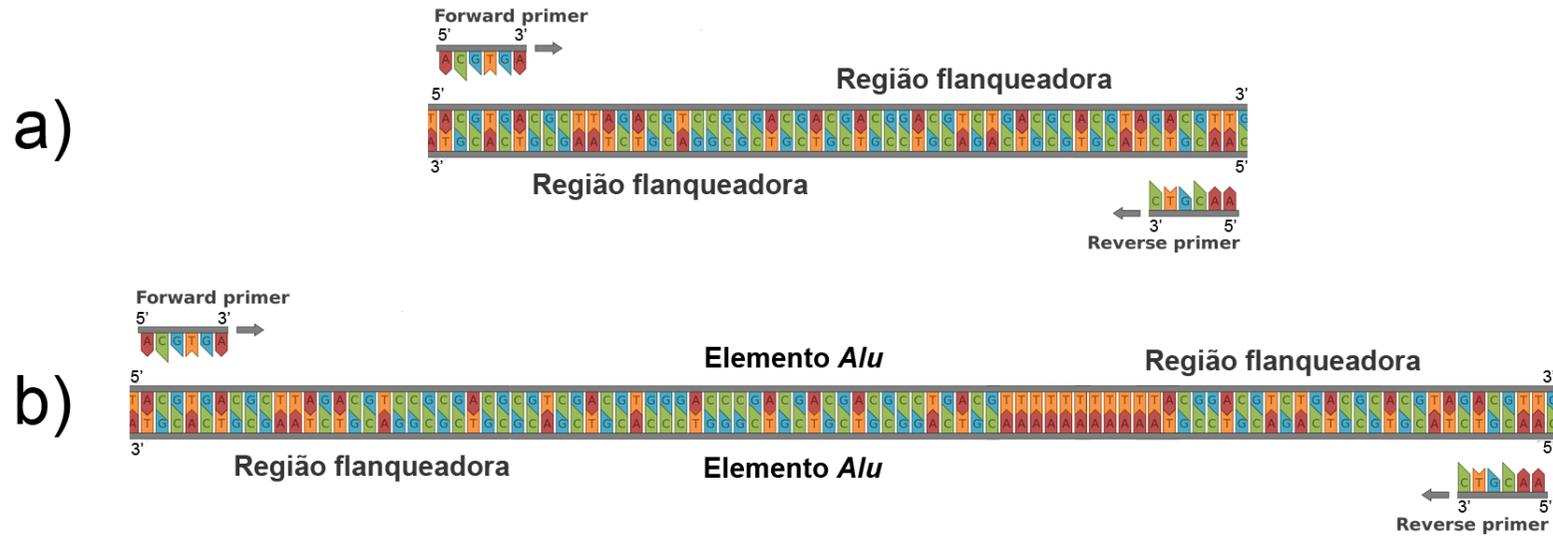
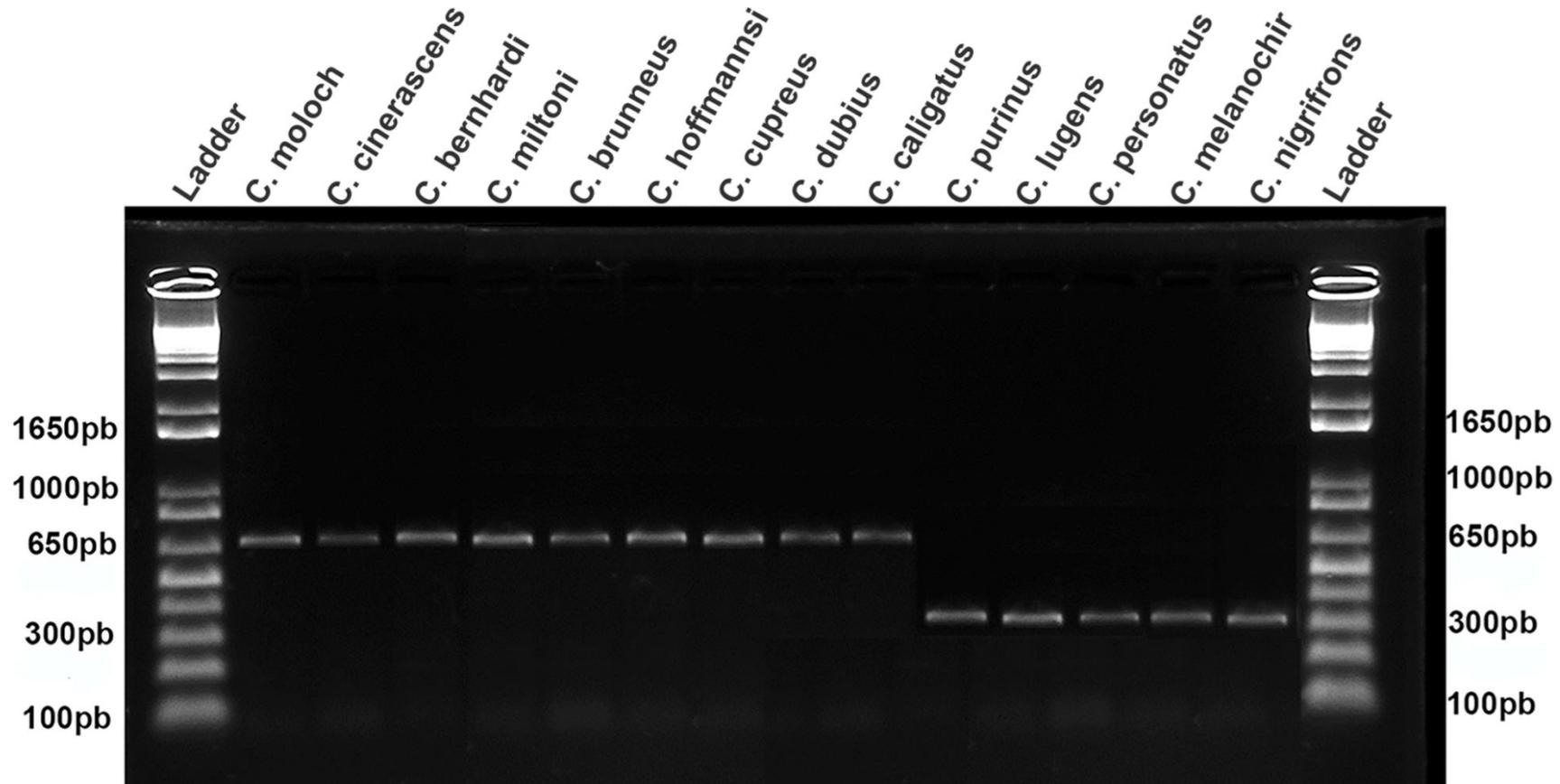


Fig. 3 Ilustração do gel de agarose com os fragmentos da inserção *Alu* Callicebus4 em 14 espécies do gênero *Callicebus*.



CAPÍTULO III

Datação molecular entre espécies do gênero *Callicebus* apoiam origem nos últimos

3 Ma dos rios amazônicos

Resumo

Várias hipóteses tentam explicar porque a Amazonia é um dos lugares mais biodiversos do mundo. Uma das mais antigas é a hipótese dos rios como barreiras. Entretanto, há atualmente uma discordância sobre a data da origem dos rios amazônicos e duas hipóteses de datação são predominantes no momento: i) os rios tiveram origem no Mioceno superior e as bacias hidrográficas estavam com a fisionomia atual antes de 2.5 Ma; ii) os rios foram formados a menos de 3 Ma. Para testar ambas as hipóteses de datação, realizamos análises filogenéticas com estimativas dos tempos de divergência das espécies e análises biogeográficas a partir de um conjunto de dados multilocus de um grupo de espécie do gênero *Callicebus*. A resolução taxonômica atual sugere cinco grupos de espécies para o gênero, aqui nós usamos o grupo *C. moloch*. Nossos resultados corroboram a hipótese de formação dos rios amazônicos nos últimos 3 Ma, contudo nem todas as diversificações podem ser explicadas pela teoria dos rios. Além disto, verificamos que os diferentes grupos de espécies de *Callicebus* são todos oriundos de radiações da Amazônia em diferentes momentos durante o Mioceno superior. Nossos resultados também sugerem que o gênero *Callicebus* é composto por apenas quatro grupos de espécies e que o conhecimento atual da diversidade de *Callicebus* está subestimado, desta forma espécies que diversificaram recentemente estão negligenciadas taxonomicamente, o que aumenta os riscos de extinção.

Palavras chaves: *Callicebus*, rios, Amazônia, biogeografia, datação, hipótese dos rios.

Abstract

Several hypotheses try to explain why Amazonia is one of the most biodiverse places in the world. One of the oldest is the case of rivers as barriers. However, there is currently a disagreement about the date of origin of the Amazon river, and two estimate dates are prevalent at the time: i) the rivers originate in the upper Miocene and watersheds are with the current configuration before 2.5 Ma; ii) the rivers were formed within 3 Ma. To test both hypotheses, we performed phylogenetic analysis with estimates of divergence times of species and biogeographic analyzes from a set of multilocus data from a species group of the genus *Callicebus*. The current taxonomic resolution suggests five groups of species for the genus. Here we use the *C. moloch* group. Our results support the hypothesis of origing of Amazonian rivers in the last 3 Ma, however not all diversification can be explained by the theory of rivers. In addition, we found that the different groups of species of *Callicebus* are all from radiation in the Amazonia at different times during the upper Miocene. Our results also suggest that the current knowledge of *Callicebus* diversity is underestimated, and that recently diversified species are taxonomically neglected, which increases the risk of extinction.

Keywords: *Callicebus*, rivers, Amazon, biogeography, timing, hypothesis.

Introdução

Modelos biogeográficos para diversificação na Amazônia

A biogeografia é uma ciência historicamente dividida em duas disciplinas, a biogeografia ecológica e biogeografia histórica (Crisci et al., 2003). Ambas têm como objetivo entender quais os padrões e processos que influenciaram a distribuição dos táxons no passado e no presente. Contudo, a primeira utiliza um foco ecológico nas suas explicações e geralmente preocupa-se com processos relativamente recentes, enquanto a segunda concentra-se em processos, tais como, eventos paleogeológicos e paleoclimáticos ocorridos há milhares ou milhões de anos (Brown e Lomolino, 1998). Atualmente, a biogeografia histórica tem se beneficiado dos avanços das abordagens moleculares e da bioinformática para refinar os testes de hipóteses de diversificação de espécies (Khuner, 2009; Hickerson et al., 2010). A maioria das hipóteses inferidas para a biodiversidade Amazônica baseia-se em mudanças climáticas e evolução geológica (Wallace, 1852; Haffer, 1969; Ayres e Clutton-Brock, 1992).

Uma das primeiras hipóteses foi baseada nas observações de Alfred R. Wallace, quando este esteve na Amazônia em meados do século dezenove. Wallace (1852) verificou que a dispersão dos primatas amazônicos era limitada pelos grandes rios. Estudos posteriores também verificaram um padrão similar para outros organismos (Sick, 1967; Ribas et al., 2012). E assim surgiu a hipótese dos rios como uma explicação para a biodiversidade encontrada atualmente na Amazônia. Esta hipótese sugere que populações ancestrais foram separadas em margens opostas durante a formação dos rios, propiciando a especiação depois de algumas gerações (Wallace 1852; Sick, 1967). Entretanto, restam dúvidas sobre a real importância dos rios no processo de diversificação das espécies, assim como, uma datação acurada da formação

do rio Amazonas e seus principais afluentes. Recentemente, Hoorn et al. (2010) destacaram o soergimento das Cordilheiras dos Andes como um dos principais motores para formação dos rios amazônicos, estes autores sugerem que depois de um complexo cenário de eventos geológicos, a cerca de 10 Ma, o rio Amazonas começou a ter características semelhantes as atuais. Entretanto, Ribas et al. (2012) com base na diversificação de um grupo de aves propuseram que os principais rios da bacia Amazônica foram formados nos últimos 3 milhões de anos (Ma). Boubli et al. (2015) testaram a influência de dois relevantes rios amazônicos (Rio Negro e Rio Branco) na diversificação de espécies de primatas reciprocamente monofiléticos que ocupam margens opostas destes rios e encontraram tempos de diversificação inferiores a 2 Ma para maioria dos táxons testados. Resultados similares foram encontrados por Lynch Alfaro et al., (2015a) para a diversificação do gênero *Saimiri*. Vale ressaltar que diferente de Ribas et al. (2012), tanto Boubli et al. (2015) quanto Lynch Alfaro et al. (2015a) realizaram suas inferências com bases apenas em dados do genoma mitocondrial. Logo, a hipótese de formação dos rios amazônicos durante o Pleistoceno ainda não foi testada a luz de uma filogenia com dados multilocus para primatas.

Taxonomia do grupo Callicebus moloch

Atualmente são reconhecidas 32 espécies para o gênero *Callicebus* (Rylands et al., 2012; Gualda-Barros et al., 2012; Dalponte et al., 2014). Estas estão organizadas em cinco grupos de espécies: *Callicebus torquatus*, *Callicebus moloch*, *Callicebus cupreus*, *Callicebus donacophilus* e *Callicebus personatus* (Van Roosmalen et al., 2002). Os agrupamentos foram baseados em caracteres morfológicos e distribuição geográfica. Entretanto, Groves (2005) e Silva Júnior et al. (2007) observaram que as espécies do grupo *C. torquatus* apresentam características muito distintas dos demais *Callicebus* e propuseram o subgênero *Torquatus* para aloca-lo, enquanto as demais espécies dos

outros grupos compõem o subgênero *Callicebus* (Tabela 1). Dentre os quatro grupos do Subgênero *Callicebus*, o grupo *C. moloch* foi o que sofreu maiores modificações taxonômicas. Hershkovitz (1988, 1990) propôs a primeira composição do grupo com 14 táxons. Em seguida, Kobayashi (1995) utilizando dados morfométricos dividiu o grupo *C. moloch* em três grupos distintos, o que propiciou a formação dos atuais grupos *C. cupreus* e *C. personatus*, desta forma o grupo *C. moloch* ficou constituído de apenas cinco táxons. Estudos posteriores identificaram e descreveram mais três espécies, portanto, segundo a taxonomia atual, o grupo *C. moloch* é composto pelas espécies: *Callicebus moloch*, *C. vieirai*, *C. hoffmannsi*, *C. baptista*, *C. cinerascens*, *C. miltoni*, *C. bernhardi*, *C. brunneus* (Van Roosmalen et al., 2002; Gualda-Barros et al., 2012; Dalponte et al., 2014).

Distribuição geográfica do grupo C. moloch

As espécies do grupo *C. moloch* habitam áreas de terra firme na floresta Amazônica, mas no período das cheias estes se aventuram nas áreas de várzeas, devido maior disponibilidade de recursos (Van Roosmalen et al., 2002). Entretanto, é pequena a probabilidade destes primatas se deslocarem de uma margem para outra dos rios, os quais desempenham um papel relevante como barreira geográfica (Norconk, 2007). O grupo *C. moloch* ocorre na porção oriental-sul da bacia Amazônica, tendo como limites a bacia Tocantins-Araguaia a leste e o rio Madeira a Oeste (Fig. 1).

A história evolutiva do grupo *C. moloch* parece estar intimamente ligada aos eventos formadores da biodiversidade na Amazônia. Portanto, a partir de uma resolução taxonômica acurada será possível a compreensão dos processos que foram fundamentais para os padrões de diversificação e distribuição observados atualmente. Neste trabalho vamos investigar se o grupo *Callicebus moloch* (*sensu* Van Roosmalen et al. 2002, Groves, 2001, 2005; Silva-Júnior et al., 2007) é um grupo monofilético. Por outro lado,

as estimativas do tempo de diversificação entre as espécies e análises biogeográficas serão utilizadas para derivar estimativas do momento em que os rios da Amazônia foram formados.

Material e métodos

Amostras e marcadores moleculares

Foram obtidos DNA de 88 espécimes a partir de amostras de sangue e tecido muscular preservado em álcool, doadas por coleções científicas (Museu Paraense Emílio Goeldi [MPEG], Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia [INPA]), bancos de tecidos da (Universidade Federal do Pará [UFPA] – Campus de Bragança e Universidade Federal de Rondônia [UNIR]) e Centros de Primatas do Brasil (CPRJ e CENP). Os indivíduos foram identificados no nível de espécie por caracteres morfológicos, principalmente o padrão de coloração da pelagem (*sensu* Van Roosmalen, 2002). Incluímos nas nossas análises uma sequência depositada no GenBank com o código: 019801. Na Fig. 2 são mostradas as localizações das amostras e na Tabela 2 constam os detalhes sobre cada localidade.

Nossas inferências foram baseadas em 13 marcadores moleculares. Utilizamos três fragmentos do mtDNA: 16S= 543 pares de bases (pb); citocromo oxidase subunidade I (COI)= 605 pb; e citocromo *b* (CYT *b*)= 1074 pb. Além de dez fragmentos do DNA nuclear. Tais fragmentos são elementos *Alu* com suas regiões flangeadoras (Tabela S1). Os fragmentos do DNA nuclear juntos somam 4899 pb.

Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

O DNA total foi obtido com o auxílio do Kit Wizard Genomic da Promega, de acordo com o protocolo do fabricante. Pela técnica de reação em cadeia da polimerase realizamos a amplificação dos fragmentos de interesse. A PCR foi realizada com 15 µl de volume final, contendo aproximadamente 30ng de DNA genômico; 2.4 µl de dNTPs (1.25mM); 1.5 µl de tampão 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl); 1 µl de MgCl₂ (25 mM); 1 µl de cada iniciador (0.2 µM) e 1 U de Taq DNA polimerase. Com exceção da temperatura de hibridação dos iniciadores, as demais etapas do protocolo de amplificação foram idênticas para todos os marcadores, as condições estão descritas a seguir: desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, com 35 ciclos de desnaturação de 94 °C por 30 s, hibridação, temperaturas (Tabela S1) por 40 s, extensão de 72 °C por 40 s, e extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR amplificados foram purificados com polietileno glicol (PEG) e álcool (Paithankar e Prasad, 1991). Posteriormente, as reações de sequência foram realizadas com o Kit BigDye Terminator Sequencing (Life technologies), e as amostras foram sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500xl (Life technologies).

Alinhamento das sequências, análises filogenéticas

As sequências de DNA foram alinhadas com o ClustalW (Thompson et al. 1994). Posteriormente, corrigidas manualmente no software BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 2004). Para verificarmos se existia saturação em nosso banco de dados, foi realizado o teste de saturação no DAMBE 5.3.109 (Xia, 2013).

Particionar um conjunto de dados moleculares envolve juntar em blocos distintos, sítios que variam a taxas similares, onde cada partição terá seu modelo evolutivo mais apropriado (Ho e Lanfear, 2010). Contudo, escolher o esquema mais adequado de particionamento do banco é um problema central para precisão da inferência filogenética (Lanfear et al. 2012). Nós particionamos o banco em 22 regiões

(marcadores mitocondriais e os *Alus* separados de suas regiões flangeadoras [ver detalhes, Tabela S2]). A identificação da posição dos *Alus* e regiões flangeadoras foram realizadas no RepeatMasker (Smit e Green, 2015). Foram testados estatisticamente cinco esquemas de partições, assim como, o melhor modelo evolutivo com o programa PartitionFinder 1.1.0 (Lanfear et al. 2012) (Tabela S2). As configurações utilizadas no PartitionFinder foram: busca pelo método *greedy* (busca heurística do melhor esquema de partição) com comprimentos de ramos não ligados (cada partição tem seu próprio independente conjunto de ramos) e o critério de informação bayesiano (BIC). A reconstrução filogenética por máxima verossimilhança foi realizada no RaxML (Stamatakis, 2006) via interface gráfica (RaxMLGUI 1.31; Silvestro e Michalak, 2012), com auxílio do PYTHON 2.7 (<http://www.python.org/download/releases/2.7>) com configurações de 100 corridas e 1000 réplicas de bootstap. A inferência bayesiana (IB) foi conduzida no MrBayes v. 3.2.1. (Ronquist et al., 2011). Esta análise foi configurada para rodar duas réplicas, cada réplica com quatro cadeias de Markov-Chain Monte Carlo (MCMC), sendo uma cadeia fria e três quentes com o parâmetro de 0.30 das cadeias quentes em relação à fria, com uma corrida de 500.000 gerações, realizando uma amostragem a cada 5.000. As primeiras 25% gerações da corrida foram descartados no burn-in (Ronquist et al., 2011). No Tracer v. 1.6 (Rambaut et al., 2014) a fase estacionária das corridas foi verificada e , consideramos valores de effective sample size (ESS) acima de 200 como adequados. As distâncias genéticas entre os espécimes foram avaliadas no software MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) com o modelo Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980).

Delimitação de espécies

Nos últimos anos surgiram alguns métodos de delimitação de espécies a partir de dados moleculares (Hausdorf e Hennig, 2010; O'Meara, 2010; Yang e Rannala, 2010; Hulsenbeck et al. 2011). Carstens et al. (2013) acreditam que em nenhum outro momento os pesquisadores tiveram ferramentas metodológicas melhores que as atuais para estimar as fronteiras entre as espécies. Aqui usamos o programa Bayesian Phylogeny and Phylogeography (BP&P) v. 3.0 (Rannala e Yang, 2013; Yang e Rannala, 2010) que incorpora uma abordagem Bayesiana para estimar a probabilidade de especiação entre dois táxons a partir de um modelo coalescente multilocus. Segundo Zhang et al. (2011) delimitações de espécies usando BP&P são sensíveis aos *priors* de tamanho populacional (θ) e tempo de divergência (τ). Por isso conduzimos a análise com as três diferentes combinações de θ e τ : (grande N_e e divergência antiga: θ e τ priors gamma α [1, 10] e β [1, 10]; pequeno N_e e divergência recente: θ e τ priors gamma α [2, 2000] e β [2, 2000] e grande N_e e divergência recente: α [1, 10] e β [2, 2000]) (Leaché e Fujita, 2010). Corremos cada análise com 500.000 gerações, amostrando a cada cinco e com *burn-in* 25.000 gerações, com *fine-tune default*.

Árvore de espécie, tempo de divergência e análises biogeográficas

As estimativas dos tempos de divergência entre os táxons, assim como a árvore de espécies foram realizadas no *BEAST (Heled e Drummond, 2010) implementado no BEAST 1.8.1 (Drummond et al., 2012). Para configurar a corrida foi gerado um arquivo BEAST xml no BEAUTI v. 1.8.1 com os seguintes parâmetros: os dados foram divididos em quatro partições (*Alus*, regiões flangeadoras dos *Alus*, mitocondrial codificante [COI e CYT *b*] e 16S) os modelos de substituição nucleotica foram GTR com heterogeneidade gamma para as duas primeiras partições e HKY para o 16S e os mitocondriais codificantes (COI, CYT *b*). Para os mitocondriais codificantes

selecionamos a opção de particionamento por posição de codon (1+2),3. A opção *Link Trees* foi usada para juntar os mitocondriais. Selecionamos o modelo de relógio relaxado lognormal não correlacionado para todas as partições, com *prior Yule Process* e modelo de tamanho populacional *Piecewise linear & constant root*. Três pontos de calibração foram utilizados, sendo dois deles baseados em datas inferidas por estudos anteriores: i) a separação entre *Pithecia* e *Chiropotes/Cacajao* 13.69 Ma (HPD 18.34 – 9.24); ii) a separação entre *Cacajao* e *Chiropotes* 7.51 Ma (HPD 10.88 – 4.36) (Perelman et al., 2011). E uma calibração baseada em dados do registro fóssil, que estima um gênero irmão de *Callicebus*, encontrado em La Venta, Colombia, chamado *Miocallicebus* datado de 13 milhões de anos (Takai et al., 2001). Realizamos duas corridas com 300 milhões de gerações, posteriormente avaliadas no Tracer v.1.6 (Rambaut et al., 2014). Os logs das duas corridas foram combinados no LogCombiner v. 1.8.1 e no TreeAnnotator v. 1.8.1 as árvores foram sumarizadas, com exclusão dos 20% iniciais por burn-in. Todas as árvores geradas (ML, IB, delimitação de espécies e árvore de espécies) foram visualizadas e editadas no FigTree v. 1.4.2 (Rambaut, 2012).

Análises biogeográficas foram conduzidas usando RASP v. 3.0 (Yu et al., 2014). Aplicamos o método Statistical Dispersal-Vicariance Analysis (S-DIVA; Yu et al., 2010) usando os arquivos da árvore de espécies obtidos no BEAST. As áreas geográficas de cada táxon foram definidas com base nas oito áreas de endemismo reconhecidas na Amazônia para vertebrados (Cracraft, 1985; Silva et al., 2005; Ribas et al., 2012), exceto a área de endemismo Belém, pois não temos amostras dessa área, o que impossibilitou incluí-la nas análises com S-DIVA. Também definimos a Mata Atlântica e o Chaco como possíveis áreas ancestrais, na Tabela 2 são mostradas as áreas de cada amostra. Todas as áreas foram codificadas da seguinte maneira: A- Xingu; B- Tapajós; C- Rondônia; D- Inambari; E- Napo; F- Imeri; G- Guiana; H- Mata Atlântica;

I- Chaco. *Pithecia pithecia* foi selecionado como grupo externo e o número máximo de áreas ancestrais nas reconstruções foi três.

Resultados

Banco de dados, dados faltantes e saturação

Neste estudo usamos uma abordagem multilocos com dez marcadores do genoma nuclear (elementos *Alus* e regiões flanqueadoras) e três mitocondriais (16S, COI e CYT *b*). Geramos 954 sequências que correspondem a 88,4% do número de possíveis sequências (ver detalhes, Tabela S3), os marcadores nucleares e mitocondriais somaram 4899 e 2222 pb, respectivamente, num total de 7121 pb. As sequências faltantes foram em decorrência de pouco material biológico disponível para algumas amostras ou pelo fracasso de amplificação. Entretanto, Jiang et al. (2014) testaram o impacto de *missing data* nas análises filogenéticas e concluíram que marcadores com dados faltantes não devem ser retirados da análise. Pelo contrário, estes podem ajudar na resolução de nós mal suportados.

O teste de saturação do banco de dados não apresentou perda de sinal filogenético, (dados não mostrados).

Análises filogenéticas e divergência genética

Os métodos probabilísticos de ML e IB obtiveram topologias com altos valores de suporte para grande maioria dos nós, e ambos produziram topologias muito similares (Fig. 3a, b). Nossas análises recuperaram o grupo *C. torquatus* como o mais basal entre os *Callicebus*. Observamos que posteriormente diversificaram as espécies que habitam a Mata Atlântica, grupo *C. personatus* e a seguir o grupo *C. donacophilus*. Em desacordo

com a taxonomia atual, duas espécies que atualmente são reconhecidas como pertencentes ao grupo *C. moloch* (*C. brunneus* e *C. hoffmannsi*) agruparam com as espécies do grupo *C. cupreus*. A partir dos resultados observados incluímos *C. brunneus* e *C. hoffmannsi* como pertencentes ao grupo *C. cupreus* e verificamos as distâncias genéticas entre os dois grupos de espécies (Tabela, S4).

Com todos os marcadores concatenados numa suprematriz verificamos que a distância genética média entre os grupos *C. moloch* e *C. cupreus* é 1.9% (máximo de 2.8% e mínimo de 1.5%). Essa distância genética é similar às divergências encontradas entre as espécies que pertencem ao mesmo grupo, para citar alguns exemplos: *C. cupreus* e *C. dubius*, 1.8%; *C. bernhardi* e *C. cinerascens*, 2.1% e *C. personatus* e *C. melanochir* 2.8% (dados não mostrados).

Delimitação de espécies

A maioria das espécies atualmente reconhecidas foi recuperada nas nossas análises com altos valores de suporte. Além disto, observamos a presença de subclados bem suportados. Desta forma selecionamos 17 terminais (Fig. S1) (Clados das árvores de ML e IB) como eventuais espécies para investigar com uma abordagem bayesiana. As espécies do grupo *C. torquatus*, *C. personatus* e *C. donacophilus* não foram utilizadas nesta análise e por limitações computacionais os 17 terminais foram divididos em dois grupos ([clados I – VI] e [clados VII – XVII]).

Consideramos suportes estatísticos acima de 95% para assumir a especiação entre dois táxons. As estimativas foram realizadas testando três cenários de tamanho populacional e tempo de divergência. Tais cenários mostraram variações no valor de suporte dos nós, entretanto, essas variações não representaram discordâncias nos resultados das delimitações de espécies. No primeiro grupo testado (clados I – VI) todos

os nós tiveram valor máximo de suporte. As análises recuperam como válidas as espécies reconhecidas atualmente e a novidade foi uma diversificação na espécie *C. cupreus* (Fig. 4a). No segundo grupo (clados VII – XVII) das 11 possíveis espécies testadas, nossas análises recuperaram dez terminais com altos valores de suporte (Fig. 4b). As duas espécies recentemente reconhecidas e descritas foram recuperadas (*C. vieirai* e *C. miltoni*) e em *C. bernhardi*, *C. cinerascens* e *C. moloch* encontramos mais diversidade do que o reconhecido atualmente (Fig. 4b).

Árvore de espécies e tempo de divergência

As espécies foram definidas com base nos resultados obtidos no BP&P e as estimativas de tempo de divergência entre estas são mostradas na Fig. 5 e Tabela 4.

A estimativa do tempo médio de divergência de *Callicebus* para os demais Pitheciidae foi 21.04 Ma com intervalos de credibilidade de 95% de HPD (highest posterior densities) (19.59 – 22.49 Ma). A idade do ancestral comum dos *Callicebus* viventes foi estimada de 12.36 Ma (9.81 – 15.48 Ma). O grupo *C. donacophilus* é irmão do grupo *C. moloch* e a estimativa de divergência foi 5.41 Ma (3.76 – 6.97). As espécies do grupo *C. moloch* diversificaram apenas nos últimos 2.7 Ma (2.0 – 3.5 Ma), portanto, em um período de tempo extremamente pequeno aconteceram muitas diversificações na porção sul da bacia Amazônica.

Análises biogeográficas

A análise no S-DIVA explicou a distribuição atual dos *Callicebus* com sete eventos de vicariância e cinco de dispersão (Figura 6). S-DIVA recuperou a área de endemismo Rondônia como a mais provável distribuição do ancestral dos *Callicebus*. A análise sugere que uma dispersão para o norte da Amazônia deu origem ao grupo *C.*

torquatus. Posteriormente um único evento vicariante deu origem aos *Callicebus* da Mata Atlântica. O ancestral dos grupos *C. moloch* e *C. donacophilus* ocupava uma ampla de distribuição, desde o Sul da Amazônia até a atual região do Chaco. E a distribuição do ancestral do grupo *C. moloch* também foi nas proximidades da atual área de endemismo Rondônia. Quanto aos eventos biogeográficos nas espécies do grupo *C. moloch*, S-DIVA recuperou três vicariâncias: i) a que separou *C. hoffmannsi* do seu clado irmão; ii) a que separou a espécie ancestral dos *C. bernhardi* e *C. moloch* e por fim a vicariância que gerou a diversificação entre os *C. moloch* Tapajós e *C. moloch* Tocantins/Xingu.

Discussão

Teste da hipótese dos rios amazônicos formados durante o Pleistoceno

Espécies são consideradas a unidade fundamental para análises evolutivas, entretanto, muitas vezes não é simples estabelecer os limites entre elas. Isto porque vários fatores dificultam o trabalho do sistemata, dentre estes o próprio mecanismo evolutivo, que é gradual e contínuo. Mesmo nos casos onde o fluxo gênico é interrompido de forma abrupta, e não ocorreu introgressão gênica nas gerações posteriores, as análises podem sofrer influência da separação incompleta de linhagens. Contudo, recentemente em função do acesso conjuntos de dados moleculares cada vez mais abundantes, a influência do polimorfismo ancestral em árvores de espécies tem sido minimizada. Isto, associado ao aumento na capacidade computacional e novas abordagens para delimitação de espécies tem propiciado uma oportunidade ímpar para o avanço do conhecimento taxonômico dos organismos e refinamento dos testes de hipóteses de diversificação.

Uma das primeiras hipóteses que tentou explicar a biodiversidade na Amazônia foi a dos rios como barreiras (Wallace, 1852). Essa hipótese parte das seguintes premissas: i) táxons irmãos, que são reciprocamente monofiléticos, devem ocupar margem opostas do rio; ii) a datação da separação entre os táxons deve ser congruente com a origem do rio.

Nossos resultados corroboram a hipótese de formação das bacias hidrográficas Amazônicas durante o Pleistocênio. *C. lugens* e *C. purinus* estão em margens opostas do rio Amazonas, as análises biogeográficas mostram que um evento vicariante separou populações do ancestral destas duas espécies há 3.4 Ma (2.69 – 4.35 Ma). A sequência de formação dos rios propostas por Ribas et al., (2012) também foi recuperada pelos nossos dados. Rio Madeira (*C. hoffmannsi* e clado irmão 2.48 Ma [1.85 – 3.16 Ma]); Rio Tapajós (*C. bernhardi* e *C. moloch* 1.74 Ma [1.21 – 2.32 Ma]); Rio Xingu (*C. vieirai* e *C. moloch* Tocantins/Xingu 0.78 Ma [0.45 Ma – 1.14 Ma]). Rios de menor porte que os citados acima aparentemente também tiveram papel decisivo na diversificação de algumas espécies de *Callicebus*. Parece ter sido o caso da separação entre as espécies *C. miltoni* e *C. cinerascens* separada geograficamente pelo rio Aripuanã e o rio Jiparaná que também separa duas linhagens de *C. bernhardi*. Usamos na filogenia as datações de diversificação para inferir o momento da formação de alguns desses rios de menor porte (Tabela 3).

Contudo, apenas a hipótese dos rios como barreiras não explica toda diversidade encontrada. Algumas espécies diversificaram nos últimos 300 mil anos (Tabela 4), e estas não possuem nenhuma barreira física evidente, além da distância geográfica. Este é o caso das duas linhagens de *C. cinerascens* que foram recuperadas nas nossas filogenias. Portanto, outras hipóteses de diversificação devem ser consideradas para explicar a diversidade desses primatas. Recentemente Smith et al.,

(2014) a partir da filogenômica de 27 gêneros de aves Neotropicais deduziram que atributos ecológicos, tais como capacidade de dispersão tiveram papel tão ou mais importante na especiação que os eventos vicariantes causados por mudanças na paisagem. Espécies com menor capacidade de dispersão tendem a acumular mais diferenças genéticas entre as populações, levando a maiores taxa de especiação (Wakeley e Aliacar, 2001). *Callicebus* são primatas altamente territorialistas, monogâmicos e formam pequenos grupos, entre dois e sete indivíduos, geralmente o casal e seus filhotes (Norconk, 2007). Frequentemente os adultos utilizam uma potente vocalização para delimitar o território (Kinzey e Robinson, 1983). Tais características biológicas sugerem que a taxa de especiação em *Callicebus* seja mais elevada do que de outros primatas, o que explicaria a alta diversidade do gênero.

Quantos e quais grupos de espécies para Callicebus?

Taxonomicamente *Callicebus* foi organizado em grupos de espécies, as primeiras inferências foram propostas por Hershkovitz (1963, 1988, 1990). Contudo, a classificação aceita atualmente originou-se a partir do estudo de Kobayashi (1995) que identificou cinco grupos de espécies, separando os grupos *C. cupreus* e *C. personatus* do grupo *C. moloch*. Autores subsequentes seguiram usando a classificação proposta por Kobayashi. Entretanto, dados moleculares ainda não haviam sido utilizados para recuperar as relações filogenéticas dentro do gênero. Os estudos que usaram dados moleculares e *Callicebus* nas suas inferências possuíam foco filogenético acima do nível de gênero (Perelman, 2011; Schneider et al., 1993). Os dados recuperam indiscutivelmente os grupos *C. torquatus*, *C. personatus* e *C. donacophilus*. Entretanto, as análises de divergência genética, assim como as topologias geradas nos métodos probabilísticos e as estimativas de tempo de divergência sugerem uma separação

extremamente pequena entre os grupos *C. moloch* e *C. cupreus*. Se a separação é suficiente para considerarmos estes dois como grupos distintos, essa é uma questão puramente taxonômica. Aqui nós consideramos juntá-los, acreditamos que a divergência genética entre os dois grupos deveria ser superior às divergências encontradas entre as espécies que compõem um mesmo grupo, e isto não foi observado. Com relação às características morfológicas, os dois grupos não possuem características claramente exclusivas, tanto que duas espécies que eram consideradas do grupo *C. moloch* (*C. brunneus* e *C. hoffmannsi*) agruparam com os *cupreus*. Dados citogenéticos também corroboram nossos achados. Estudos demonstraram que o número diploide $2n$ é bastante similar nas espécies *C. moloch* e *C. cupreus*, enquanto, outras espécies de outros grupos possuem menos que a metade deste $2n$ (Pieczarka, Nagamashi 1988, De Boer, 1974, Bonvicino et al., 2003). Os dois grupos apresentam distribuição geográfica alopátrica, separados pelo rio Madeira. Este rio é uma importante barreira geográfica para vários táxons, tanto que ele delimita duas áreas de endemismo na Amazônia (Rondônia e Inambari). Entretanto, as espécies *C. brunneus* e *C. hoffmannsi* que estão a leste do Madeira são mais próximas das espécies que estão a oeste, o que sugere um contato no passado recente entre espécies de margens opostas.

Cenário biogeográfico e origem do grupo C. moloch

Nossas estimativas sugerem que durante o Mioceno superior, a cerca 12.3 Ma (9.8 – 15.4 Ma) a distribuição do ancestral dos *Callicebus* atuais estendia-se do sul da Amazônia, nas proximidades da atual área de endemismo Rondônia e que populações desse ancestral dispersaram para norte dando origem ao grupo *C. torquatus*. Estudos anteriores sugerem que a linhagem que deu origem aos Platyrrhini atuais ocupava a bacia Amazônica (Lynch Alfaro et al. 2015b; Kiesling et al. 2015). De fato, parece que

a primeiras diversificação intragênicas dos Platyrrhini ocorreram na Amazônia, posteriormente alguns desses táxons que diversificaram irradiaram para outras regiões.

Os *Callicebus* da Mata Atlântica foram o segundo grupo a diversificar no gênero. O estreito relacionamento entre táxons da Mata Atlântica e Amazônia também já foi relatado para outros Platyrrhini, assim como diversos outros grupos de organismos (Costa, 2003; Buckner et al. 2015; Thom e Aleixo, 2015). Isto sugere que as florestas estiveram conectadas ou que haviam corredores florestais que serviram de rotas de dispersão entre os dois biomas durante algum momento do Mioceno superior. Entretanto, devido a mudanças climáticas que deixavam o clima do Planeta mais frio e seco (Blisniuk et al., 2005, Zachos et al., 2001), a conexão entre as florestas deve ter sido quebrada por várias vezes desde o Mioceno superior. Provavelmente um desses rompimentos de contato entre as florestas isolou *Callicebus* na Mata Atlântica dando origem ao grupo *C. personatus*. Nossas estimativas datam que esta vicariância ocorreu há 10.5 Ma (7.9 - 13.2 Ma).

No início do Plioceno aconteceu à diversificação entre os grupos *C. donacophilus* e *C. moloch*. O ancestral de ambos os grupos estava distribuído entre o Sul da Amazônia e o atual bioma do Chaco. Entretanto, nossas deduções são limitadas quanto a essa diversificação, por uma questão amostral do grupo *C. donacophilus*. Em contrapartida, nossos resultados mostram alta probabilidade do ancestral do grupo *C. moloch* ter ocupado a porção sudoeste da bacia Amazônica a 2.7 Ma (2.0 – 3.5 Ma).

Nossos dados sugerem que a atual distribuição dos grupos de espécies do gênero *Callicebus* é decorrente de diferentes eventos de saída da Amazônia, e que possivelmente a porção sul deste bioma foi o centro de origem para os quatro grupos de espécies. Eventos de expansão e retração da floresta Amazônica são quase sempre relacionados às condições climáticas do Planeta. Acredita-se que em períodos de clima

frio e seco, durante glaciações, a floresta se retrai para regiões mais úmidas e quando inicia um período interglacial a floresta se expande novamente. Esse processo foi considerado por Haffer (1969) o principal mecanismo gerador de biodiversidade na Amazônia. Entretanto, dados paleoecológicos e estimativas de diversificação das espécies fizeram com que esta teoria fosse menosprezada (Colinvaux et al. 2000; Bush e Oliveira, 2006). Se de fato a retração da floresta e os refúgios florestas tiveram pouca ou nenhuma influência na biodiversidade Amazônica, isto ainda será tema para futuras discussões. Entretanto, as várias expansões da floresta Amazônica e conseqüentemente o contato com a Floresta Atlântica possivelmente mudaram de forma profunda a história evolutiva dos Platyrrhini.

Estudos anteriores demonstraram que todos os clados de primatas da Mata Atlântica possuem um estreito relacionamento com algum gênero da Amazônia (Lynch Alfaro et al. 2012; Schneider e Sampaio, 2015; Buckner et al., 2015). As datações entre estes diferentes clados sugere que aconteceram vários contatos e diversificações num período de 9 Ma durante o Mioceno superior (Lynch Alfaro, 2015). O que é perfeitamente plausível segundo os ciclos de Milankovitch. Tais contatos entre as florestas devem ter permitido que os calitriquídeos oriundos da Amazônia invadissem por duas vezes a Mata Atlântica. Que os *Sapajus* que voltaram para Amazônia fossem melhores competidores que os *Cebus*, provavelmente pelas pressões seletivas enfrentadas na empreitada, dentre outras histórias que ainda não conhecemos.

Conservação

Segundo a IUCN a maioria das espécies de *Callicebus* que habitam a floresta Amazônica é classificada como pouco preocupantes quanto a conservação. Muitas vezes a principal justificativa para essa classificação é o critério de ampla área de

distribuição, talvez *C. moloch* seja o melhor exemplo. Atualmente a distribuição dessa espécie segundo a IUCN (2015) estende-se da bacia Tocantins-Araguaia até o rio Tapajós, cerca de 700.000 Km², uma área superior ao território da Alemanha e Itália juntas. Entretanto, nossos resultados sugerem que *C. moloch* deve passar por uma revisão taxonômica e que provavelmente tratam-se de três espécies distintas. Neste novo panorama, cada espécie terá uma área de distribuição bem menor. Vale ressaltar que esta área na Amazônia é uma região com significativa ações antrópicas, como exemplo as hidrelétricas de Tucuruí e Belo Monte nos rios Tocantins e Xingu, respectivamente.

Embora tenhamos avançado bastante em algumas questões sobre a história evolucionária e da taxonomia de muitos gêneros dos primatas do Novo Mundo, a maioria deles, ainda carece de maiores estudos. Há ainda um grande caminho a ser percorrido para um conhecimento adequado da real diversidade destes habitantes das florestas para que possamos estabelecer medidas eficientes para a conservação dessa imensa diversidade específica.

Conclusão

Neste estudo testamos duas hipóteses de datação para rios amazônicos utilizando como base a filogenia e as estimativas de diversificação entre os táxons de um grupo de espécies do gênero *Callicebus*. Os dados suportam a hipótese de formação dos rios amazônicos nos últimos 3 Ma. Além disto, verifiquei que a diversidade deste grupo de primatas é maior que a reconhecida atualmente pela taxonomia e toda essa diversidade não deve ser atribuída exclusivamente à teoria dos rios. Adicionalmente, sugerimos juntar os atuais grupos *C. moloch* e *C. cupreus* num único grupo, e baseado em nossas estimativas de datação para os eventos biogeográficos também concluímos que ocorreram três eventos de irradiação a partir da porção sul da bacia Amazônica em

momentos distintos, e tais eventos deram origem aos grupos de espécies reconhecidos atualmente.

Referências

Ayres, J.M., Clutton-Brock, T.H., 1992. River boundaries and species range size in Amazonian Primates. *Am. Nat.* 140 (3), 531–537.

Blisniuk, P.M., Stern, L.A., Chamberlain, C.P., Idleman, B., Zeitler, P.K. 2005. Climatic and ecologic changes during Miocene surface uplift in the southern Patagonian Andes. *Earth Planet Sci Lett* 230, 125–142.

Bonvicino C.R., Penna-Firme V., Do Nascimento F.F., Lemos B., Stanyon R., Seuánez H.N. 2003 The lowest diploid number ($2n=16$) yet found in any primate: *Callicebus lugens* (Humboldt, 1811). *Folia Primatol* 74,141–149.

Buckner, J.C., Lynch Alfaro, J., Rylands, A.B., Alfaro, M.E., 2015. Biogeography of the marmosets and tamarins (Callitrichidae). *Molecular Phylogenetics Evolution* 82, 413–425.

Bush, M.B., de Oliveira, P.E. 2006. The rise and fall of the refugial hypothesis of Amazonian speciation: paleoecological perspective. *Biot. Neotrop.* 6, 1-7.

Boubli, J.P., Ribas, C. Alfaro J.W.L., Alfaro M.E., Silva M.N.F., Pinho G.M., Farias I.P. 2015 Spatial and temporal patterns of diversification on the Amazon: A test of the riverine hypothesis for all diurnal primates of Rio Negro and Rio Branco in Brazil. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 400–412.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.005>

Brown, J.H., Lomolino, M.V. 1998 . Biogeography 2nd edition. Sinauer, Sunderland, MA.

Cartens, B.C., Pelletier, T.A., Reid, N.M., Satler, J.D. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22, 4369-4383. doi:10.1111/mec.12413.

Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*. 30, 71–86.

Colinvaux, P.A., de Oliveira, P.E., Bush, M.B. 2000. Amazonian and Neotropical plant communities on glacial time scales: The failure of the aridity and refuge hipotesis. *Quat. Sci. Rev.* 19, 141-169.

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

Crisci, J. V., Katinas L., Posadas, P. 2003. *Historical Biogeography: na introdução*. Harvard University Press.

De Boer, L.E.M. 1974. Cytotaxonomy of the Platyrrhini (Primates). *Genen Phaenen.* 17,1-115.

Dalponte, J.C., Felipe Ennes, S., Silva Júnior, J.S. 2014 New species of titi monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903 (Primates, Pitheciidae), from Southern Amazonia, Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 54:457-472.

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

Gualda-Barros, J., Oliveira do Nascimento, F., Kerr do Amaral, M. 2012. A new species of *Callicebus* Thomas, 1903 (Primates, Pitheciidae), from the states of Mato Grosso and Pará, Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 52,261-279.

Groves, C.P. 2005. Order Primates. In: Wilson DE, Reeder DM (Eds.), *Mammal species of the World, a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins, Baltimore, pp. 111-184.

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

Hall, T., 2004. BioEdit 7.0.0. <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>.

Hausdorf, B., Hennig, C. 2010. Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Systematic Biology* 59, 491–503.

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

Hershkovitz, P. 1963. A systematic and zoogeographic account of the monkeys of the genus *Callicebus* (Cebidae) of the Amazonas and Orinoco River basins. *Mammalia*. 271-80.

Hershkovitz, P. 1988. Origin, speciation, and distribution of South American titi monkeys, genus *Callicebus* (Family Cebidae, Platyrrhini). *Proc. Acad. National Science Philadelphia*. 140,240-272.

Hershkovitz, P. 1990. Titis, New World monkeys of the genus *Callicebus* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary taxonomic review. *Fieldiana, Zoology, New Series*. 55,1–109.

Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F., Yoder, A.D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54, 291–301.

Ho, S.Y., Lanfear, R. 2010. Improved characterization of among-lineage rate variation in cetacean mitogenomes using codon-partitioned relaxed clocks. *Mitochondrial DNA* 21, 138-146

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., et al., 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330, 927–931.

Huelsenbeck, J.P., Andolfatt, P., Huelsenbeck, E.T. 2011. Structurama: Bayesian Inference of Population Structure. *Evolutionary Bioinformatics* 7, 55-59.

IUCN, 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3, downloaded on 27 december 2014. Available from: <<http://www.iucnredlist.org>>.

Jiang, W., Chen, S.Y., Wang, H., Li, D., Wiens, J.J. 2014. Should genes with missing data be excluded from phylogenetic analyses? *Molecular Phylogenetics Evolution*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.006>.

Kiesling N.M.J., Yi S.V., Xu Ke, Sperone F. G., Wildman D.E. 2015. The tempo and mode of New World monkey evolution and biogeography in the context of phylogenomic analysis. *Molecular phylogenetics and evolution* 82, 386-399.

Khuner, M.K. 2009. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution* 24(2), 86-93.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.

Kinzey, W.G., Robinson, J.G. 1983. Intergroup louds calls, range size, and spacing in *Callicebus torquatus*. *American Journal of Physical Anthropology* 60(4), 539-544.

Kobayashi, S. 1995. A phylogenetic study of Titi Monkeys, Genus *Callicebus*, based on cranial measurements: I. Phyletic groups of *Callicebus*. *Primates* 36,101–120.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701.

Leaché, A.D., Fujita, M.K. 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biology sciences* 277, 3071-3077.

Lynch Alfaro, J.M., Boubli, J.P., Paim, F.P., Ribas, C. C., Silva M.N.F., Messias M.R., Röhe F., Mercês M.P., Silva Júnior, J.S., Silva C.R., G.M. Pinho, Koshkarian G., Nguyen M.T.T., Harada M.L., Rabelo R.M., Queiroz H.L., Alfaro M.E., Farias I.P. 2015. Biogeography of squirrel monkeys (genus *Saimiri*): South-central Amazon origin and rapid pan-Amazonian diversification of a lowland Primate. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 436-454.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.004>.

Lynch Alfaro, J.M., Cortés-Ortiz, L., Di Fiore, A., Boubli, J.P. 2015. Comparative biogeography of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 518-529.

Norconk, M.A. 2007. Sakis, uakaris, and titi monkeys: behavioral diversity in a radiation of primate seed predators. In: *South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation*. Springer, New York.

O'Meara, B.C. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology* 59, 59–73.

Paithankar, K.R, Prasad, K.S. 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res* 19, 1346.

Perelman, P., Johnson, W.E., Roos, C., et al., 2011. A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet.* 7, 1–17.

Pieczarka, J.C., Nagamachi, C.Y. 1988. The karyotype of *Callicebus moloch moloch* (Cebidae, Primates). *Rev. Brasil. Genet.* 11, 653-659.

Rambout, A. 2012. FigTree v. 1.4. University of Edinburgh, Edinburgh, Uk available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2014. Tracer v1.6, available from <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

Rannala, B., Yang, Z. 2013. Improved reversible jump algorithms for Bayesian species delimitation. *Genetics* 194(1), 245-253.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2011. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3), 539-542.

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. Biol. Sci.* 279 (1729), : 681–689. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2011.1120>.

Rylands, A.B., Mittermeier, R.A., Silva Jr., J.S., 2012. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *Int. Zoo Yearb.* 46, 11–24.

Schneider, H., schneider, M.P.C., Sampaio, M.I.C., Harada, M.L., Stanhope, M., Goodman, M. 1993. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2, 225-242.

Schneider, H. Sampaio, I. 2015. The systematics and evolution of New World primates – a review. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 348-357.

Sick, H. 1967. Rios e enchentes na Amazônia como obstáculo para avifauna. *Atas Simp. Sobre a Biota Amazônica* 5, 495-520.

Silva, J.M.C., Rylands, A.B., Fonseca, G.A.B., 2005. The fate of Amazonian areas of endemism. *Conserv. Biol.* 19, 689–694. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00705.x>.

Silva Júnior, J.S., Figueredo, W.M.B., Ferrari, S.F. 2013. Taxonomy and geographic distribution of the Pitheciidae. *Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis, and Uacaris*. Cambridge University Press. New York.

Silvestro, D., Michalak, I. 2012. RAxMLGUI: a graphic front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12, 335-337. DOI: 10.1007/s13127-011-0056-0

Smit, A.F.A., Green, P. 2015. RepeatMasker, available at: <http://repeatmasker.org>

Smith, B.T. et al., 2014. The drivers of tropical speciation. *Nature* 515(7527), 406-409.

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

Takai, M., Anaya, F., Suzuki, H., Shigehara, N., Setoguchi, T., 2001. A new platyrrhine from the middle Miocene of La Venta, Colombia, and the phyletic position of Callicebinae. *Anthropol. Sci. (Jpn.)* 109, 289–307.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12), 2725-2729.

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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 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 Res.* 22, 4673–4680.

Van Roosmalen, M.G.M., Van Roosmalen, T., Mittermeier, R.A. 2002 A taxonomic review of the titi monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the description of two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotropical Primates* 10(Supplement), 1–52.

Wakeley, J., Aliacar, N. 2001. Gene genealogies in a metapopulation. *Genetics* 159(2) 893-905.

Wallace, A. R. 1852. On the monkeys of the Amazon. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 20, 107–110.

Ward, R.D., Zemalak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions Royal Society B* 370, 1847-1857. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716.

Xia, X. 2013. Dambe5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30(7) 1720-1728.

Yang, Z., Rannala, B. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107, 9264-9269.

Yu, Y., Harris, A.J., He, X.-J. 2010. S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): a tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 848-850.

Yu, Y., Harris, A.J., He, X.-J. 2014. RASP (reconstruct ancestral state in phylogenies) 3.0. Available at: <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>

Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292, 686–693.

Tabela 1. Classificação taxonômica do gênero *Callicebus* (Groves, 2001, 2005; Silva Júnior et al., 2007).

Subgênero <i>Callicebus</i>		Subgênero <i>Torquatus</i>
Grupo <i>Callicebus donacophilus</i>	Grupo <i>Callicebus cupreus</i>	Grupo <i>Callicebus torquatus</i>
<i>C. modestus</i>	<i>C. cupreus</i>	<i>C. torquatus</i>
<i>C. donacophilus</i>	<i>C. caligatus</i>	<i>C. lugens</i>
<i>C. pallescens</i>	<i>C. discolor</i>	<i>C. lucifer</i>
<i>C. oenanthe</i>	<i>C. ornatus</i>	<i>C. purinus</i>
<i>C. olallae</i>	<i>C. dubius</i>	<i>C. regulus</i>
Grupo <i>Callicebus moloch</i>	<i>C. stephennashi</i>	<i>C. medemi</i>
<i>C. moloch</i>	<i>C. aureipalatti</i>	
<i>C. cinerascens</i>	<i>C. caquetensis</i>	
<i>C. brunneus</i>	Grupo <i>Callicebus personatus</i>	
<i>C. hoffmannsi</i>	<i>C. personatus</i>	
<i>C. baptista</i>	<i>C. melanochir</i>	
<i>C. bernhardi</i>	<i>C. nigrifrons</i>	
<i>C. vieirai</i>	<i>C. barbarabrownae</i>	
<i>C. miltoni</i>	<i>C. coimbrai</i>	

Tabela 2. Lista das amostras utilizadas neste estudo e suas respectivas procedências, coordenadas e localidade. Amostras com coordenada ou localidade desconhecidas estão em branco.

	Espécimes	Código	Proced	Coordenadas		Localidade	Área Biogeográfica
				Latit.	Longit.		
1	<i>C. bernhardi</i>	FR26	INPA	05°76'S	60°26'O	Margem esquerda do rio Aripuanã, Amazonas, Brasil	Rondônia
2	<i>C. bernhardi</i>	CCM173	INPA	08°60'S	62°41'O	Margem do rio Mariepauá, afluyente do rio Madeira, Amazonas, Brasil	Rondônia
3	<i>C. bernhardi</i>	UFRO354	UNIR	12°06'S	60°67'O	Pimenta Bueno, usina hidrelétrica Rondon II, Rondônia, Brasil	Rondônia
4	<i>C. bernhardi</i>	UFRO413	UNIR	09°13'S	61°53'O	Machadinho D'Oeste, Rondônia, Brasil	Rondônia
5	<i>C. bernhardi</i>	42960	MPEG	12°17'S	63°19'O	São Francisco do Guaporé, Reserva biológica Guaporé, Rondônia, Brasil	Rondônia
6	<i>C. bernhardi</i>	42961	MPEG	12°17'S	63°19'O	São Francisco do Guaporé, Reserva biológica Guaporé, Rondônia, Brasil	Rondônia
7	<i>C. bernhardi</i>	42964	MPEG	12°17'S	63°19'O	São Francisco do Guaporé, Reserva biológica Guaporé, Rondônia, Brasil	Rondônia
8	<i>C. moloch</i>	RVR22	INPA	09°53'S	56°01'O	Comunidade Novo Horizonte, Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil	Tapajós
9	<i>C. moloch</i>	RVR68	INPA	09°53'S	56°01'O	Comunidade Novo Horizonte, Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil	Tapajós
10	<i>C. moloch</i>	RVR73	INPA	09°53'S	56°01'O	Comunidade Novo Horizonte, Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil	Tapajós
11	<i>C. moloch</i>	1103	UFPA	04°16'S	49°48'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
12	<i>C. moloch</i>	1229	UFPA	04°26'S	49°35'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
13	<i>C. moloch</i>	299	UFPA	04°29'S	49°39'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
14	<i>C. moloch</i>	309	UFPA	04°19'S	49°48'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
15	<i>C. moloch</i>	590	UFPA	04°20'S	49°37'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
16	<i>C. moloch</i>	1516	UFPA	04°15'S	49°34'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
17	<i>C. moloch</i>	1690	UFPA	04°16'S	49°50'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
18	<i>C. moloch</i>	308	UFPA	04°22'S	49°52'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu
19	<i>C. moloch</i>	857	UFPA	04°25'S	49°30'O	UHE de Tucuruí, margem esquerda do rio Tocantins, Pará, Brasil	Xingu

20	<i>C. moloch</i>	MCB63	UFPA	02°45'S	51°53'O	Senador José Porfírio, margem direita do rio Xingu, Pará, Brasil	Xingu
21	<i>C. moloch</i>	MCB64	UFPA	02°45'S	51°53'O	Senador José Porfírio, margem direita do rio Xingu, Pará, Brasil	Xingu
22	<i>C. moloch</i>	MCB79	UFPA	02°50'S	51°50'O	Senador José Porfírio, margem direita do rio Xingu, Pará, Brasil	Xingu
23	<i>C. moloch</i>	CTGAM420	UFAM	03.21'S	55°12'O	Belterra, margem direita do rio Tapajós, Pará, Brasil	Tapajós
24	<i>C. moloch</i>	CTGAM421	UFAM	03.21'S	55°12'O	Belterra, margem direita do rio Tapajós, Pará, Brasil	Tapajós
25	<i>C. moloch</i>	CTGAM433	UFAM	03.21'S	55°12'O	Belterra, margem direita do rio Tapajós, Pará, Brasil	Tapajós
26	<i>C. moloch</i>	SANTAR	UFPA	02°30'S	54°40'O	Santarém, Igarapé Mararu, margem direita do rio Tapajós, Pará, Brasil	Tapajós
27	<i>C. vieirai</i>	2465	CNRJ	09°50'S	53°28'O	Margem direita do rio Iriri, Mato Grosso, Brasil	Tapajós
28	<i>C. vieirai</i>	2694	CNRJ	09°50'S	53°28'O	Margem direita do rio Iriri, Mato Grosso, Brasil	Tapajós
29	<i>C. cinerascens</i>	FR123	INPA				Rondônia
30	<i>C. cinerascens</i>	FR31	INPA	06.41S	59.56O	Novo Aripuanã, margem direita do rio Aripuanã, Amazonas, Brasil	Rondônia
31	<i>C. cinerascens</i>	FR50	INPA				Rondônia
32	<i>C. cinerascens</i>	UFRO195	UNIR	12°06'S	60°64'O	Pimenta Bueno, usina hidrelétrica Rondon II, Rondônia, Brasil	Rondônia
33	<i>C. cinerascens</i>	UFRO352	UNIR	12°06'S	60°64'O	Pimenta Bueno, usina hidrelétrica Rondon II, Rondônia, Brasil	Rondônia
34	<i>C. cinerascens</i>	UFRO355	UNIR	12°06'S	60°64'O	Pimenta Bueno, usina hidrelétrica Rondon II, Rondônia, Brasil	Rondônia
35	<i>C. cinerascens</i>	UFRO499	UNIR	12°06'S	60°64'O	Pimenta Bueno, usina hidrelétrica Rondon II, Rondônia, Brasil	Rondônia
36	<i>C. miltoni</i>	42991	MPEG	07.44'S	60.31'O	Novo Aripuanã, margem esquerda do rio Aripuanã, Amazonas, Brasil	Rondônia
37	<i>C. miltoni</i>	42992	MPEG	07.44'S	60.31'O	Novo Aripuanã, margem esquerda do rio Aripuanã, Amazonas, Brasil	Rondônia
38	<i>C. miltoni</i>	42993	MPEG	07.44'S	60.31'O	Novo Aripuanã, margem esquerda do rio Aripuanã, Amazonas, Brasil	Rondônia
39	<i>C. brunneus</i>	2220	UFPA	08°47'S	63°15'O	UHE de Samuel, margem direita do rio Jamari, Rondônia, Brasil	Rondônia
40	<i>C. brunneus</i>	2394	UFPA	08°43'S	63°28'O	UHE de Samuel, margem esquerda do rio Jamari, Rondônia, Brasil	Rondônia
41	<i>C. brunneus</i>	2397	UFPA	08°41'S	63°32'O	UHE de Samuel, margem esquerda do rio Jamari, Rondônia, Brasil	Rondônia
42	<i>C. brunneus</i>	2422	UFPA	08°43'S	63°31'O	UHE de Samuel, margem esquerda do rio Jamari, Rondônia, Brasil	Rondônia
43	<i>C. brunneus</i>	4346	UFPA	08°49'S	63°32'O	UHE de Samuel, margem esquerda do rio Jamari, Rondônia, Brasil	Rondônia

44	<i>C. brunneus</i>	4505	UFPA	08°47'S	63°14'O	UHE de Samuel, margem direita do rio Jamari, Rondônia, Brasil	Rondônia
45	<i>C. brunneus</i>	UFRO541	UNIR	08°47'S	63°54'O	Porto Velho, margem direita do rio Madeira, Rondônia, Brasil	Rondônia
46	<i>C. brunneus</i>	UFRO327	UNIR	08°46'S	62°45'O	Cujubim, Fazenda Manoa, Rondônia, Brasil	Rondônia
47	<i>C. caligatus</i>	CCM248	INPA	03°34'S	64°20'O	Coari, RESEX Catuá-Ipixuna, Lago do Ipixuna, Amazonas, Brasil	Inambari
48	<i>C. caligatus</i>	CTGAM181	UFAM	05°37'S	63°10'O	Tapauá, Igarapé do Jacinto, margem direita do rio Purus, Amazonas, Brasil	Inambari
49	<i>C. caligatus</i>	CTGAM182	UFAM	05°37'S	63°10'O	Tapauá, Igarapé do Jacinto, margem direita do rio Purus, Amazonas, Brasil	Inambari
50	<i>C. caligatus</i>	MVR58	INPA				Inambari
51	<i>C. dubius</i>	UFRO403	UNIR	08°43'S	63°55'O	Porto Velho, margem esquerda do rio Madeira, Rondônia, Brasil	Inambari
52	<i>C. dubius</i>	UFRO427	UNIR	08°43'S	63°55'O	Porto Velho, margem esquerda do rio Madeira, Rondônia, Brasil	Inambari
53	<i>C. dubius</i>	UFRO544	UNIR	08°42'S	63°56'O	Porto Velho, margem esquerda do rio Madeira, Rondônia, Brasil	Inambari
54	<i>C. dubius</i>	FR75	INPA	06°46'S	64°22'O	Canutama, margem esquerda do rio Mucuím, Amazonas, Brasil	Inambari
55	<i>C. discolor</i>	2804	CNRJ				Inambari
56	<i>C. cupreus</i>	4981	UFPA				Inambari
57	<i>C. cupreus</i>	4982	UFPA				Inambari
58	<i>C. cupreus</i>	4983	UFPA				Inambari
59	<i>C. cupreus</i>	4986	UFPA				Inambari
60	<i>C. cupreus</i>	4988	UFPA				Inambari
61	<i>C. cupreus</i>	4990	UFPA				Inambari
62	<i>C. cupreus</i>	5002	UFPA				Inambari
63	<i>C. cupreus</i>	AAM15	INPA	03°50'S	64°00'O	Coari, RESEX Catuá-Ipixuna, Lago do Ipixuna, Amazonas, Brasil	Inambari
64	<i>C. cupreus</i>	CTGAM210	UFAM	05°22'S	63°15'O	Tapauá, Rebio Abufari, margem esquerda rio Purus, Amazonas, Brasil	Inambari
65	<i>C. cupreus</i>	JLP15920	INPA	05°18'S	69°23'O	RESEX Alto Jurua, margem esquerda do rio Jurua, Amazonas, Brasil	Inambari
66	<i>C. cupreus</i>	2764	CNRJ				Inambari
67	<i>C. hoffmannsi</i>	02CNP	CENP				Rondônia

68	<i>C. hoffmannsi</i>	CTGAM248	UFAM	03°20'S	55°24'O	Comunidade Cametá, margem esquerda do rio Tapajós, Pará, Brasil	Rondônia
69	<i>C. hoffmannsi</i>	CTGAM290	UFAM	03°20'S	55°24'O	Comunidade Cametá, margem esquerda do rio Tapajós, Pará, Brasil	Rondônia
70	<i>C. hoffmannsi</i>	JTI	UFPA	03°04'S	55°15'O	Comunidade Pau da Letra, margem esquerda do rio Tapajós, Pará, Brasil	Rondônia
71	<i>C. melanochir</i>	2329	CNRJ			Eunápolis, Bahia, Brasil	Mata Atlântica
72	<i>C. personatus</i>	2466	CNRJ			Aracruz, Espírito Santo, Brasil	Mata Atlântica
73	<i>C. nigrifrons</i>	04	PUC			Minas Gerais, Brasil	Mata Atlântica
74	<i>C. lugens</i>	JPB119	INPA	01°11'N	64°48'O	Marari, Amazonas, Brasil	Imeri
75	<i>C. lugens</i>	JPB124	INPA	00°51'N	63°28'O	Igarapé Anta, Pé da Serra do Aracá, Amazonas, Brasil,	Imeri
76	<i>C. lugens</i>	JPB136	INPA	00°41'N	62°51'O	Igarapé Cuieiras, Amazonas, Brasil	Imeri
77	<i>C. purinus</i>	CTGAM154	UFAM	4°58'S	62°58'O	Rebio Abufari, margem esquerda rio Purus, Amazonas, Brasil	Inambari
78	<i>C. purinus</i>	CTGAM195	UFAM	4°58'S	62°58'O	Rebio Abufari, margem esquerda rio Purus, Amazonas, Brasil	Inambari
79	<i>C. purinus</i>	CTGAM209	UFAM	4°58'S	62°58'O	Rebio Abufari, margem esquerda rio Purus, Amazonas, Brasil	Inambari
80	<i>C. donacophilus</i>	019801					Chaco
81	<i>Chiropotes albinasus</i>	CTGAM5663	UFPA				Rondônia
82	<i>Cacajao calvus</i>	CTGAM5666	UFPA				Napo
83	<i>Pithecia pithecia</i>	Pit22	UFPA				Guiana

Tabela 3. Tempo de divergência entre táxons amazônicos do gênero *Callicebus* e os rios que os separam.

Táxons		Tempo de divergência estimado (Ma)	95% HPD	95% HPD	Rio entre as distribuições geográficas
<i>C. lugens</i>	<i>C. purinus</i>	3.47	2.68	4.34	Amazonas
<i>C. hoffmannsi</i>	Clado irmão	2.47	1.85	3.15	Madeira
<i>C. cupreus</i> A	<i>C. cupreus</i> B	0.81	0.51	1.16	
<i>C. cupreus</i> A/B	Clado irmão	1.98	1.43	2.62	Madeira
<i>C. dubius</i>	<i>C. caligatus</i>	0.27	0.14	0.43	
<i>C. miltoni</i>	<i>C. cinerascens</i>	0.84	0.40	1.29	Aripuanã
<i>C. cinerascens</i> A	<i>C. cinerascens</i> B	0.12	0.01	0.24	
<i>C. bernhardi</i> A	<i>C. bernhardi</i> B	0.72	0.38	1.07	Ji Paraná
<i>C. moloch</i> Alta Floresta	Clado irmão	1.05	0.69	1.46	Teles Pires
<i>C. vieirai</i>	Clado irmão	0.78	0.44	1.13	Xingu
<i>C. bernhardi</i>	<i>C. moloch</i>	1.74	1.20	2.32	Tapajós
<i>C. miltoni/C. cinerascens</i>	<i>C. bernhardi/C. moloch</i>	2.35	1.74	3.03	
<i>C. moloch</i> Tocantins/Xingu	<i>C. moloch</i> Tapajós	0.22	0.08	0.39	Xingu

Tabela S1. Lista dos *primers* utilizados neste estudo.

Código Primer	Primers Forward	Primers Reverso	Temperatura de hibridação	Referências
16 S	5' TGGACTATGAGTTGAGCAGAC 3'	5' TATGCTAATTACTCTTCTTGGGC 3'	58 °C	Palumbi (1991)
COI	5' TCCATTACCAGGCCAGCTAG 3'	5' GAACTTGCTGGCTTTCATATC 3'	45 °C	Ward et al. (2005)
CYT <i>b</i>	5' GCACCTACCCACGAAAAGAA 3'	5' ACATTGCCCTCTGCAAATTGA 3'	60 °C	Deste estudo
Pitheciidae2	5' CAGCCAAAGGAGTGCTTCAC 3'	5' CTAAATGGTGYCCCATAAAG 3'	58 °C	Osterholz et al. (2009)
Pitheciidae3	5' CGGGGGCCTGATTACTAAAA 3'	5' ACCAAAYATAGGCCTCRAATT 3'	53 °C	Osterholz et al. (2009)
Pitheciidae4	5' GCTGGACTATTCCTTGCCATC 3'	5' CAGGCATCCTGTTTGAATTA 3'	56 °C	Osterholz et al. (2009)
Pith_AlulD_24	5' AAGCCATAACTCCATTACCAA 3'	5' AGATTCTGGTCCCAAGTCCA 3'	60 °C	Ray et al. (2005)
Pith_AlulD_26	5' GTTTCATGAGGGCAGAACCT 3'	5' TCTGCACTTTGCAGCTGTTT 3'	60 °C	Ray et al. (2005)
Pith_AlulD_27	5' AACACATTTTGACTGTATGCTG 3'	5' CCCTTCAATGACTCCCTTCA 3'	57 °C	Ray et al. (2005)
Pith_AlulD_30	5' CATGGGACATGCACTTTTTTG 3'	5' AACAYCTTYCATCAACCTYTGAA 3'	61 °C	Ray et al. (2005)
Titi_1DF2_39	5' AACAGAGTTGGCCGTTTCATCT 3'	5' GTCCTGTTCAAGTCAGCTACGTTG 3'	54 °C	Ray et al. (2005)
Pith_AlulD_58	5' CCTAGTGTACCTGCTGATCG 3'	5' CGCTCTGATACTGATCGTACTGC 3'	55 °C	Ray et al. (2005)
Pith_AlulD_84	5' CTGCTACGTCAGACGTCGTAC 3'	5' CTGCTAGCACAAGCTAGTCGA 3'	62 °C	Ray et al. (2005)

Tabela S2. *Script e esquema de particionamento do banco de dados testado no PartitionFinder.*

```

alignment = Concatenado.phy;

branchlengths = unlinked;

## MODELS OF EVOLUTION for PartitionFinder: all | raxml | mrbayes | beast | <list> ##
##           for PartitionFinderProtein: all_protein | <list> ##
models = all;

# MODEL SELECTION: AIC | AICc | BIC #
model_selection = BIC;

## DATA BLOCKS: see manual for how to define ##
[data_blocks]

FlanqAlu6 = 1-68 192-201;
Alu6     = 69-191;
FlanqAlu7 = 202-220 520-605 755-762;
Alu7     = 221-519 606-754;
FlanqAlu8 = 763-797 931-1221;
Alu8     = 798-930;
FlanqAlu24 = 1222-1556;
FlanqAlu26 = 1557-1684 1990-2043;
Alu26     = 1685-1989;
FlanqAlu27 = 2044-2129 2296-2376 2674-2787;
Alu27     = 2130-2295 2377-2673;
FlanqAlu30 = 2788-2789 2994-3036 3345-3484;
Alu30     = 2880-2993 3037-3344;
FlanqAlu39 = 3485-3512 3815-3918;
Alu39     = 3513-3814;
FlanqAlu58 = 4294-4423;
Alu58     = 3919-4011 4012-4293;
FlanqAlu84 = 4424-4521 4813-4899;
Alu84     = 4522-4812;
16S       = 4900-5442;

```

COI = 5443-6047;
 CYTB = 6048-7121;

```
## SCHEMES, search: all | greedy | rcluster | hcluster | user ##
[schemes]
search = greedy;
```

#user schemes go here if search=user. See manual for how to define.#

```
together = (FlanqAlu6, Alu6, FlanqAlu7, Alu7, FlanqAlu8, Alu8, FlanqAlu24, FlanqAlu26, Alu26, FlanqAlu27, Alu27, FlanqAlu30, Alu30, FlanqAlu39, Alu39, FlanqAlu58, Alu58,
FlanqAlu84, Alu84, 16S, COI, CYTB);
separate = (FlanqAlu6) (Alu6) (FlanqAlu7) (Alu7) (FlanqAlu8) (Alu8) (FlanqAlu24) (FlanqAlu26) (Alu26) (FlanqAlu27) (Alu27) (FlanqAlu30) (Alu30) (FlanqAlu39) (Alu39)
(FlanqAlu58) (Alu58) (FlanqAlu84) (Alu84) (16S) (COI) (CYTB);
alus = (Alu6, Alu7, Alu8, Alu26, Alu27, Alu30, Alu39, Alu58, Alu84)(FlanqAlu6, FlanqAlu7, FlanqAlu8, FlanqAlu24, FlanqAlu26, FlanqAlu27, FlanqAlu30, FlanqAlu39,
FlanqAlu58, FlanqAlu84, 16S, COI, CYTB);
FlanqAlus = (FlanqAlu6, FlanqAlu7, FlanqAlu8, FlanqAlu24, FlanqAlu26, FlanqAlu27, FlanqAlu30, FlanqAlu39, FlanqAlu58, FlanqAlu84) (Alu6, Alu7, Alu8, Alu26, Alu27,
Alu30, Alu39, Alu58, Alu84, 16S, COI, CYTB);
mitocond = (16S, COI, CYTB) (FlanqAlu6, FlanqAlu7, FlanqAlu8, FlanqAlu24, FlanqAlu26, FlanqAlu27, FlanqAlu30, FlanqAlu39, FlanqAlu58, FlanqAlu84) (Alu6, Alu7, Alu8,
Alu26, Alu27, Alu30, Alu39, Alu58, Alu84);
nuclear = (FlanqAlu6, FlanqAlu7, FlanqAlu8, FlanqAlu24, FlanqAlu26, FlanqAlu27, FlanqAlu30, FlanqAlu39, FlanqAlu58, FlanqAlu84, Alu6, Alu7, Alu8, Alu26, Alu27, Alu30,
Alu39, Alu58, Alu84) (16S, COI, CYTB) ;
```

Tabela S3. Lista das amostras sequenciadas para cada marcador neste estudo. Os marcadores que não obtivemos sequências estão em branco.

Espécimes	Código	16S	COI	CYT <i>b</i>	Pithe ciidae2	Pithe ciidae3	Pithe ciidae4	Pith_Al 1D_24	Pith_Al 1D_26	Pith_Al 1D_27	Titi_Al 1D_30	Titi_1D F2_39	Titi_Al 1D_58	Titi_1D 84
<i>C. bernhardi</i>	FR26	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X
<i>C. bernhardi</i>	CCM173	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X
<i>C. bernhardi</i>	UFRO354	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. bernhardi</i>	UFRO413	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X
<i>C. bernhardi</i>	42960	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. bernhardi</i>	42961	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. bernhardi</i>	42964	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. moloch</i>	RVR22	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
<i>C. moloch</i>	RVR68	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
<i>C. moloch</i>	RVR73	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
<i>C. moloch</i>	1103	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. moloch</i>	1229	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>C. moloch</i>	299	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>C. moloch</i>	309	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. moloch</i>	590	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. moloch</i>	1516	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. moloch</i>	1690	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. moloch</i>	308	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
<i>C. moloch</i>	857	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X
<i>C. moloch</i>	MCB63	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X
<i>C. moloch</i>	MCB64	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
<i>C. moloch</i>	MCB79	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
<i>C. moloch</i>	CTGAM420	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X
<i>C. moloch</i>	CTGAM421	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X
<i>C. moloch</i>	CTGAM433	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X
<i>C. moloch</i>	SANTAR	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
<i>C. vieirai</i>	2465	X	X	X	X	X		X	X	X		X		X
<i>C. vieirai</i>	2694	X	X	X	X	X		X	X	X		X		X
<i>C. cinerascens</i>	FR123	X	X	X	X			X	X	X				X

<i>C. cinerascens</i>	FR31	X	X	X	X			X	X	X		X	X
<i>C. cinerascens</i>	FR50	X	X	X			X	X	X	X		X	X
<i>C. cinerascens</i>	UFRO195	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cinerascens</i>	UFRO352	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>C. cinerascens</i>	UFRO355	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cinerascens</i>	UFRO499	X	X	X				X	X	X		X	X
<i>C. miltoni</i>	42991	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. miltoni</i>	42992	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
<i>C. miltoni</i>	42993	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
<i>C. brunneus</i>	2220	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. brunneus</i>	2394	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. brunneus</i>	2397	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>C. brunneus</i>	2422	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. brunneus</i>	4346	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. brunneus</i>	4505	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. brunneus</i>	UFRO327	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
<i>C. brunneus</i>	UFRO541	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
<i>C. caligatus</i>	CCM248	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
<i>C. caligatus</i>	CTGA181	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. caligatus</i>	CTGA182	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. caligatus</i>	MVR58	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
<i>C. dubius</i>	UFRO403	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. dubius</i>	UFRO427	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X
<i>C. dubius</i>	UFRO544	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. dubius</i>	FR75	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X
<i>C. discolor</i>	2804	X	X	X	X			X	X	X		X	X
<i>C. cupreus</i>	4981	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cupreus</i>	4982	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cupreus</i>	4983	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cupreus</i>	4986	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cupreus</i>	4988	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cupreus</i>	4990	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cupreus</i>	5002	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X
<i>C. cupreus</i>	AAM15	X	X	X	X	X	X	X			X		X

<i>C. cupreus</i>	CTGAM210	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>C. cupreus</i>	JLP15920	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x
<i>C. cupreus</i>	2764	x	x	x	x	x		x	x	x		x		x
<i>C. hoffmannsi</i>	02CNP	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x
<i>C. hoffmannsi</i>	CTGAM248	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
<i>C. hoffmannsi</i>	CTGAM290	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x
<i>C. hoffmannsi</i>	JTI	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x	
<i>C. melanochir</i>	2329	x	x	x	x	x	x	x	x			x		x
<i>C. personatus</i>	2466	x	x	x	x	x			x	x		x		x
<i>C. nigrifrons</i>	04	x	x	x				x	x	x	x	x		
<i>C. lugens</i>	JPB119	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>C. lugens</i>	JPB124	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>C. lugens</i>	JPB136	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>C. purinus</i>	CTGAM154	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>C. purinus</i>	CTGAM195	x	x	x	x	x		x	x	x				x
<i>C. purinus</i>	CTGAM209	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>C. donacophilus</i>	019801	x	x	x										
<i>Chiropotes albinasus</i>	CTGAM56663	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x
<i>Cacajao calvus</i>	CTGAM5666	x	x	x	x	x			x		x			
<i>Pithecia pithecia</i>	Pith22	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
N° indiv. por marcador →		83	83	83	73	70	67	80	82	67	51	73	67	75

Tabela S4. Distância genética entre os grupos de espécies do gênero *Callicebus*.

Grupos de espécies	2	3	4	5
1 Grupo <i>C. moloch</i>				
2 Grupo <i>C. cupreus</i>	0.019			
3 Grupo <i>C. personatus</i>	0.068	0.066		
4 Grupo <i>C. torquatus</i>	0.067	0.068	0.077	
5 Grupo <i>C. donacophilus</i>	0.072	0.075	0.126	0.127

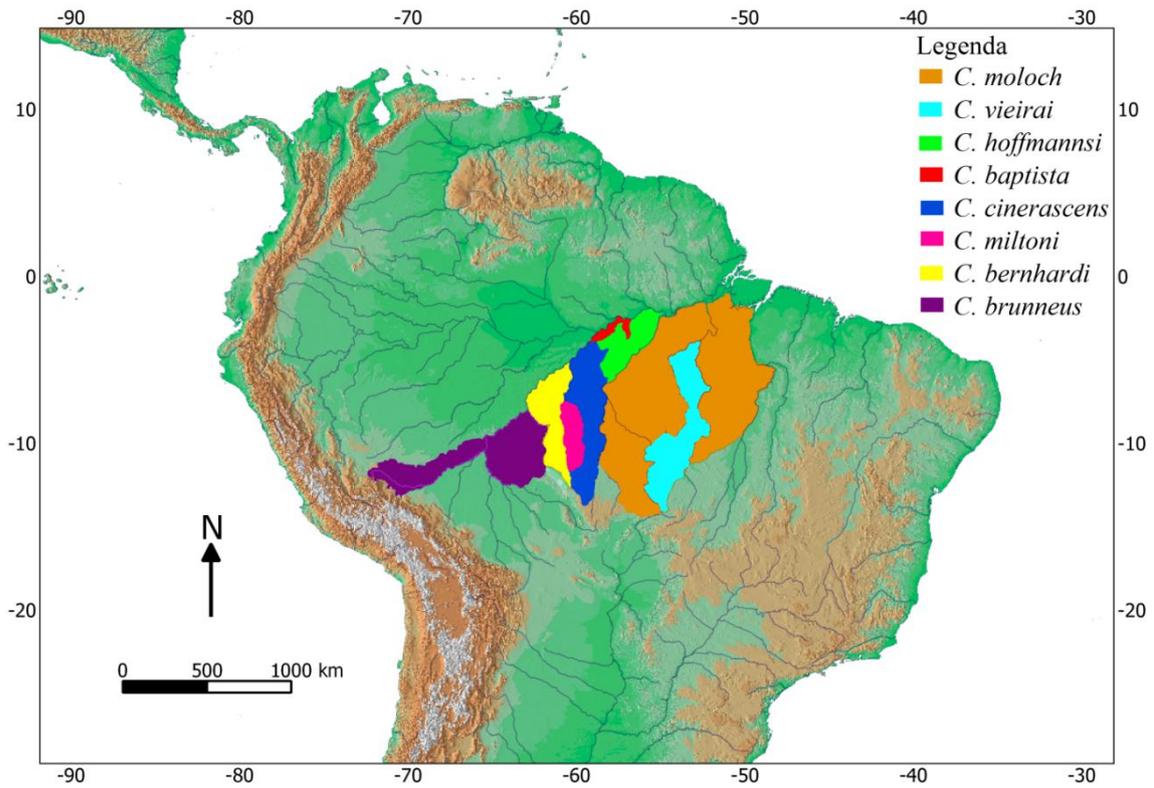


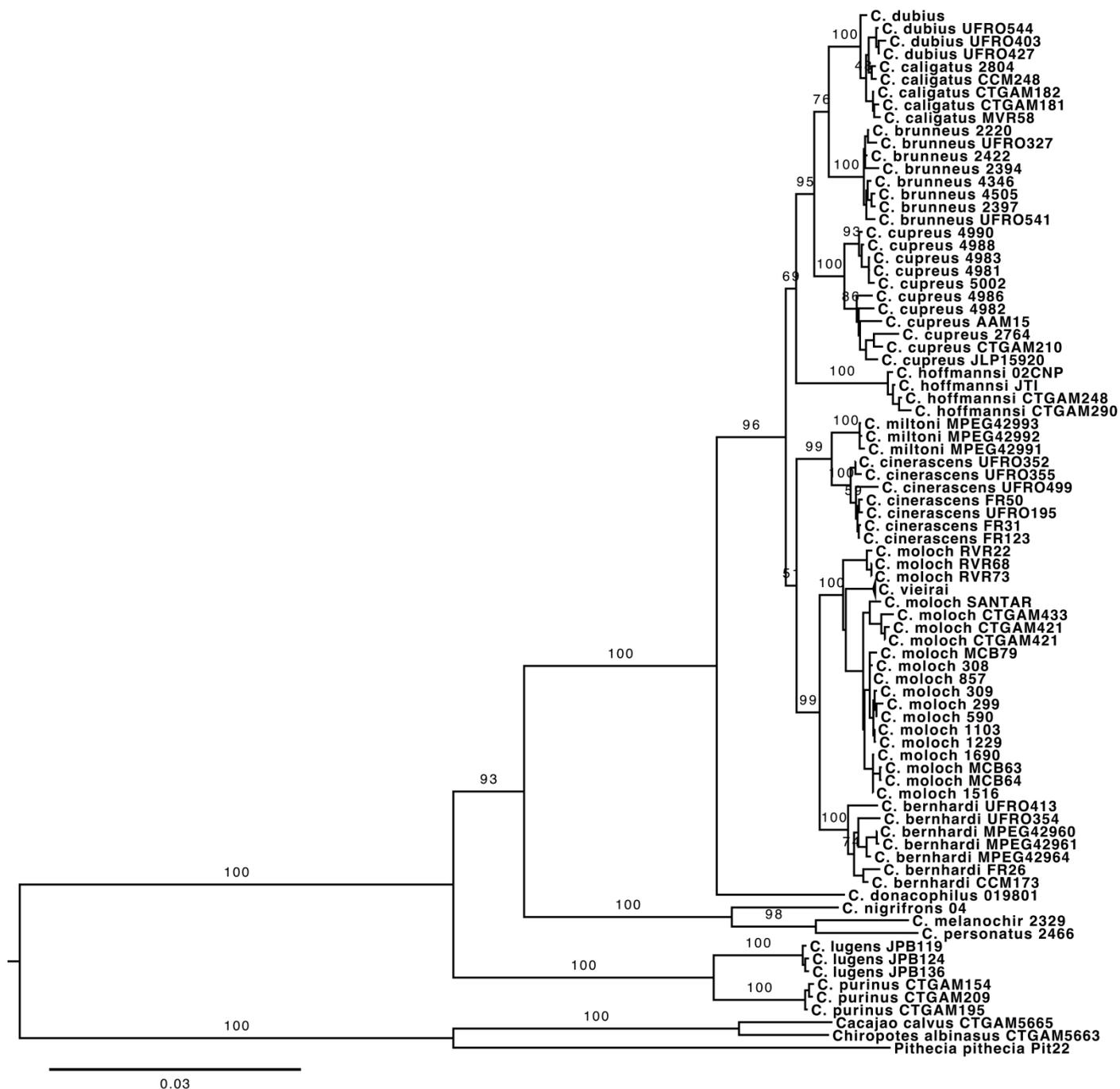
Figure 1. Distribuição do grupo *C. moloch* (IUCN, 2015; Dalponte, 2014).



Figure 2. Localização das amostras utilizadas neste estudo. Os números têm relação com a Tabela 2.

Figure 3. Filogenia do grupo *C. moloch*: a) Análise de máxima verossimilhança e b) Inferência bayesiana. Os valores de *bootstrap* e probabilidade a posterior são mostrados nas suas respectivas árvores.

a)



b)

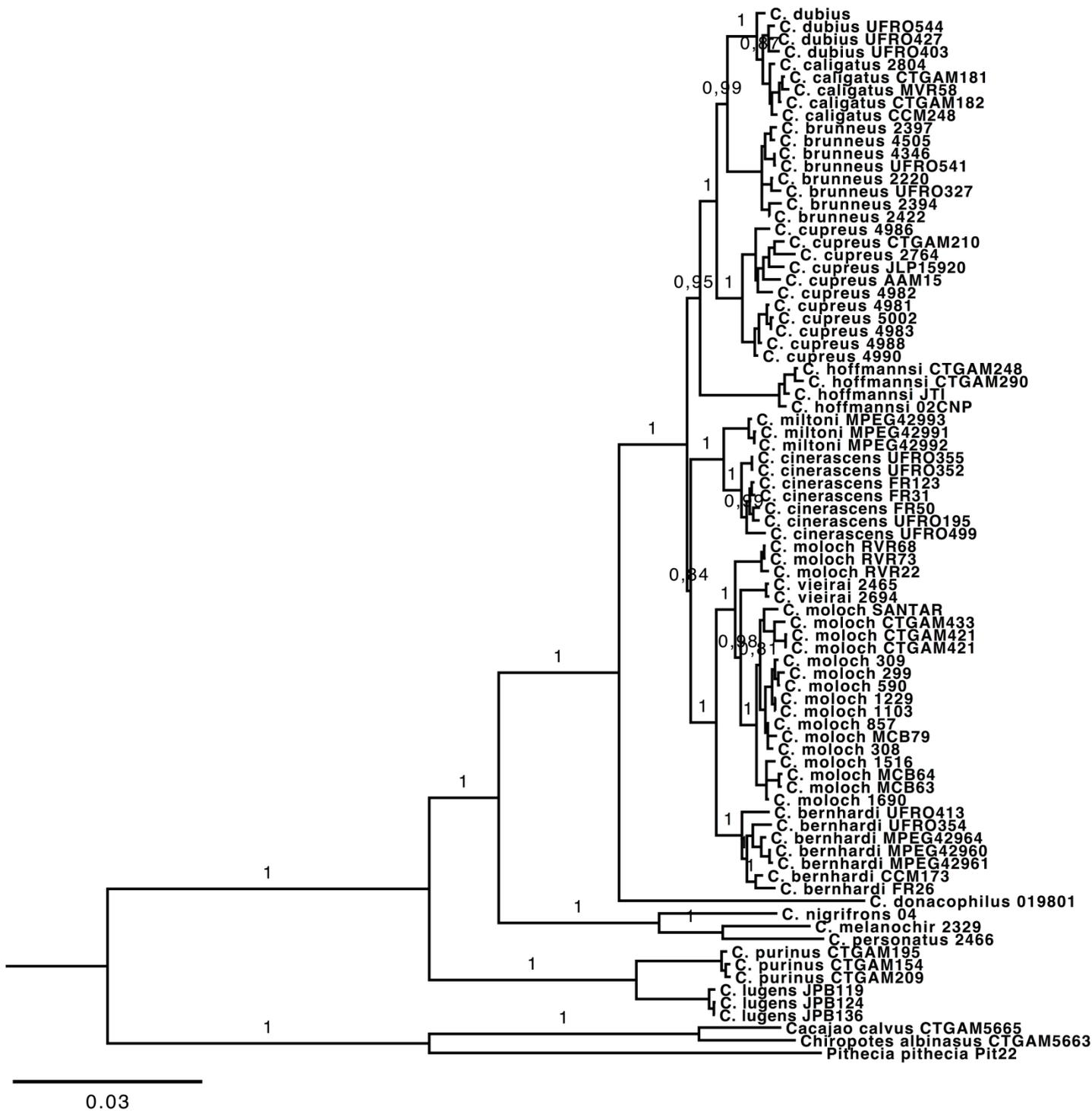


Fig. 5. Árvore de espécies com estimativas de tempo de divergência. Os valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos nós e as barras azuis indicam os 95% HPD do tempo de divergência de cada nó.

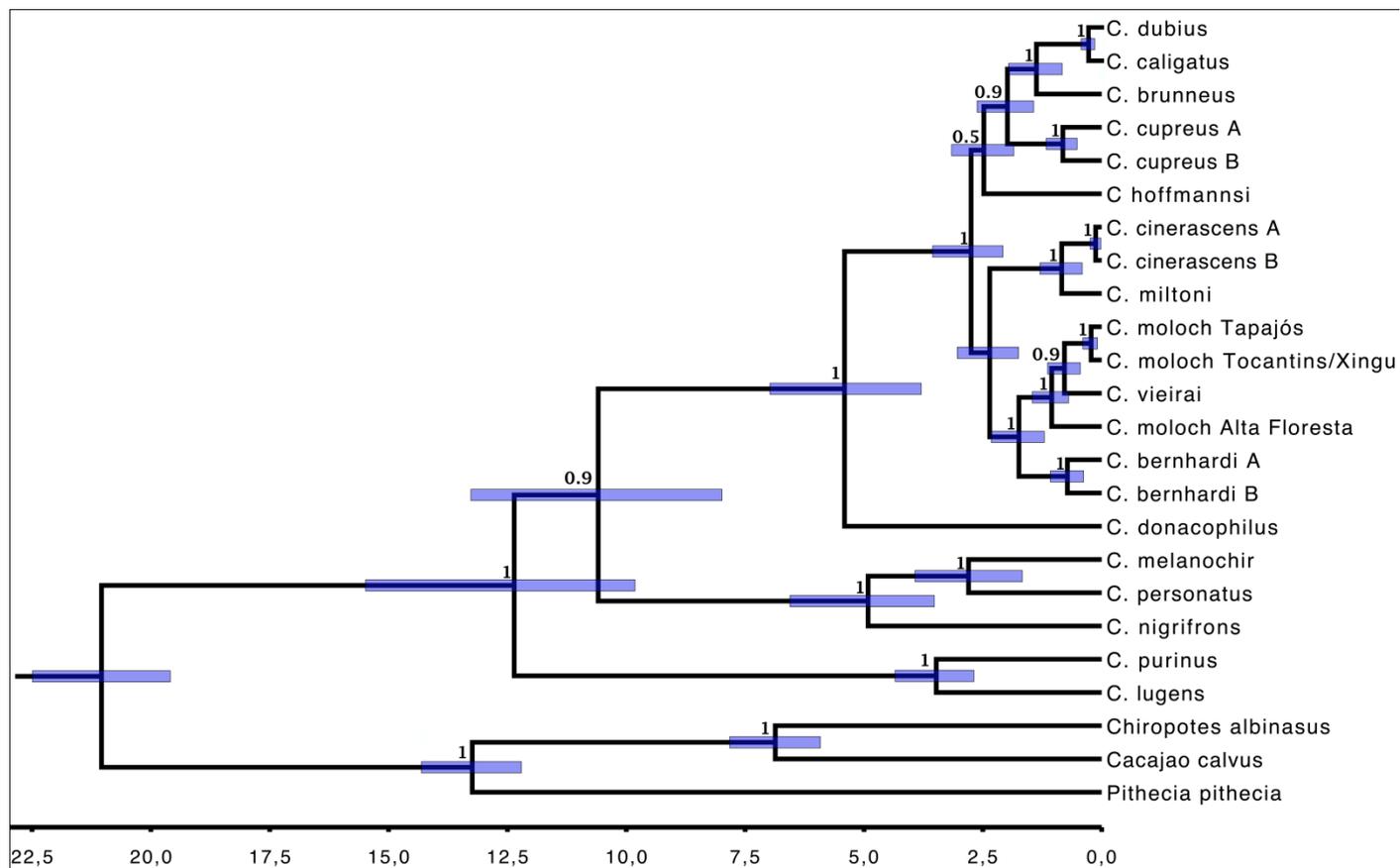


Figura 6. Análise biogeográfica do gênero *Callicebus*. São mostrados na legenda as áreas ancestrais e suas respectivas cores. Circunferências nos nós da árvore indicam a área ancestral, circunferências na cor preta indicam pequena resolução no nó. Método S-DIVA.

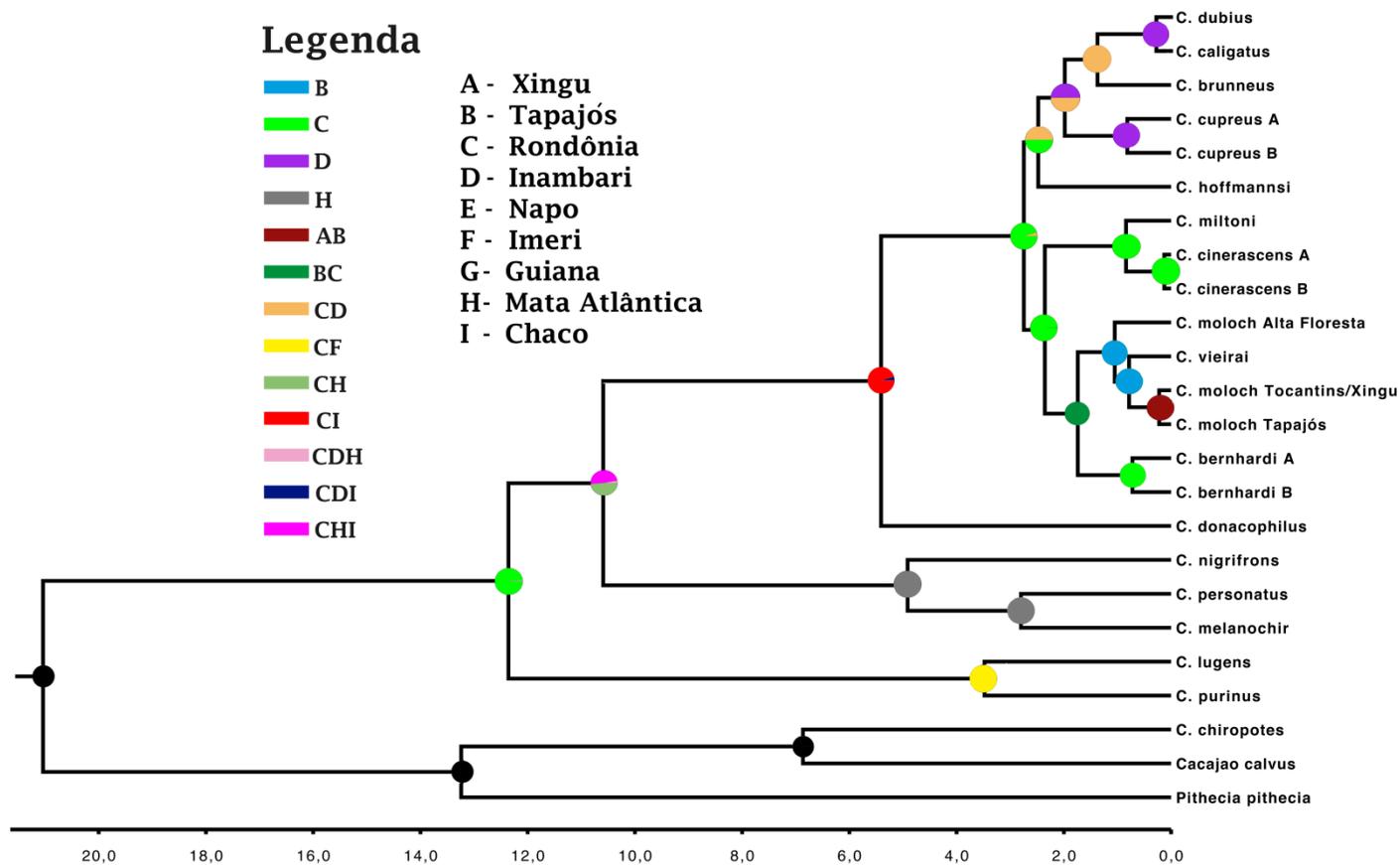


Fig. S1. Filogenia do gênero *Callicebus*. Os clados coloridos mostrados serviram de base para as árvores guias nos testes de delimitação de espécies.

