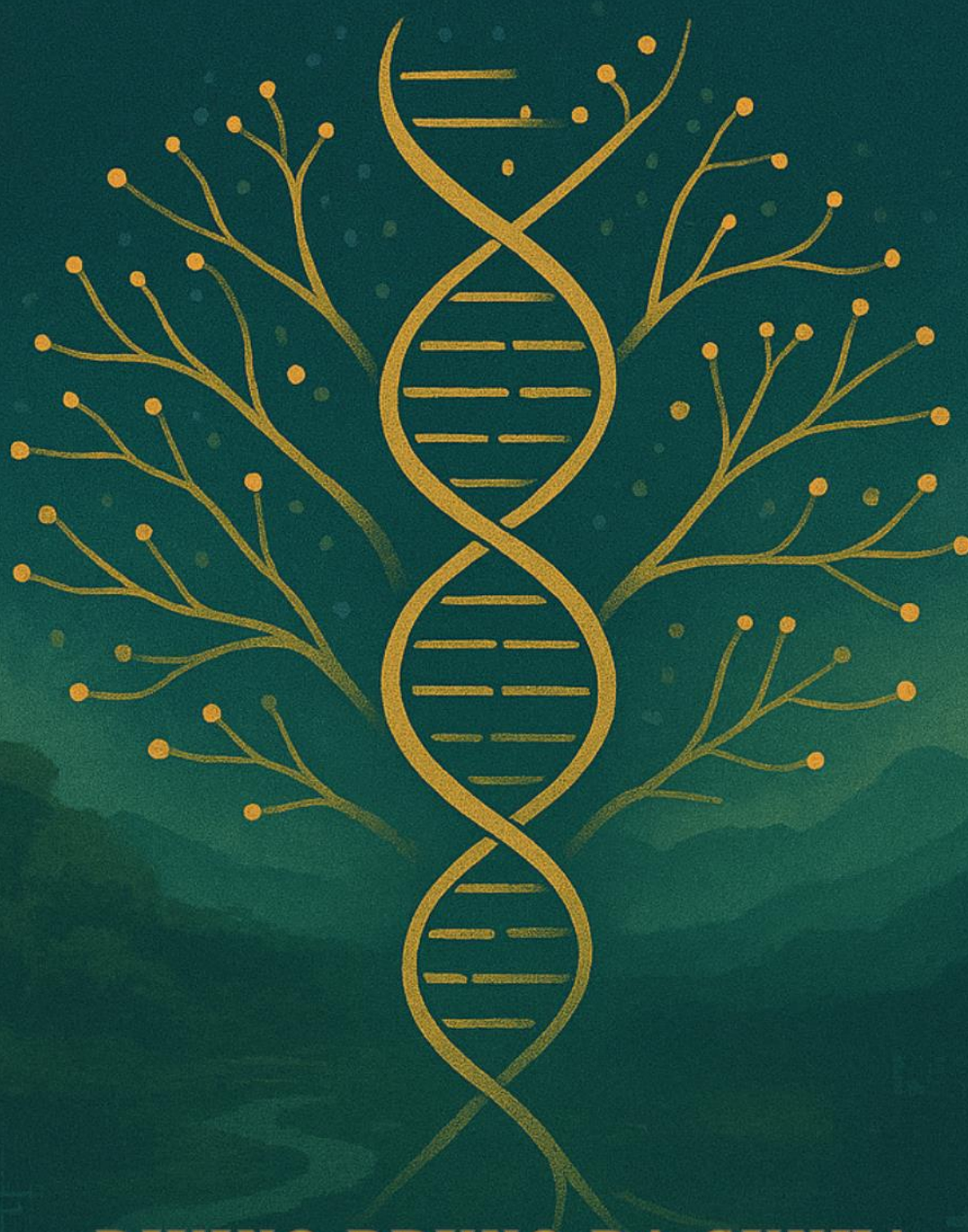


**FILOGENIA MOLECULAR
DOS GÊNEROS SAGUINUS,
CEBUELLA, MICO E CALLITHRIX
(SUBFAMÍLIA CALLITRICHINAE)
ATRAVÊS DE SEQUÊNCIAS DE ELEMENTOS ALU**



DIVINO BRUNO DA CUNHA

Divino Bruno da Cunha

**FILOGENIA MOLECULAR DOS GÊNEROS *SAGUINUS*,
CEBUELLA, *MICO* E *CALLITHRIX* (SUBFAMÍLIA
CALLITRICHINAE) ATRAVÉS DE SEQUÊNCIAS DE
ELEMENTOS *ALU***

1ª edição

Editora Itacaiúnas
Ananindeua - PA
2025

©2025 por Divino Bruno da Cunha
Todos os direitos reservados.

1ª edição

Conselho editorial / Colaboradores

Márcia Aparecida da Silva Pimentel – Universidade Federal do Pará, Brasil
José Antônio Herrera – Universidade Federal do Pará, Brasil
Márcio Júnior Benassuly Barros – Universidade Federal do Oeste do Pará, Brasil
Miguel Rodrigues Netto – Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Wildoberto Batista Gurgel – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil
André Luiz de Oliveira Brum – Universidade Federal de Rondônia, Brasil
Mário Silva Uacane – Universidade Licungo, Moçambique
Francisco da Silva Costa – Universidade do Minho, Portugal
Ofélia Pérez Montero - Universidad de Oriente – Santiago de Cuba, Cuba

Editora-chefe: Viviane Corrêa Santos – Universidade do Estado do Pará, Brasil
Editor e web designer: Walter Luiz Jardim Rodrigues – Editora Itacaiúnas, Brasil

Editoração eletrônica/ diagramação: Walter Rodrigues

Projeto de capa: Walter Rodrigues

Revisão: do autor

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

C972	Cunha, Divino Bruno da
	Filogenia molecular dos gêneros saguinus, cebuella, mico e callithrix (subfamília callitrichinae) através de sequências de elementos alu [recurso eletrônico] / Divino Bruno da Cunha. - Ananindeua: Editora Itacaiúnas, 2025. 73 p.: il.: PDF , 1,0 MB.
	Inclui bibliografia. ISBN: 978-85-9535-380-0 (Ebook) DOI: 10.36599/itac-978-85-9535-380-0
	1. Filogenia molecular. 2. Primatas. 3. Elementos Alu. 4. Callitrichinae. 5. Evolução genética. I. Título.
	CDD 599.8 CDU 599.8

Índice para catálogo sistemático:

1. 599.8 (Primatas — Zoologia)

E-book publicado no formato PDF (*Portable Document Format*). Utilize software [Adobe Reader](#) para uma melhor experiência de navegabilidade nessa obra.

Todo o conteúdo apresentado neste livro é de responsabilidade do(s) autor(es).

Esta publicação está licenciada sob [CC BY-NC-ND 4.0](#)

Esta obra foi publicada pela **Editora Itacaiúnas** em dezembro de 2025.



Dedicatória

À toda minha família com carinho mais especialmente a minha mãe Enilva Maria da Cunha, meu Pai-avô Realino Eduardo da Cunha e Avó Gerônima Borges.

À Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio pelo incentivo a minha continuidade na carreira acadêmica.

“Nada em biologia faz sentido a não ser à luz da evolução”

Theodosius Dobzhansky

Agradecimentos

À Prof. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio, pela paciência, dedicação e incansáveis discussões sobre esta dissertação e sincera amizade.

Ao Prof. Dr. Horacio Schneider, que ajudou na análise dos dados e sempre demonstrou a sua curiosidade e interesse pelo trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vallinoto, que ajudou nas análises, interpretação dos dados e principalmente por sua honrosa amizade.

À Prof. Dra. Juliana Araripe e Pericles Sena pela literatura concedida e dicas para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Doutorando Luís Fernando, pelas inúmeras discussões científicas, leituras do texto e amizade.

A Maria Adriana Leite por todo seu carinho e amor, principalmente por me agüentar.

A minha incansável companheira de laboratório Eliene, por me suportar todo esse tempo e sempre estar disponível para as tarefas.

Aos meus amigos de longa data Gustavo e Kledson, que apesar da distância sempre estiveram presentes.

Ao grupo Biodiversidade e Conservação: Eduardo (Ceará), Folha (Dayvison), Breno Barros (Valter Mer.....), Weyder (Uree), Ernesto (Renato), Diogo Lavareda (brasinha), Adriano (Anormal).

A minha madrinha Ieda pela hospedagem em Belém e impagáveis favores.

A minha tia e Artista plástica favorita Luzia Santana pela longa hospedagem em Belém, assim como, pela sua alegria e carisma o qual a torna uma pessoa singular.

A minha turma de Mestrado em Genética e Biologia Molecular principalmente a Paula e Luciana Watanabe, pequenas grandes companheiras.

À Prof. Dra. Simoni Santos, Prof. Dra. Wilsea Figueiredo e Rosa Rodrigues, pela ajuda no laboratório, agradeço a todos os amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Campus de Bragança: Glaucia, Cleonilde Queiroz, Bráulio, Iasmim, Diana, Luciana Pimentel, Fátima, Fernanda Atanaena, Salene e todos aqueles que não recordo o nome agora.

Ao Prof. Dr. Colin pelas longas pedaladas por Bragança, Prof^a. Dr^a. Claudia Tagliaro e Guilherme. Ao Programa de Genética e Biologia Molecular de Belém e professores do quadro, principalmente ao Prof. Dr. Leonardo Sena.

Ao CNPQ pela bolsa de estudo concedida, sem esta não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

A grande maioria dos estudos moleculares em Primatas do Novo Mundo é a nível de família ou gênero, mas as relações intra-genéricas continuam não resolvidas. O presente estudo propõe-se a inferir relações filogenéticas dentro de três gêneros de primatas (*Callithrix*, *Mico* e *Saguinus*) pertencentes à subfamília Callitrichinae, utilizando sequências de cinco loci de inserções *ALU* com cerca de 2500 pb para 14 táxons. As relações filogenéticas foram realizadas pelos métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, inferência Bayesiana e Inferência Bayesiana Hierárquica. Os resultados confirmaram a proposição de dois grupos: um distribuído na floresta Amazônica (*Mico*) e outro na mata Atlântica (*Callithrix*), sendo que as espécies do segundo grupo foram envolvidas em uma politomia. Outro fato interessante foi o posicionamento de *Callibela* como grupo irmão de *Mico*. Essa estreita relação é apoiada pela matriz, onde a média da divergência entre os dois grupos é apenas 1%, menor do que entre *Callibela* e *Cebuella* (1.5%) e entre *Callibela* e *Callithrix* (1.5-2%). Os dados com base nas divergências são coerentes com a proposta de que *Cebuella* seja mantido como gênero, e *Callibela* como espécie de *Mico* e não como gênero próprio. Além disso, *Cebuella* foi observado como a linhagem mais basal do clado Amazônida. Quanto a *Saguinus*, as espécies *S. labiatus*/*S. mystax* formam um grupo monofilético confirmando o clado dos “bigodudos”, que é grupo irmão de *S. bicolor* e *S. midas*/*S. niger*. Este último clado não apoia a divisão das espécies de *Saguinus* com base na presença ou ausência de pêlos na face. Os resultados indicam que o tempo de especiação, assim como as divergências dentro de *Saguinus* (variando 0,3 a 4,1%), são muito maiores que as divergências entre *Callibela*, *Mico*, *Cebuella* e *Callithrix*. Desta forma, os resultados mostram que *Mico* possui um padrão de especiação mais antigo ao contrario de *Callithrix*, que apresentou uma alta similaridade entre os indivíduos e esta

de acordo com um padrão de irradiação rápida. O gênero *Saguinus* é o grupo mais antigo com suas principais especiações ocorrido no Mioceno, além de que, existe uma alta divergência genética dentro desse gênero, o que sugere uma revisão taxonômica dentro de *Saguinus* para descrição ou não de novos gêneros.

Palavras-chave: Callitrichineos, *Callithrix*, *Mico*, *Saguinus*, Filogenia molecular, sequências *Alu*, primatas

Abstract

The large majority of molecular work of New World monkeys at level of family or genus but the relationships intra-generic continue unresolved. The purpose of the present study was make a phylogenetic inference within three genera of primates (*Callithrix*, *Mico* and *Saguinus*) belonging subfamily Callithrichinae, using sequences five loci *Alu* insertion with 2500 pb for 14 taxa. Phylogenetic relationships was analyzed using the methods of Maximum Parsimony, Maximum likelihood, Inference Bayesian and Inference Hierarchical Bayesian. The results confirm the separation of *Mico* and *Callithrix*, being species of second group was involved in a polytomic clade. Another fact interesting was placing of *Callibela* as sister group of *Mico*. This closed relationship is supported for distance genetic, where the average of divergence between the two groups is just 1%, less than between *Callibela* and *Cebuella* (1.5%) and between *Callibela* e *Callithrix* (1.5-2%). Based on the divergence data with the postulated of *Cebuella* must be held as a genus and *Callibela* as a species of *Mico* and not in a proper. Besides, *Cebuella* was the basal lineage of the Amazonian clade. In the case of *Saguinus*, the species *S. labiatus*/*S. mystax* constitute a monophyletic group confirming the clade of “mustache” as a sister group of *S. bicolor* and *S. midas*/*S. niger*. This last clade doesn't support the division of the *Saguinus* species based on the presence or absence of face hair. This results indicate that the divergence time of speciation, like this divergences within *Saguinus* (ranging 0.3 to 4.1%), are much bigger than the divergence between *Callibela*, *Mico*, *Cebuella* and *Callithrix*. Besides, the results show that *Mico* and *Saguinus* have a pattern of speciation much older, where *Callithrix* is opposite, showing high similarity between the individuals and this is in agreement with the pattern of fast irradiation. The genus *Saguinus* is the group must older with your main speciation occurred in Myocene, besides, the existence of high

genetic divergence within this genus, what can suggest a taxonomy review for description or not of new genus.

Keywords: Callithrichineos, *Callithrix*, *Mico*, *Saguinus*, Molecular phylogeny, sequences *Alu*, primates.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Primatas do Novo Mundo - Subfamília Callitrichinae.....	14
1.2 Distribuição Biogeográfica da Subfamília Callitrichinae	16
1.3 Sistemática e Filogenia Molecular dos Calitriquíneos	18
1.4 Os Elementos ALU.....	34
1.5 Justificativa.....	37
1.6 Objetivos	38
1.6.1 Geral:	38
1.6.2 Específicos:.....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 Amostragem e Extração de DNA.....	39
2.2 PCR e Sequenciamento.....	39
2.3 Alinhamento das sequências.....	42
2.4 Análises Filogenéticas	42
2.5 Estimativa do tempo de divergência.....	43
3 RESULTADOS	45
3.1- Características dos bancos de dados	45
3.2-Divergência genética.....	46
3.3-Relações Filogenéticas.....	49
3.4-Tempo de divergência entre os Callitrichineos.....	51
4 DISCUSSÃO	53
4.1-Relações Filogenéticas.....	53
4.1.1 - Saguinus	53
4.1.2 – Cebuella/Mico/Callibela/Callithrix.....	55
4.2-Tempo de divergência e História Biogeográfica	59
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Primatas do Novo Mundo - Subfamília Callitrichinae*

Os platirrinos são primatas endêmicos das Américas, ocorrendo do sudeste do México ao norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. São reconhecidos 16 gêneros, com 110 espécies válidas e 205 táxons de platirrinos (Rylands *et al.*, 2000). Os gêneros são reunidos em três famílias: 1- Família Cebidae, com três subfamílias: Cebinae (*Cebus* e *Saimiri*), Aotinae (*Aotus*), Callitrichinae (*Callithrix*, *Mico*, *Cebuella*, *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callimico*); 2- Atelidae, possuindo uma subfamília: Atelinae (*Ateles*, *Brachyteles*, *Lagothrix* e *Alouatta*); e 3- Pitheciidae (*Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao* e *Callicebus*) (Schneider, 2000).

A subfamília Callitrichinae possui grande diversidade, sendo reconhecidas 41 espécies, totalizando 60 táxons válidos, incluindo espécies e subespécies (Tabela 1) (Rylands *et al.*, 2000).

As principais características desta subfamília são a variação na coloração da pelagem e o pequeno tamanho corporal, como o do pequeno *Cebuella pygmaea* com 338 mm de comprimento total e pesando entre 80-140 g (Spix, 1823) e o *Leontopithecus spp* com no máximo 700g (Soini, 1993). Apresentam unhas em forma de garra em todos os dedos, exceto no hálux (ausente em *Callimico*), molares com três cúspides e ausência do terceiro molar, exceto *Callimico* que apresenta terceiro molar reduzido (Herskovitz, 1977).

Tabela 1 - Lista de espécies e subespécies da subfamília Callitrichinae segundo a classificação de Rylands *et al.* (2000).

LISTA DE ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA CALLITRICHINAE

Subfamília Callitrichinae

Leontopithecus

L. rosalia
L. chrysomelas
L. chrysopygus
L. caissara

Callimico

Callimico goeldii

Callithrix

C. jacchus
C. penicillata
C. kuhlii
C. geoffroyi
C. aurita
C. flaviceps

Mico

M. argentatus
M. leucippe
M. melanurus
M. intermedius
M. emiliae
M. nigriceps
M. marcai
M. humeralifer
M. chrysoleucus
M. mauesi
M. humilis
M. saterei
M. manicorensis
M. acariensis

Cebuella

C. pygmaea pygmaea
C. pygmaea niveiventris

Saguinus

S. nigricollis nigricollis
S. nigricollis hernandezi
S. graellsii
S. fuscicollis fuscicollis
S. fuscicollis fuscus
S. fuscicollis avilapiresi
S. fuscicollis cruzlimai
S. fuscicollis leucogenys
S. fuscicollis lagonotus
S. fuscicollis primitivus
S. fuscicollis illigeri
S. fuscicollis nigrifrons
S. fuscicollis weddelli
S. fuscicollis melanoleucus
S. fuscicollis crandalli
S. tripartitus
S. mystax mystax
S. mystax pileatus
S. mystax pluto
S. labiatus labiatus
S. labiatus thomasi
S. labiatus nufiventer
S. imperator imperator
S. imperator subgrisescens
S. midas
S. niger
S. inustus
S. bicolor
S. martinsi martinsi
S. martinsi ochraceus
S. leucopus
S. oedipus
S. geoffroyi

Os calitriquíneos apresentam alto potencial reprodutivo, com fêmeas capazes de ovular com 12 a 17 meses de idade, enquanto os machos produzem esperma com 13 a 18 meses de idade (Abbott e Hearn 1978, Epplé e Katze 1980, Ginther *et al.* 2002).

Outra característica marcante dos calitriquíneos é a alta frequência de partos gemelares, exceto em *Callimico*, onde a maioria das espécies frequentemente produz duas ninhadas por ano em cativeiro (período de gestação entre 151 a 156 dias) (Stevenson e Rylands 1988; Soini 1993; Digby e Ferrari 1994; Porter, 2001a). *Leontopithecus* e *Saguinus* normalmente reproduzem-se apenas uma vez por ano em ambiente selvagem, com a maioria dos nascimentos durante a primeira metade da estação chuvosa, correspondentes ao período de maior disponibilidade de frutas (Snowdon e Soini 1988; Ferrari e Lopes Ferrari 1989).

A dieta alimentar desta subfamília é altamente especializada, baseada no consumo de insetos, pequenos frutos, goma, exsudados e néctar, sendo ainda predadores de pequenos vertebrados (Heymann, 1996; Snowdon e Soini, 1988). Como todos dessa subfamília são onívoros, consumindo grande quantidade de material vegetal e insetos, estes animais têm preferência por vegetação secundária ou perturbada, devido às maiores disponibilidades de alimentos nessas áreas (Rylands e Faria, 1993).

Os representantes da subfamília Callitrichinae possuem ampla distribuição geográfica e habitam uma grande variedade de ambientes, com padrões de distribuição bastante variáveis, onde a competição entre as espécies é aparentemente minimizada pela ocupação diferenciada dos extratos arbóreos e pelas diferentes técnicas de forrageamento dos recursos alimentares utilizados pelas mesmas (Ferrari, 1993).

1.2 Distribuição Biogeográfica da Subfamília Callitrichinae

Os indivíduos da subfamília Callitrichinae são vastamente distribuídos pela América do Sul, explorando os mais diversificados tipos de habitat. As áreas de ocorrência dos gêneros *Cebuella*, *Callithrix*, *Mico*, *Callibella* (*M. humilis*), *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callimico* podem ser visualizadas na figura 1.

Os gêneros *Callimico* e *Cebuella* apresentam distribuições biogeográficas aproximadamente equivalentes no oeste da floresta Amazônica, e estudos recentes têm confirmado que ambos os gêneros estendem-se por longas distâncias a oeste e à esquerda da margem do Rio Madeira, onde eles são potencialmente parapatricos com *Mico*. *Cebuella* encontra-se distribuído acima do rio Amazonas, da margem sul do rio Caquetá, no sul da Colômbia, leste do Equador, leste do Peru e oeste do Brasil, até as margens norte do rio Madre de Dios no norte da Bolívia e sudeste do Peru; é também encontrado no território brasileiro entre os rios Solimões-Purus-Ipixuna (Rylands *et al.*, 1993; Van Roosmalen e Van Roosmalen, 1997; Ferrari *et al.*, 1999).

O gênero *Mico* recentemente elevado a este *status* por Rylands *et al.* (2000) é considerado o grupo dos pequenos macacos da Região Amazônica, possuindo ampla distribuição que vai do sul do Rio Amazonas e oeste do Rio Madeira, sul e oeste da Bolívia até ao nordeste do Paraguai com mais seis espécies ocorrendo à oeste do Brasil (Figura 1). Nas proximidades desta região, nos interflúvios dos rios Madeira e Aripuanã, habita a espécie recentemente descrita *Callibella humillis* (*Callithrix humillis*), a qual possui a menor distribuição dentre os pequenos primatas da Amazônia e ocorre em áreas de sobreposição com pelo menos uma espécie de *Mico* (Van Roosmalen *et al.*, 1998) (Figura 2).

Os calitriquíneos que possuem maior área de distribuição são *Callithrix* e *Saguinus*. *Callithrix* ocorre em grande parte de floresta Atlântica e cerrado central no Brasil; norte da bacia do Rio Paraíba do Sul, no estado de São Paulo; nos interflúvios dos Rios Mearim e Itapecurú no estado do Maranhão (Figura 2). No que diz respeito a *Saguinus*, é distribuído a partir da Amazônia, costa norte da América do Sul e Panamá. As espécies de *Leontopithecus* também são encontradas na floresta Atlântica e sudeste

do Brasil, no estado do Paraná, em simpatria com *Callithrix* (Lorini e Persson, 1990; Rylands *et al.*, 2000).

1.3 Sistemática e Filogenia Molecular dos Calitriquíneos

Nas últimas três décadas a sistemática dos platirrinos tem sofrido grandes modificações e ainda hoje é objeto de debate. As principais discussões iniciaram com Simons (1972), Hershkovitz (1977), e seguiram com Rosenberger (1984), Ford (1986), e Kay (1990). Todas as propostas dos referidos autores eram baseadas essencialmente em estudos morfológicos ou comportamentais, e as principais discordâncias entre os autores diziam respeito à ramificação dentre os três clados principais, dentro dos clados dos atelíneos e calitriquíneos, e também na colocação de *Saimiri*, *Cebus*, *Aotus*, *Callicebus* e *Callimico*.

Hershkovitz (1977) colocou o pequeno *Callimico* na sua própria família Callimiconidae, com base em características peculiares (pequeno tamanho, presença de garras em vez de unhas em comum com os calitriquíneos), gravidez com único filhote e a presença do terceiro molar como no restante das linhagens de platirrinos. Por outro lado, baseados nessas mesmas características controversas, outros morfologistas colocaram *Callimico* como a linhagem basal dos calitriquíneos (Rosenberger, 1984; Ford, 1986; Kay, 1990).

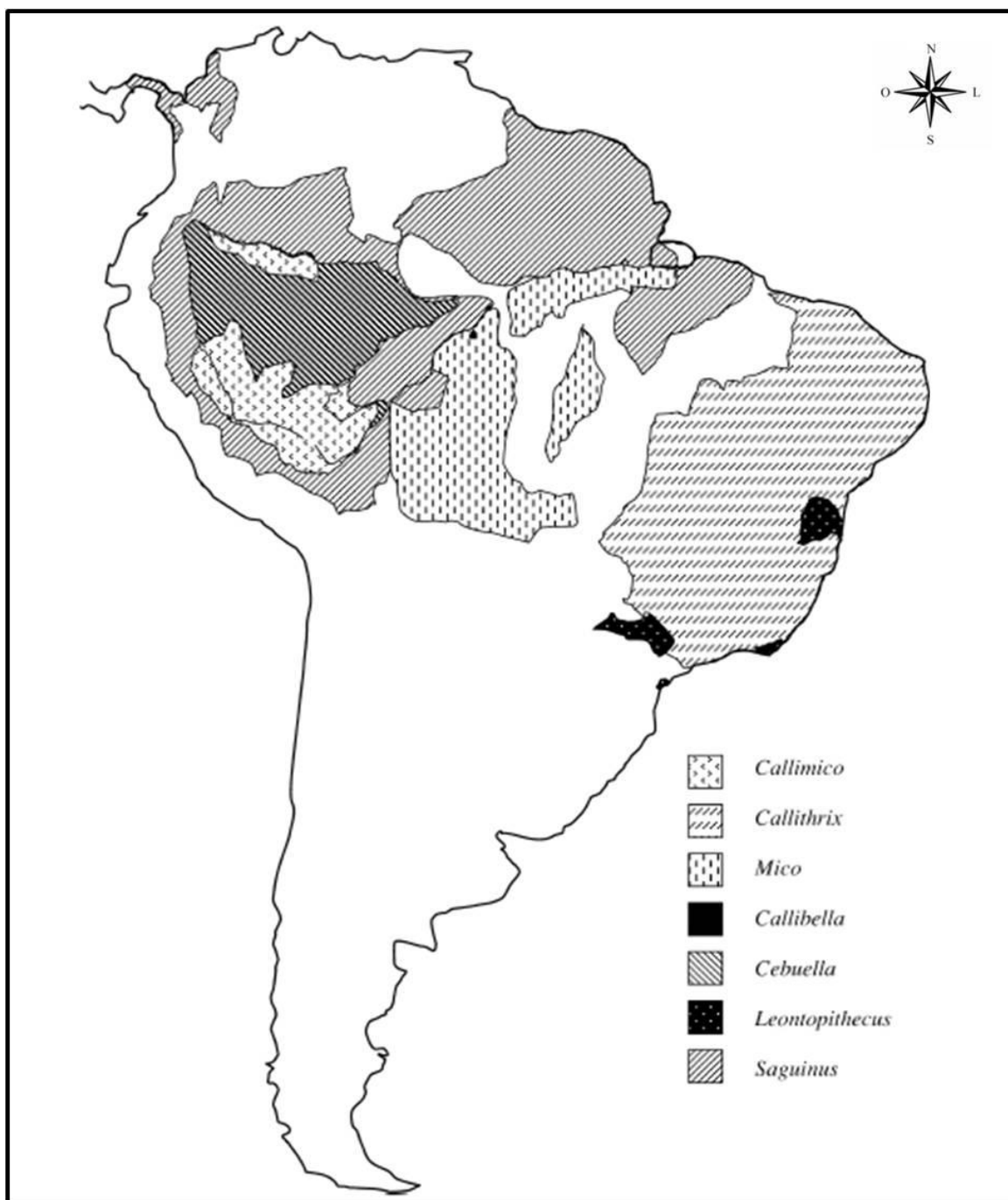


Figura 1 - Mapa da distribuição atual da subfamília Callitrichinae (Fonte: Modificado de Rylands *et al.*, 1993; Eisenberg e Redford, 1999; Van Roosmalen e Van Roosmalen, 2003).

Já Rosenberger (1984) afirmou que *Cebus* e *Saimiri* são grupos irmãos dos calitriquíneos (Figura 2a). No entanto, *Cebus* e *Saimiri* foram considerados por Ford (1986) como descendentes de linhagens bastante antigas na radiação dos primatas do

Novo Mundo (Figura 2b). Kay (1990) sustentou a posição de *Cebus* como basal, mas colocou *Saimiri* como grupo irmão dos calitriquíneos (Figura 2c).

Outro ponto de divergência entre os autores era em relação aos arranjos internos dentro do grupo dos calitriquíneos. Sobre esta questão, a maioria dos autores considerava que *Cebuella* e *Callithrix* eram as linhagens mais derivadas. Para *Saguinus* e *Leontopithecus* havia duas propostas: uma colocava *Leontopithecus* como grupo irmão de *Callithrix-Cebuella* (Rosenberger, 1984; Ford, 1986) e outra colocava *Saguinus* como grupo irmão dos pequenos gomívoros (Kay, 1990).

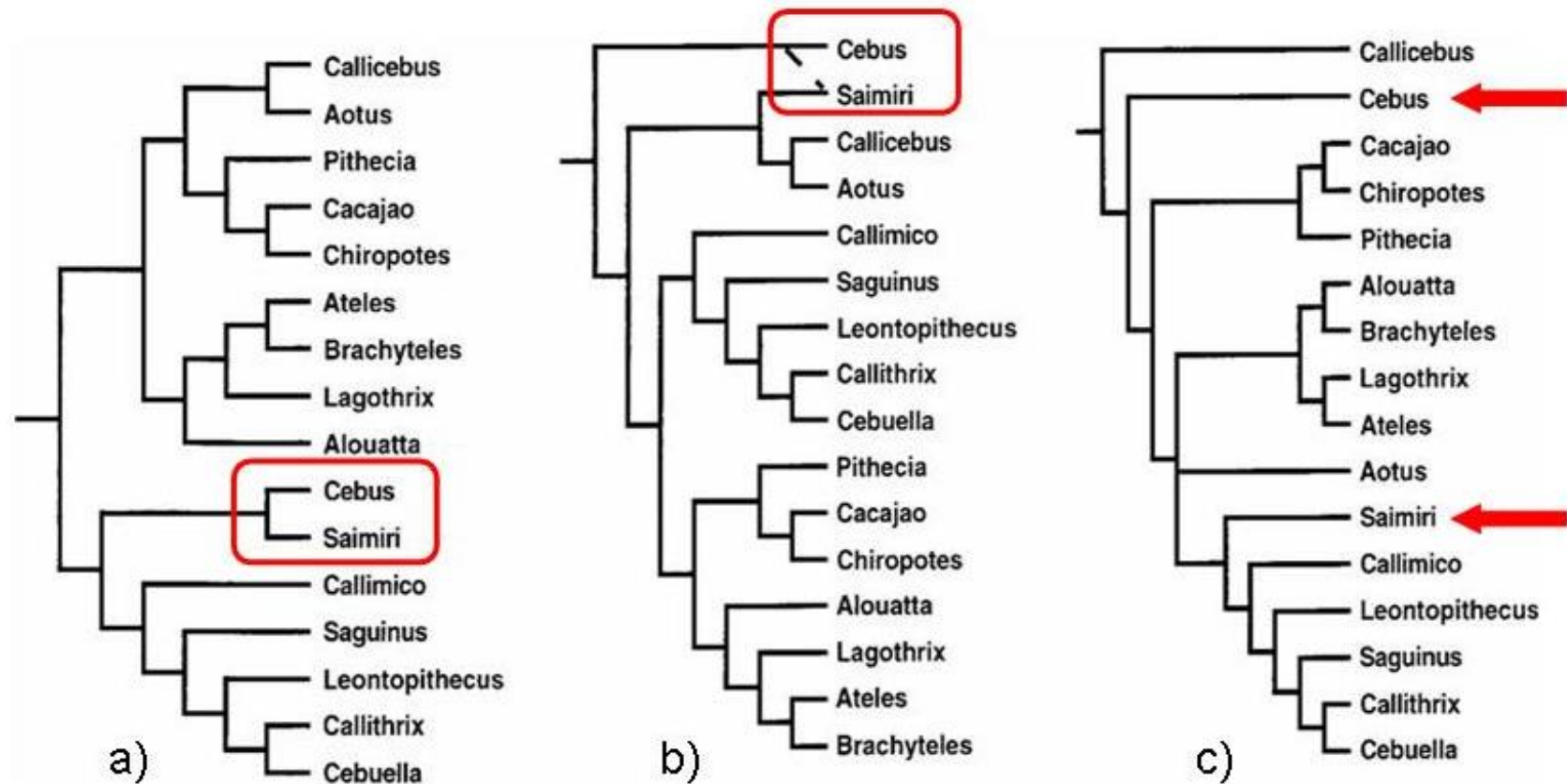


Figura 2 - Árvores filogenéticas de primatas do Novo Mundo obtidas a partir de dados morfológicos - (a) Rosenberger (1984) baseado em vários caracteres morfológicos; (b) Ford (1986) utilizando caracteres morfológicos, dentários e análise cladística; (c) Kay (1990) baseado somente caracteres dentários e análise cladística.

Schneider *et al.* (1993), em um estudo pioneiro envolvendo todos os 16 gêneros de primatas do Novo Mundo, publicou a primeira filogenia molecular a partir de seqüências da gene Epsilon-globina. Dentre os arranjos contrastantes em relação às classificações anteriores, destaca-se a posição de *Callicebus* como o gênero mais basal do clado dos Pitecíneos, um arranjo apoiado por altos valores de *bootstrap* (100%); *Aotus*, *Cebus* e *Saimiri* mostraram-se mais estritamente relacionados com os *Calitriquíneos* (*bootstrap* 99%) do que com as demais linhagens de platirrinos; *Callimico* revelou-se como o grupo irmão de *Callithrix-Cebuella*, e não como linhagem basal dos platirrinos, como defendiam alguns autores (Figura 3).

Os dados moleculares gerados posteriormente confirmaram os arranjos de Schneider *et al.* (1993). A Tabela 2 mostra os resultados sumarizando os quatro conjuntos de dados de seqüências de genes nucleares (IRBP – Proteína transportadora do retinol, G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase, β -2M – Beta-2-microglobulina e Epsilon-globina) para todos os gêneros atuais dos primatas do Novo Mundo, e dados adicionais de vWF (íntron 11 do gene do fator de von Willebrand), região flanqueadora 5' do Epsilon, Gama-globina e ND4 (desidrogenase subunidade 4 do gene mitocondrial).

Na família Pitheciidae, os quatro genes nucleares (*Epsilon*, *IRBP*, *G6PD* e β -2M) mostraram *Callicebus* como grupo irmão dos pitecíneos tradicionais, *Pithecia*, *Chiropotes* e *Cacajao* (*bootstrap* variando de 99 a 100%) (Figura 4). Estes resultados foram similares aos obtidos por Porter *et al.* (1999). Os quatros genes nucleares também apoiaram significativamente a monofilia da família Cebidae e agruparam *Aotus*, *Cebus* e *Saimiri* com a subfamília Callitrichinae (*bootstrap* de 56 a 100%). Três dos quatro genes nucleares (*IRBP*, *G6PD*, β -2M) juntamente com a região flanqueadora 5' de Epsilon, também apontaram para uma estreita relação entre *Cebus* e *Saimiri* (Porter *et al.*, 1997a, 1999).

Quanto aos atelídeos, os dados dos quatro genes (*Epsilon*, *IRBP*, *G6PD* e β -2M) colocaram *Alouatta* como a linhagem mais basal e *Brachyteles-Lagothrix* como compartilhando o ancestral comum mais recente deste clado (com *bootstrap* variando de 99 a 100%) (Figura 4), contrastando com a idéia amplamente propagada de que *Ateles* e *Brachyteles* compartilharam o último ancestral comum no clado dos atelídeos. Meireles *et al.* (1999), utilizando cerca de 9 Kb do gene gama-globina, demonstraram de forma significativa a monofilia do ramo *Lagothrix* - *Brachyteles* (*bootstrap* de 100%).

Quanto aos relacionamentos dentro do grupo dos calitriquíneos, Pastorini *et al.* (1998) com DNA mitocondrial, Chaves *et al.* (1999), utilizando o gene nuclear (vWF), e Canavez *et al.* (1999a, 1999b), utilizando o gene da β -2M, apoiaram fortemente a inclusão de *Cebuella* como membro do gênero *Callithrix*, a exemplo do que havia sido sugerido previamente por Schneider *et al.* (1993), Porter *et al.* (1997b), e Barroso *et al.* (1997) com dados dos genes *Epsilon* e *IRBP*. Estes estudos também colocaram significativamente *Callimico* como grupo irmão do gênero *Callithrix*, contrariando a visão clássica de *Callimico* como sendo basal dos calitriquíneos (valores de *bootstrap* altamente significantes, 98-100%).

Como pode ser observado, muitos trabalhos de inferência filogenética para os primatas do Novo Mundo foram acumulados ao longo dos anos. Contudo, poucos estudos foram feitos com ênfase em clados específicos ou em nível subgenérico, havendo pouca informação a respeito das relações inter-específicas dentro da subfamília Callitrichinae ou com ênfase nos gêneros como, por exemplo, *Saguinus*, *Mico* e *Callithrix*.

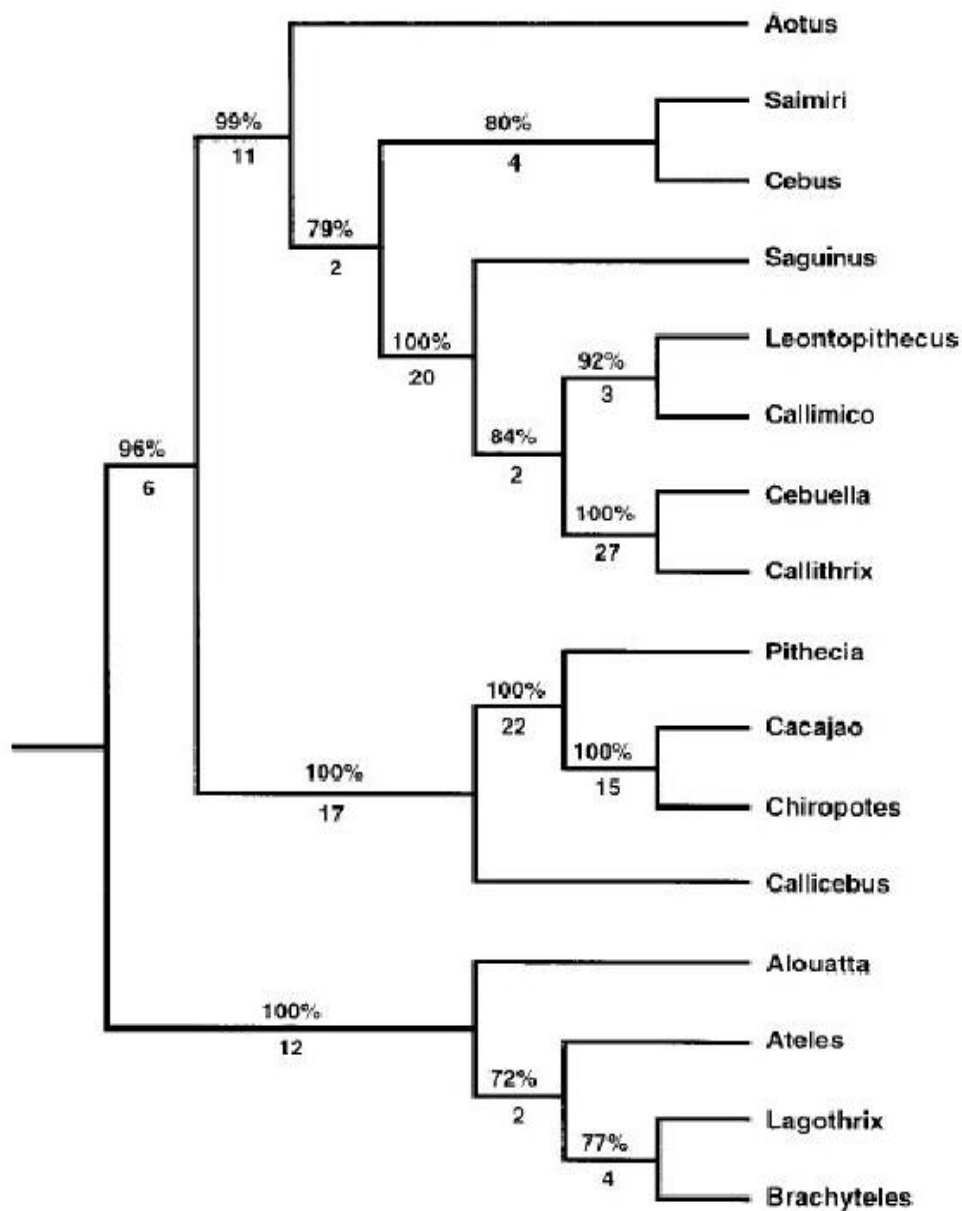


Figura 3 - Árvore de Máxima Parcimônia para 16 taxas de primatas do novo mundo obtida através de seqüências dos genes nucleares Epsilon, os números acima dos nós representam os valores de *bootstrap* obtidos com 1000 pseudoréplicas e os números abaixo dos nós (índice de decaimento de Bremer) indicam o número necessário de mutação para quebrar os ramos (Schneider *et al.*, 1993).

Tabela 2 - Resumo dos resultados dos quatro genes nucleares Epsilon, IRBP, G6PD e B2M juntamente com dados adicionais de regiões acima 5' do Epsilon, vWF, ND4, RNAt e Gama-globina. Esta Tabela foi modificada a partir de Schneider (2000).

Genes	Kb	Autores	Agrupamentos Pitheceinos/Atelineos/Cebideos	<i>Aotus, Cebus e</i>	<i>Callicebus</i>	<i>Lagothrix-</i>	Clado dos Callithrichine	
				<i>Saimiri</i> agrupados com Callithrichinae	mais basal do clado dos Pitheceinos	<i>Brachyteles</i> como grupos irmãos no clado dos Atelineos	<i>Saguinus</i> como gênero basal	<i>Callimico</i> e <i>Callithrix</i> como grupo irmão
			BS%	BS%	BS%	BS%	BS%	BS%
EPSILON	1,8	Shneider <i>et al.</i> (1993)	PA=79	94	99	86	77*	69
IRBP	1,9	Shneider <i>et al.</i> (1996)	PC=96	99	100	77	100	84**
G6PD	1,2	Von Dorman e Ruvolo (1999)	AC=40	83	78	72	100	80
B2M	1,7	Canavez et al. (1999 ^a)	PA=72	56	87	96	100	92
vWF	0,7	Chaves et al. (1999)					98	84
EPSILON e Região 5'	1.8 a 4.3	Porter <i>et al.</i> (1997 ^a)	PAC=100	100				
EPSILON e Região 5'	1.2 a 1.4	Porter <i>et al.</i> (1999)			100			
ND4, RNAt	0,8	Pastorini <i>et al.</i> (1998)					81*	80
γ -Globina	9,6	Meireles <i>et al.</i> (1999)				100		

Suporte do *bootstrap*-BS%; PA=Pitecíneos X Atelineos; PC=Piteceinos X Cebideos; AC=Atelineos X Cebideos; PAC=não resolvida; **Saguinus*-*Leontopithecus* - grupo irmão; ***Callimico*/ *Leontopithecus*- *Callithrix*

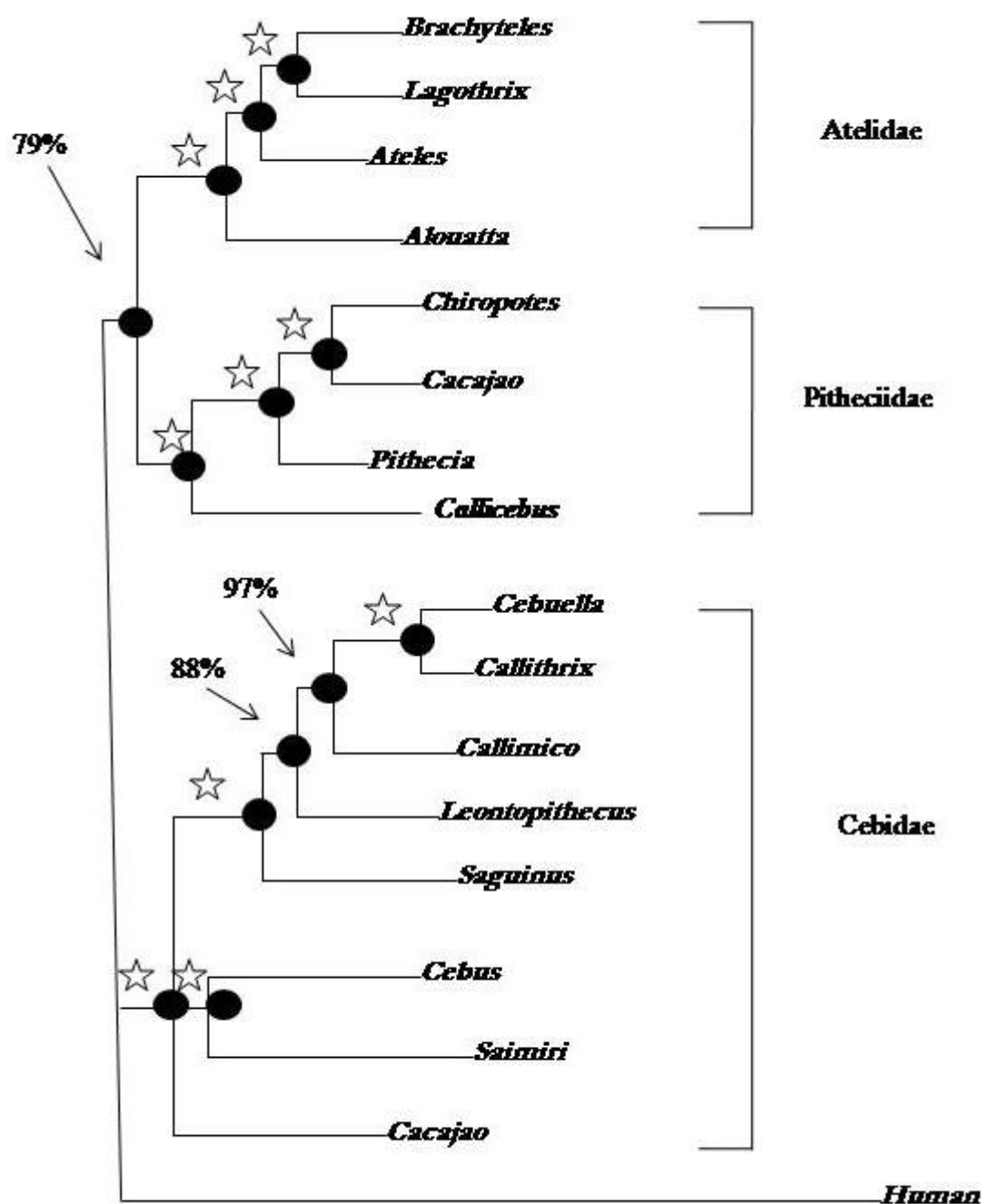


Figura 4 - Árvore de Máxima Parcimônia para 17 seqüências dos genes nucleares β -2M, Epsilon, G6PD e IRBP alinhados em tandem. As estrelas acima dos nós representam os valores de *bootstrap* (variando entre 99-100%) obtidos com 1000 pseudoréplicas (Fonte: Adaptada de Schneider, 2000).

Em nível intragenérico, os sagüis (*Saguinus*) têm sido alvo de investigações nos últimos anos. Vallinoto *et al.* (2000), em um estudo usando um pseudogene mitocondrial, observaram dois clados monofiléticos, um composto por *S. niger* - *S. bicolor* (1) como grupo irmão de *S. midas* e *S. oedipus* como o mais basal, sendo apoiado por altos valores de *bootstrap* (100%). O segundo clado formado por *S. mystax* - *S. melanoleucus* mostrou-se como grupo irmão de *S. bicolor* (2) e agrupados com *Callithrix jacchus* - *C. aurita* e *M. argentata*, juntamente com *Callimico goeldii*, este clado apresentando baixos valores de *bootstrap* (68%). De acordo com Vallinoto *et al.* (2000) tal arranjo observado em relação aos espécimes utilizados de *S. bicolor* pode ser explicado pela escolha de um grupo externo (*Aotus infulatus*) inadequado, resultando num arranjo incoerente entre as amostras de *S. bicolor* e a baixa resolução, filogenética da subfamília Callitrichinae (Figura 5).

Estudos realizados com gene mitocondrial ND1 em nove táxons de *Saguinus* dividiu este gênero em dois grandes grupos: os de corpo pequeno, mais basais e representados pelas subespécies de *S. fuscicollis*, e os de corpo grande representados pelas demais espécies (Tagliaro *et al.*, 2005; Jacobs *et al.*, 1995; Croop *et al.*, 1999 e Araripe *et al.*, 2008). Araripe *et al.* (2008) encontraram resultados similares utilizando gene ribossomal 16S (mitocondrial), onde *S. fuscicollis* é o mais basal dentre os *Saguinus* que foram analisados (*bootstrap* 100%). Estes autores também observaram três clados, um formado por *S. geoffroy*-*S. oedipus*, apoiado por altos valores de *bootstrap* (100%), *S. mystax*-*S. labiatus*-*S. imperator* (*bootstrap* variando entre 81 a 91%) e o clado formado por *S. midas*-*S. niger* e *S. bicolor*-*S. martinsi*, fortemente apoiado (*bootstrap* 100%). O posicionamento de *S. leucopus* não foi definido (Figura 6).

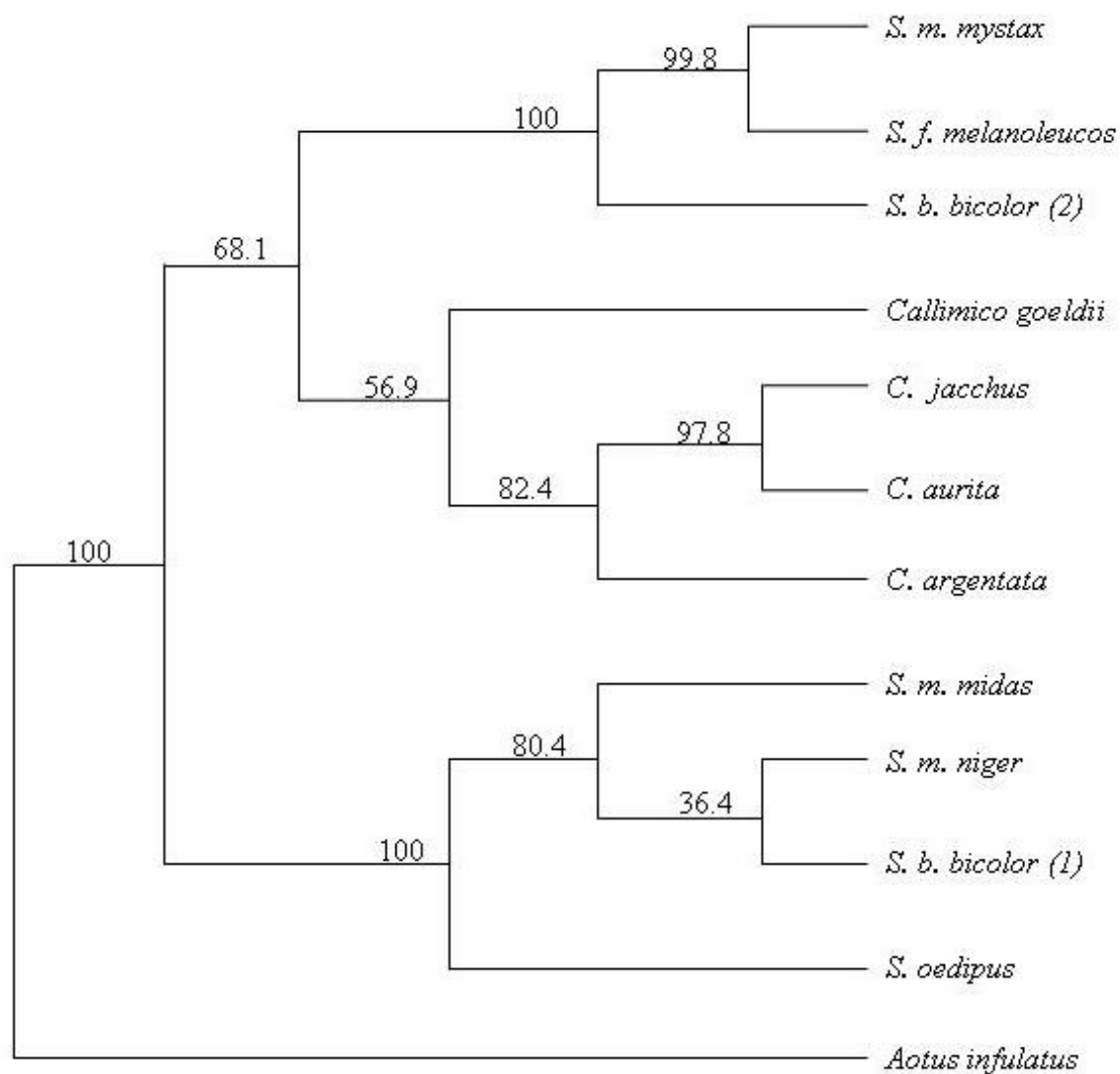


Figura 5 - Árvore filogenética a partir de seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) para 4 gêneros de primatas do Novo Mundo (*Saguinus*, *Callithrix*, *Callimico* e *Aotus*). Os números acima dos nós indicam os valores de *bootstrap* obtidos através da análise de Máxima Parcimônia com 2000 pseudoréplicas (Fonte: Adaptada de Vallinoto *et al.* 2000).

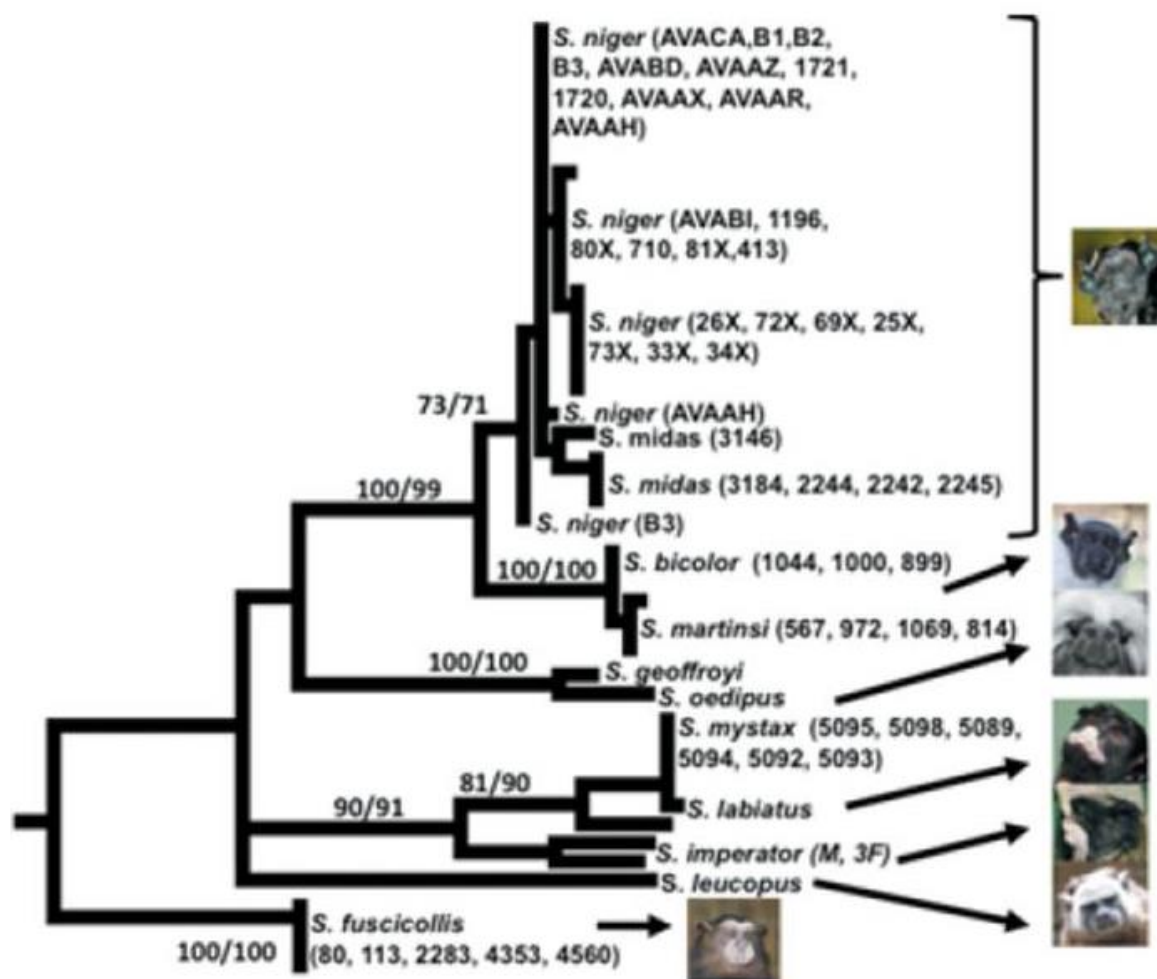


Figura 6 – Proposta filogenética para o gênero *Saguinus* a partir de seqüências do gene mitocondrial 16S, os números acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* de MP e ML, respectivamente (Fonte: Araripe *et al.*, 2008).

Mais recentemente, elementos de transposição têm sido utilizados como marcadores filogenéticos e populacionais, e uma razão para o sucesso destes marcadores é devido ao seu caráter de evolução unidirecional (Hillis, 1999). No estudo de Ray *et al.* (2005), com 183 inserções *Alu* primata-específicas, foram observadas 28 inserções apoiando a monofilia dos platirrinos; este estudo mostrou similaridade mais estreita entre as famílias Atelidae (*Ateles* e *Alouatta*) e Cebidae (*Callithrix*, *Saguinus* e *Aotus*) do que qualquer uma delas com Pitheciidae, como apontado em estudos anteriores (Figura 7).

Quanto aos relacionamentos inter e intra-genéricos, a subfamília Callitrichinae é sem dúvida uma das mais complicadas. Além da definição do gênero basal da subfamília (se *Saguinus* ou *Leontopithecus*), várias questões da taxonomia, tanto de *Saguinus* como de *Callithrix* e *Mico*, ainda merecem atenção. *Callithrix* é formado por dois grupos formalmente definidos: o grupo *jacchus* com uma distribuição geográfica na Mata Atlântica, e o grupo *argentata* distribuído na região Amazônica, recentemente elevado ao nível de gênero (*Mico*) por Mittermeier *et al.* (2000).

No grupo *argentata*, dados obtidos de seqüências de DNA de Tagliaro *et al.* (1997), Chaves *et al.* (1999) e Canavez *et al.* (1999a, 1999b), sugerem que os gêneros amazônidas *Cebuella* e *Mico* sejam estreitamente relacionados, como esperado em função de sua distribuição geográfica. Por outro lado, esses dados não corroboram o reconhecimento de *Mico humeralifera* e da espécie recentemente descrita *M. mauesi* como sendo táxons diferentes (Tagliaro *et al.*, 1997). Somando-se a isso, Tagliaro *et al.* (1997) também não resolveram a relação entre *C. jacchus*, *C. kuhli*, *C. penicillata*, e *C. geoffroyi*, mas a análise mostra claramente que *C. aurita* é a linhagem mais basal deste grupo da Mata Atlântica.

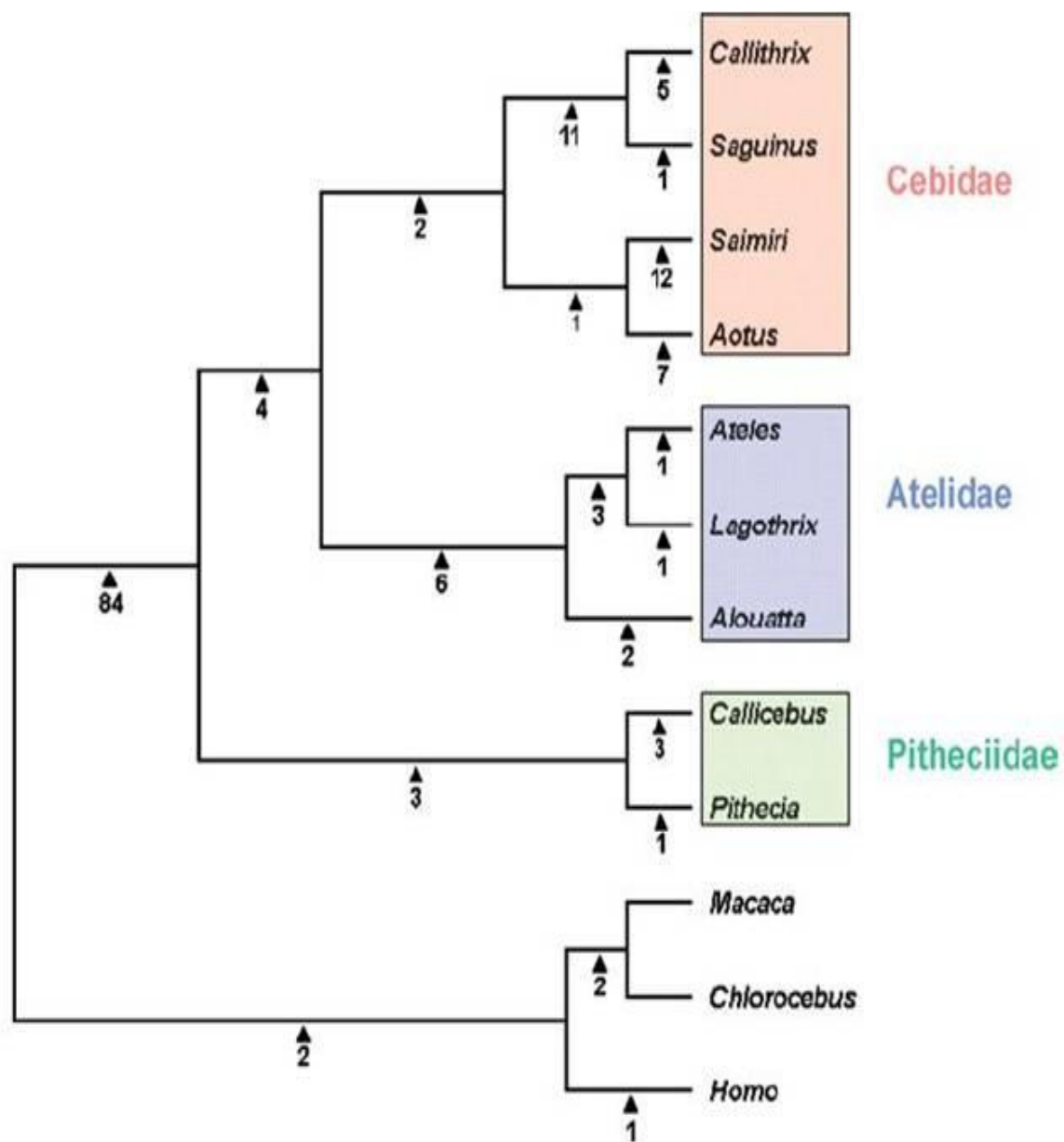


Figura 7 - Árvore mais parcimoniosa gerada da análise de 189 inserções Alu em nove táxons de primatas do Novo Mundo. Os táxons, *Macaca*, *Chlorocebus* e *Homo sapiens* como grupo externo. Números com setas indicam inserções não ambíguas que apoiam o nó (Fonte: Ray *et al.*, 2005).

Os resultados acima foram corroborados pelo trabalho de Sena *et al.* (2002), usando seqüências do gene citocromo oxidase subunidade II (COII) em 12 espécies de calitriquíneos, que mostrou *Callithrix* como grupo irmão de *Mico* (*bootstrap* 76%); no grupo *Mico* formaram-se 3 clados: um clado formado por *M. argentatus*-*M. emiliae* do Pará, outro com *M. humeralifer*, *M. mauesi*, *M. saterei*-*M. melanurus* e a espécie de *Mico cf. emiliae* de Rondônia agrupando na periferia desse clado, todos apoiados por baixos valores de *bootstrap* variando entre 57 a 86%. Dentre de *Callithrix*, a espécie *C. aurita* apareceu como a linhagem mais basal (*bootstrap* 100%) e as demais espécies (*C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. kuhllii*, *C. geoffroyi* e *C. flaviceps*) formaram grupos fracamente apoiados. No que diz respeito a *Cebuella pygmea*, os dados de divergência colocam esta espécie mais relacionado ao grupo dos calitriquíneos amazônidas (*Mico*) (Figura 8).

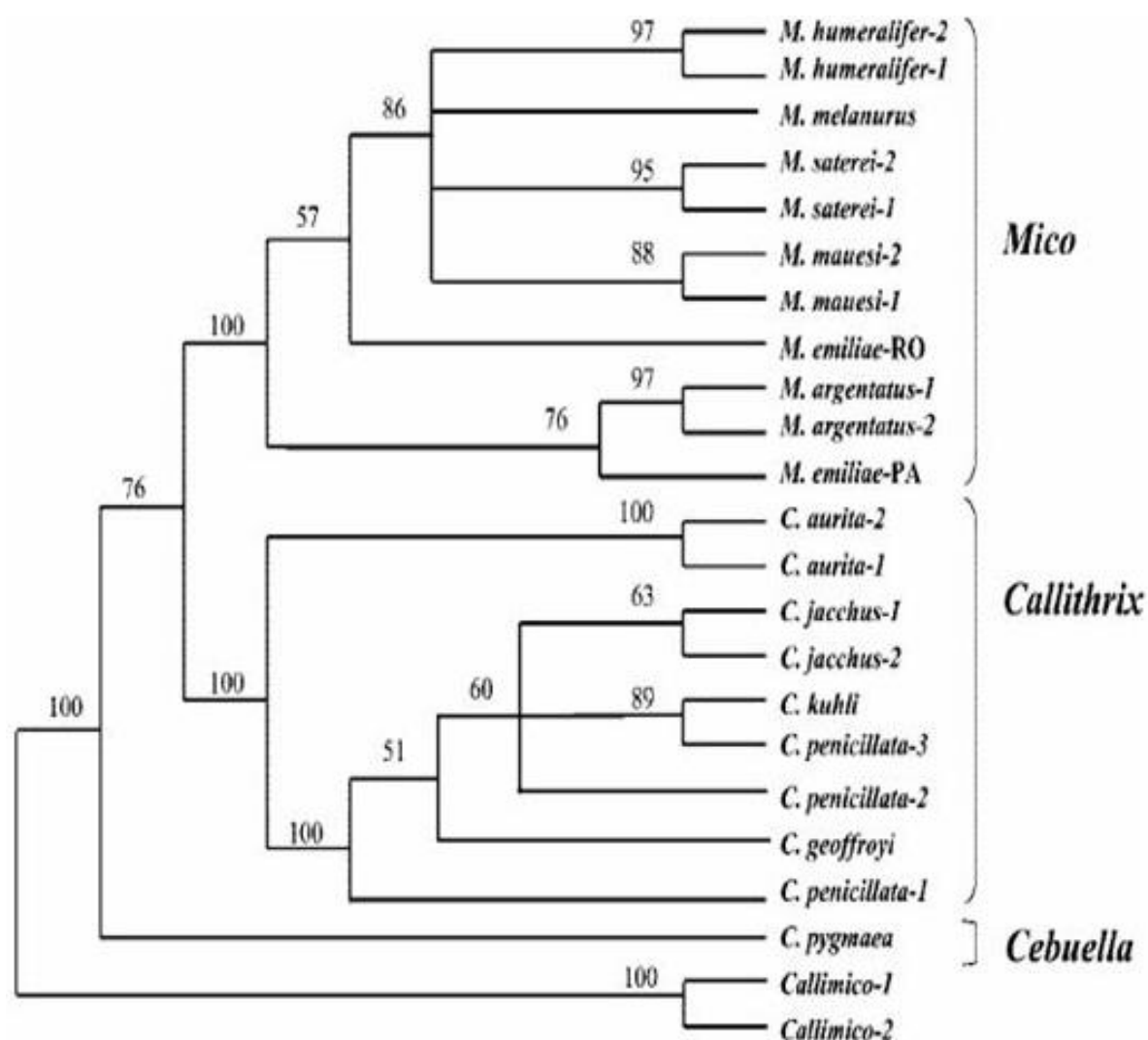


Figura 8 - Árvore de Máxima Parcimônia obtida a partir de seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II (COII) para 12 espécies de calitriquíneos, os números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* (Sena *et al.*, 2002).

1.4 Os Elementos ALU

Os elementos da Classe I estão divididos em duas subclasses: os retrotransposons, elementos que possuem Longas Repetições Terminais (LTRs) são agrupados na subclasse I (retrotransposons com LTRs) e os elementos que não apresentam as LTRs são colocados na subclasse II (retroposons sem LTRs) (Capy 1998).

A super família dos retroposons é composta pelas seqüências LINES (*Long Interspersed Elements*) – Elementos Intercalados Longos, apresentando cerca de 7Kb de tamanho, e SINEs (*Short Interspersed Elements*) – Elementos Intercalados Curtos, com centenas de pares de bases. Os LINES consistem dos elementos: L1 (LINE), R2, R1, Jockey e Tayt-HetA. Os SINES são formados pelos elementos: *Alu*, S1, B1 e B2, respectivamente (Capy *et al.*, 1998). Os elementos móveis mais conhecidos e estudados são os retroposons *Alu*, que são SINEs primata-específicos e possuem um tamanho variável entre 75 a 500 pares de bases.

Estes elementos são extremamente bem sucedidos dentro do genoma dos primatas em termos de números de cópias por genoma. Durante a evolução dos primatas, há mais de 60 milhões de anos, aproximadamente um milhão de cópias de DNA repetitivo (*Alu*) têm se acumulado em seus genomas (Schmid e Jelinek, 1982). Segundo Li (2001), as seqüências repetitivas *Alu* constituem cerca de 10% do genoma humano, com aproximadamente um milhão de cópias por genoma.

Os *Alu* são compostos de dois dímeros derivados de 7SL RNA, formando duas subunidades ricas em guanina/citosina conectadas em uma via rica em adenina e terminando em uma ponta de poli-adenina (Figura 9). Como SINEs pertencem a classe I dos elementos transponíveis (retroposons), a replicação é mediada por um RNA intermediário. Este RNA possui um promotor interno para RNA polimerase III, mas a sua transposição depende da

maquinaria enzimática codificada pelo gene da transcriptase reversa presente nos elementos intercalados longo - LINES (Figura 10) (Ogiwara *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 1997).

Durante o processo de integração da inserção mediado por uma endonuclease, a inserção é introduzida dentro da sequência alvo, resultando em uma repetição direta (DRs) flanqueando a inserção SINE. A transposição de um SINE pode ser considerada um evento único e irreversível (Cook e Tristem, 1997; Hamdi *et al.*, 1999; Shedlock e Okada, 2000). Segundo Lagemaat *et al.* (2005), as sequências SINEs (*Alu*) são usadas como uma característica unidirecional. Isto é, a ausência da inserção representa o estado ancestral, isto porque a remoção de um *Alu* é extremamente rara após sua fixação no genoma. Não existe evidência de que uma vez inserido um retroelemento ele seja removido (Cook e Tristem, 1997; Hamdi *et al.*, 1999; Shedlock e Okada, 2000). Assim, marcadores tipo SINE não apresentam homoplasia, já que a probabilidade de compartilhamento de SINEs no mesmo sitio por dois táxon diferentes é extremamente rara (Batzer e Deininger, 2002; Hamdi *et al.*, 1999; Hillis, 1999; Myamoto, 1999; Roy-Engel *et al.*, 2002; Salem *et al.*, 2003a; Shedlok e Okada, 2000).

Vários estudos têm utilizado elementos móveis para fazer inferências a respeito das relações filogenéticas entre diversos grupos de animais. Segundo Shimamura *et al.* (1997), utilizando elementos SINEs, os cetáceos (baleia, golfinho e boto) formam um clado fortemente apoiado dentro dos Artiodactyla, Takahashi *et al.* (2001), também utilizando elementos de transposição (SINEs), elucidou as relações filogenéticas entre os peixes ciclídeos do lago Malawi. Salem *et al.* (2003) analisando elementos de transposição (SINEs), produziu uma filogenia para os homínídeos. O trabalho de Schmitz *et al.* (2001) apoia uma relação mais estreita entre tásio e os antropóides.

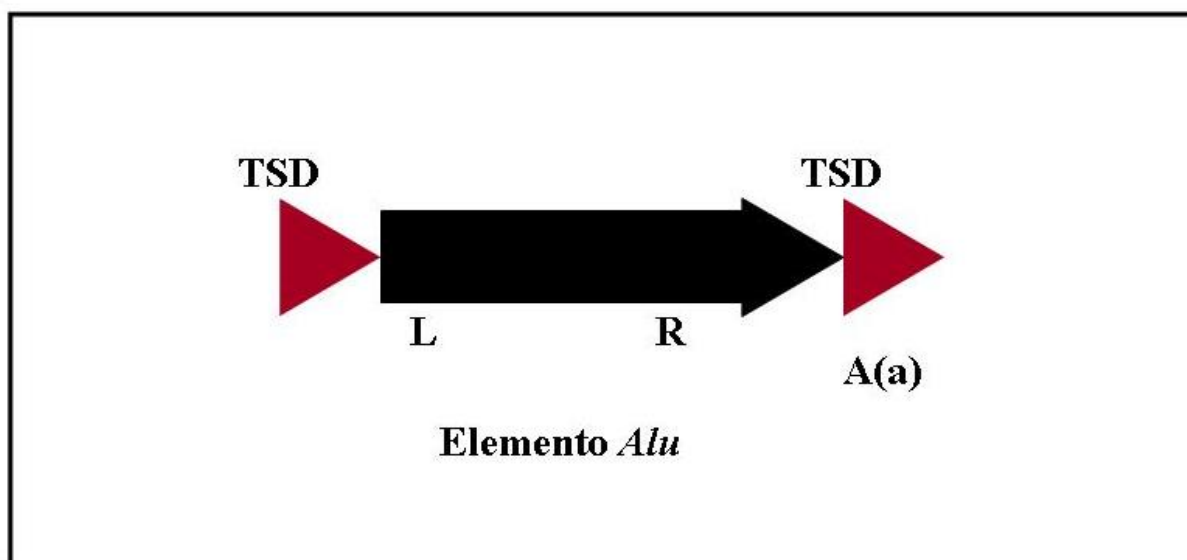


Figura 9 - Esquema representativo da estrutura de um elemento *Alu* (retroposon não-autônomo); (TSD) – Sítios alvos duplicados, (L) – monômero da esquerda; (R) – monômero da direita; A(a) – cauda de poliadenina (Fonte: Adaptado de Kazazian *et al.* 2004).

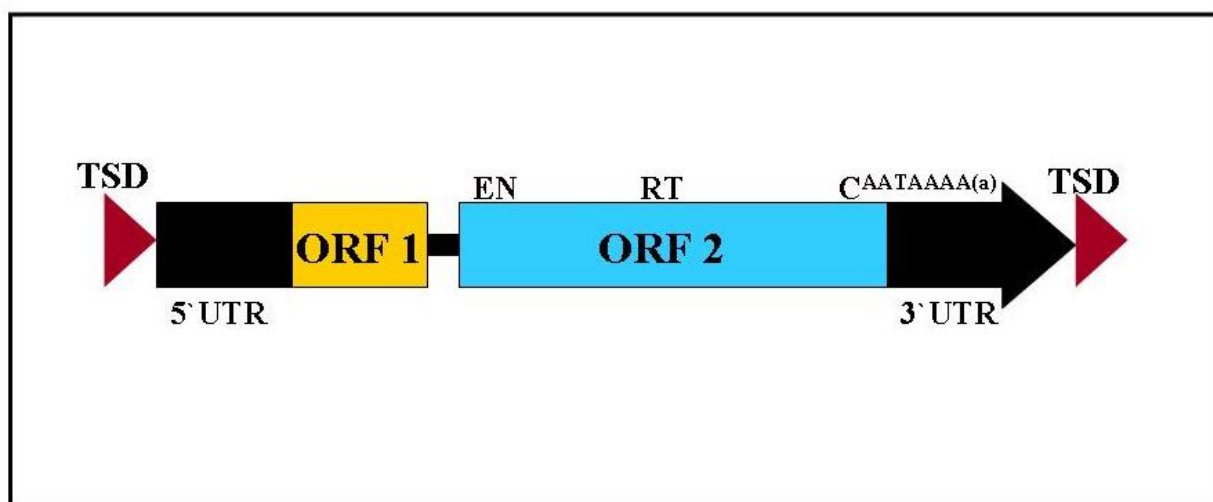


Figura 10 - Representação esquemática mostrando a estrutura de um elemento L1 (retrotransposon autônomo) com 6 kb de tamanho. TSD – Sítios alvos duplicados; 5'UTR – região não codificante; ORF 1 e 2 – matriz de leitura codificante da transposase; EN – sítios da endonuclease; RT – sítios da transcriptase reversa; C – sítios conservados ricos em cisteína; 3'UTR - região não codificante; AATAAAA – sinal de terminação da inserção de poliadenina; a – cadeia final de poliadenina. Adaptado de Kazazian *et al.* (2004).

1.5 Justificativa

No Brasil os primatas da subfamília Callitrichinae são encontrados nas florestas Amazônica e Atlântica, as quais estão sobre forte pressão de desmatamento, e o ritmo acelerado da degradação do habitat compromete a sobrevivência desses pequenos macacos na região e pode, em um futuro não muito distante, levar ao desaparecimento de muitas espécies.

Apesar do considerável volume de trabalhos focados nas relações filogenéticas entre os primatas do Novo Mundo, a diversidade de táxons, especialmente da subfamília Callitrichinae, é exuberante e ainda necessita de estudos taxonômicos adicionais. O relacionamento entre *Mico* e *Callithrix* e as ramificações dentro de cada grupo, a posição de *Callibela* (ou *Mico humilis*) em relação aos demais táxons amazônicos, são exemplos de algumas questões importantes que merecem melhor investigação.

Considerando que cada *Alu* é o “fóssil” de um evento de transposição que ocorreu somente uma vez na evolução dos primatas, as inserções *Alu*, assim como um gene, são transmitidas dos pais para os filhos, assim, entende-se que todos os primatas que apresentam uma inserção *Alu* em determinado loco a herdaram do seu ancestral comum. Contudo, as análises das inserções *Alu* são baseadas somente na presença ou ausência da mesma, sendo que, as análises tradicionais verificando as mutações das inserções quase não são utilizadas. Além da utilidade taxonômica, o uso desta ferramenta, acoplada às informações já existentes, poderá fornecer dados muito precisos no que diz respeito à calibração do relógio molecular possibilitando datações mais precisas sobre a irradiação do grupo dos pequenos macacos.

1.6 Objetivos

1.6.1 Geral:

O presente trabalho tem como objetivo geral utilizar sequências de elementos *Alu* para investigar as relações filogenéticas entre e dentro dos representantes de três gêneros (*Saguinus*, *Mico*, *Cebuella* e *Callithrix*) da subfamília Callitrichinae.

1.6.2 Específicos:

- Definir as relações de parentesco das espécies de *Saguinus*;
- Determinar a posição de *Callibella* em relação aos demais gêneros amazônicos;
- Determinar a relação de parentesco entre os gêneros *Callithrix*, *Cebuella* e *Mico* e comparar com outras propostas disponíveis na literatura;
- Determinar o arranjo filogenético entre quatro espécies de *Callithrix*;
- Estimar o tempo de divergência entre os gêneros *Saguinus*, *Mico* e *Callithrix*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem e Extração de DNA

Foram coletadas 14 espécies de primatas do Novo Mundo, representantes dos gêneros *Saguinus*, *Callithrix*, *Mico* e *Cebuella* (Tabela 3). As amostras foram devidamente armazenadas a -20C° em congeladores do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Campus de Bragança da Universidade Federal do Pará. Na extração do DNA total foi utilizado 20mg ou 80µl de sangue que foi digerido por ribonucleases durante 40 min a 37 °C e dissolvido por uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) e proteinase K a 55 °C por 1 hora. Em seguida o material foi submetido à lavagem com fenol clorofórmio e precipitado por acetato de sódio e isopropanol, por fim o DNA total foi hidratado e congelado (Sambrook *et al.* 1989).

2.2 PCR e Sequenciamento

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi usada para a amplificação das regiões Alu do genoma nuclear com iniciadores específicos desenvolvidos por Ray *et al.* (2005) (Tabela 4). O protocolo foi padronizado para o volume final de 25 µL, contendo 4 µL da mistura de dNTPs (1,25 mM), 2,5 µL de tampão 10x (Invitrogen – Tris-HCl e KCl, pH 7,8), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de DNA (~150 ng do DNA total), 0,25 µL de cada iniciador (200ng/µL), 0,2 µL de Taq (5 U/µL) polimerase (Invitrogen) e água destilada para completar o volume final da reação. Em geral as condições durante a reação foram: desnaturação inicial de 94° por 4 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94° a 1 min, a temperatura de anelamento variou entre 50-65° por 1 min e extensão a 72° por 2 min, e finalizando com uma extensão de 7 min.

Tabela 3 – Amostras de primatas utilizadas no presente trabalho.

Nome científico	Código	N	Fonte	Origem Geográfica
<i>Cebuella pygmaea</i> (3; 8)	CPYG(2)	2	LGBM	CENP
<i>Callibella humilis</i> 02	CALL2	1	LGBM	AM
<i>Callithrix jacchus</i> (34; 43)	CJAC(2)	2	LGBM	RN
<i>Callithrix kuhlii</i> 627	CKU627	1	LGBM	CPRJ - cativoiro
<i>Callithrix penicillata</i> 92	CPEN92	1	LGBM	UNB – cativoiro
<i>Callithrix geoffroyi</i> (602; 1004)	CGEO(2)	2	LGBM	UNB - cativoiro
<i>Saguinus niger</i> (1278; 1793)	SMN(2)	2	LGBM	PA
<i>Saimiri sciureus</i> (01)	SAIMI01	1	LGBM	PA
<i>Saguinus midas</i> (34; 2088)	SMM(2)	1	LGBM	PA
<i>Saguinus labiatus</i> (02)	SLAB02	1	Genebank	Ray <i>et al.</i> (2005)
<i>Saguinus bicolor</i> (932)	SBB932	1	LGBM	PA
<i>Saguinus fuscicollis</i> (77; 78)	SFUSC(2)	2	LGBM	RO
<i>Saguinus mystax</i> (5082; 5086)	SMYST(2)	2	LGBM	AM
<i>Mico argentata</i> 02	MARG02	2	LGBM	PA
<i>Mico emiliae</i> (4221; 4159)	MEMI(2)	2	LGBM	RO
<i>Cebus apella</i> 35	CAPE35	1	LGBM	PA

CENP=Centro Nacional de Primatas (PA); CPRJ=Centro de Primatas do Rio de Janeiro; As amostras coletadas no Campo (Campo) foram obtidas durante a construção de usinas hidrelétricas no rio Tocantins (UHE-Tucuruí-PA), no rio Uatumã (UHE-Balbina- AM) e no Rio Jamari (UHE-Samuel). LGBM= amostras coletadas e armazenadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Estudos Costeiros (Campus de Bragança). Genebank: AAlu1BF3_AY620486; SagAlu1D132a_AY620641; SagAlu1D29_AY620626; SagAlu1D39_AY620649; <http://batzerlab.lsu.edu/pub2005.html#04>.

Tabela 4- Número de locos com a sequência dos iniciadores que foram utilizados no presente trabalho e localizações nos Cromossomos dos Callitrichineos.

Primer	Sequência 5' - 3' F/R	Cromossomo	Localização
1 - SF7	GAGTCTCACAGCCCTCCAAG – F	X	138549403/
	TGAATCTAACACCTCTGAATGTAGGC - R		138549715
2 - AAlu1B_F3	GTCAGTGAAGCTGCACTCAGGG – F	1	211753007/
	GCAGTGCCCTTGAACCTGGCA - R		211753516
3 - Sag_AlulD_132a	TGGATGTCTCACAGCTCCAA – F	7	23047208/
	TTGATGYCCTTCCCCAAGAC - R		23047500
4 - Sag_AlulD_29	TTGCTGACTGCAGAAGGAAG – F	12	75464416/
	GCTGAGACCAGACTCCCAGT - R		75464615
5 - Sag_AlulD_39	TGAAGAGAAGCTCATTTGTGAG - F	15	85622085/
	ATGGGCAACCAACACTCYGT - R		85622406

Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o *kit* ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., UK) e em seguida submetidos à reação de sequenciamento pelo método de dideoxinucleotídeos terminais (Sanger *et al.* 1977) com o *kit* de reagentes Big Dye (*ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* — Applied Biosystems, USA). A reação foi realizada para um volume final de 10 µL, adicionando 0,5 µL de um dos iniciadores, 1 µL de produtos da PCR, 1 µL de mix Big Dye, 2 µL de Tampão e 5 µL de água destilada. Os reagentes não incorporados durante a reação foram eliminados através da lavagem com isopropanol e etanol. As sequências foram obtidas por meio do sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), sendo que alguns fragmentos foram sequenciados em ambas as direções com o intuito de obter o máximo de pares de base dos mesmos e aumentar a precisão da sequência. O marcador Sag AlulD_29 foi sequenciado para todas as amostras, exceto para as amostras de *S. midas*, *S. bicolor* e *S. mystax*.

2.3 Alinhamento das sequências

As sequências foram alinhadas automaticamente pelo programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) implementado no editor de sequências BioEdit versão 7.0.5.2 (HALL, 1999) que foi utilizado para inspeção visual e possíveis correções.

A composição nucleotídica, números de sítios conservados, variáveis e parcimoniosos foram calculados no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007) e para verificar o nível de saturação dos marcadores foram construídos gráficos relacionando o número de transições e transversões *versus* a divergência de cada região no programa DAMBE versão 5.0.80 (Xia e Xie 2001). Além disso, a significância da incongruência entre as sequências foi verificada através do Teste de Homogeneidade de Partição (THP) (Farris *et al.* 1995) com 10000 réplicas, através do programa PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony* and Other Methods) (Swofford 2002).

2.4 Análises Filogenéticas

As árvores filogenéticas foram enraizadas com as espécies *Cebus apella* e *Saimiri sciureus*, as quais são consideradas mais proximamente relacionadas à subfamília Callitrichinae de acordo com estudos anteriores (Schneider 2000; Opazo *et al.* 2006).

A reconstrução das relações filogenéticas foi realizada seguindo os métodos de: Máxima Parcimônia (**MP**), Máxima Verossimilhança (**MV**), Inferência Bayesiana (**IB**) e Inferência Bayesiana Hierárquica (IBH). O programa PAUP*4b10 foi usado para a construção da árvore de **MP**, sendo a confiabilidade dos ramos testada por meio de 1000 réplicas de *bootstrap*. As análises de **MV** foram feitas no programa PhyML versão 3.0 (Guindon e Gascuel 2003), sendo o índice de confiança igualmente estabelecido por meio de 1000 réplicas de *bootstrap*. Os modelos de substituição nucleotídica mais adequados a cada banco de dados

foram escolhidos pelo programa jModeltest 0.1.1 (Posada 2008) segundo o AIC (Akaike Information Criterion).

A inferência Bayesiana foi realizada através do programa MrBayes 3.1 (Ronquist e Huelsenbeck 2003) por meio de duas corridas independentes (comprimento da cadeia foi 2.000.000 gerações). A qualidade das corridas foi observada através do programa Tracer v1.4 (Rambaut e Drummond 2007), garantindo que o tamanho efetivo das amostras (ESS) foi adequado para todos os parâmetros seguindo as recomendações dos autores. A inferência Bayesiana Hierárquica foi feita por meio do programa Best (Liu, 2008). Para a escolha dos modelos evolutivos foi utilizado o programa jModeltest 0.1.1 (Posada 2008) segundo o critério de informação bayesiano (BIC). No programa Best (Liu, 2008) foi gerada a “árvore de espécie” com 100 milhões de gerações (ngen=100.000.000), sendo que, as primeiras 5 milhões de árvores foram descartadas (printfreq=1000; burnin=5.000). A qualidade da corrida foi observada no programa Tracer v1.4 (Rambaut e Drummond 2007). Todas as árvores obtidas foram visualizadas e editadas no programa FigTree v.1.2.2 (Rambaut 2008), sendo que o PAUP versão 4b10 (Swofford, 2002) também foi usado para a construção das matrizes de divergência genética (distância P e distância corrigida do banco e dados total).

2.5 Estimativa do tempo de divergência

Os eventos de especiação foram datados usando a abordagem MCMC (*Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo*) implementada no programa BEAST v1.4.8 (Drummond e Rambaut 2007). Como existe uma grande quantidade de trabalhos com dados moleculares para os primatas o Novo Mundo, o ponto de calibração da árvore Bayesiana foi calculado com base no tempo divergência das linhagens de *Saguinus*, *Cebus apella* e *Saimiri sciureus*

estimada com base nos dados de Schneider (2000) e Opazo *et al.* (2006). Para tal análise foi usado apenas o banco de dados total.

O tempo do ancestral comum mais recente (**TMRCA**) dos principais clados foi calculado usando o método do relógio relaxado (*lognormal*), que assume taxas independentes sobre diferentes ramos (Drummond *et al.* 2006). As árvores prévias foram modeladas de acordo com o processo de especiação *Yule*, todas as outras informações prévias seguiram os valores padrões do Programa BEAST v1.4.8. As análises de MCMC foram feitas através de uma corrida de 10 milhões de gerações e amostrada a cada 100 gerações, sendo 10% das amostras descartadas (*burnin*). Os resultados foram inspecionados usando o Tracer v1.4 (Rambaut e Drummond 2007) e posteriormente o resultado da corrida foi submetido ao TreeAnnotator v1.4.8 (Drummond e Rambaut 2007) para a inclusão dos tempos de calibração nos ramos da árvore obtida. Da mesma forma que na análise filogenética, a árvore final foi visualizada no programa FigTree v.1.2.2 (Rambaut 2008).

3 RESULTADOS

3.1-*Características dos bancos de dados*

As características quantitativas das sequências estão enumeradas na Tabela 5. As sequências concatenadas possuem cerca de 2500 pares de bases por táxon, dos quais 334 sítios são variáveis e 232 são informativos para parcimônia. Algumas amostras foram completadas com interrogações, assim como com deleções.

Tabela 5: Características dos bancos de dados analisados no presente estudo

	Alu1BF3F	SF7F	SAG39F	SAG132F	SAG29F	Total
Nº de sítios	741	492	392	406	503	2534
Nº de sítios parcimoniosos	54	42	49	39	48	232
Nº de sítios variáveis	101	61	62	57	53	334
Nº de sítios conservados	639	431	330	349	448	2197
Nº de sítios com deleções	16	6	6	2	9	39
A%	30,6	29,8	31,7	32,9	32,8	31,3
C%	19,8	19,3	22	19,2	21,6	20,2
G%	25,5	25,0	23,7	27,7	23,1	25,1
T%	24,1	25,9	22,6	20,1	22,6	23,4

Nenhum dos fragmentos apresentou saturação (dado não mostrado) e o Teste de Homogeneidade de Partição não rejeitou a concatenação entre os cinco loci seqüenciados ($p > 0,05$), por isso foram criados cinco bancos de dados (F3F, SF7, SAG39F, SAG132F, SAG29F) e um concatenado com todos os marcadores. Para as análises de cada conjunto de dados foram escolhidos pelo jModeltest os seguintes modelos de acordo com AIC: TPM3uf, TrNef+G, TPM2+G, HKY+G, TPM1uf e HKY + G respectivamente, sendo as características de cada modelo evolutivo listadas no Anexo.

3.2-Divergência genética

As seqüências analisadas apresentaram pouca variação, sendo que os cálculos das distâncias genéticas dentro e entre os grupos foram realizados somente para o banco total (Tabela 6). Analisando o banco de dados total, observa-se que a média da divergência genética é de 3,6% (0,1-8,2%) para a distância P (**DP**) e 4,5% (0,1-10,6%) para a distância corrigida (**DC**). Já quando se compara com o grupo externo a divergência é de 4,3% (0,2-8,2%) e 5% (0,2-10,6%) para **DP** e **DC**, respectivamente.

A divergência genética média dentro de *Saguinus* variou de 1,9% **DP** e 2,2% **DC**, sendo a menor divergência observada entre *S. midas* e *S. niger* (0,3% **DP** e 0,35% **DC**) e a maior distância genética foi entre *S. labiatus* e *S. fuscicollis* (3,6% **DP** e 4,1% **DC**). Nas comparações das divergências interespecíficas de *Mico*, a média foi de 1,1% (0,1 a 1,6%) **DP** e 1,16% (0,1 a 1,7%) **DC**, sendo as maiores distâncias observadas entre *M. emiliae* e *C. pygmaea* (1,4% **DP** e 1,5% **DC**) e *Callibela humilis* e *C. pygmaea* (1,4% **DP** e 1,5% **DC**), e a menor divergência entre *M. argentata* e *M. emiliae* (0,2% **DP** e 0,25% **DC**).

No que diz respeito à distância genética média, dentro de *Callithrix* os valores foram de 0,7% (0,4-0,8%) para **DP** e 0,73% (0,4-0,9%) para **DC**, observando-se baixíssimos valores

de divergência dentro deste grupo, e a maior distância entre *C. penicillata* e *C. geoffroyi* (0,8% **DP** e 0,9% **DC**). Quando se comparam os três gêneros com o grupo externo observa-se maior divergência destes com *Saimiri*, média de 8% (6,6- 8,2%) **DP** e 9,4% (8,4-10,6%) **DC** e menor distância em relação à *Cebus* 5% (4,4-5,6%) **DP** e 6% (5,2-6,9%) **DC**.

Tabela 6: Percentagem de divergência nucleotídica entre pares de espécies de Callithricneos calculadas a partir do banco total de sequências ALU. Acima da diagonal estão os valores da distância P e abaixo da diagonal os valores da distância corrigida (HKY + G).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	SAIMI01	CAPE35	SMM (2)	SMN (2)	SBB932	SLAB02	SMYST (2)	SFUSCI (2)	CPEN92	CJAC (2)	CGEO (2)	CKU627	MEMI (2)	MARG02	CALL2	CPYG (2)
1 SAIMI01		5.5	8.0	8.0	8.2	7.7	7.4	7.1	7.7	7.2	7.3	7.8	6.6	6.7	7.1	7.2
2 CAPE35	6.7		5.5	5.4	5.6	5.6	4.8	5.0	5.3	4.8	4.9	5.3	4.5	4.5	4.9	4.4
3 SMM (2)	10.4	6.7		0.3	1.0	2.3	1.6	3.1	5.2	5.3	5.4	5.1	5.2	5.2	5.0	5.1
4 SMN (2)	10.4	6.6	0.3		1.1	2.3	1.5	3.0	5.1	5.5	5.3	5.1	5.5	5.4	5.3	5.5
5 SBB932	10.6	6.8	1.0	1.1		2.6	1.9	3.0	5.1	5.2	5.2	4.9	5.1	5.0	4.9	5.1
6 SLAB02	9.9	6.9	2.6	2.5	2.9		1.6	3.6	6.4	5.7	5.4	6.0	5.6	5.4	5.6	5.5
7 SMYST (2)	9.4	5.8	1.7	1.5	2.1	1.7		2.8	5.4	5.5	5.2	5.3	5.3	5.2	5.2	5.2
8 SFUSCI (2)	8.9	6.0	3.5	3.4	3.3	4.1	3.1		5.8	5.8	5.5	5.6	6.0	5.9	5.8	5.7
9 CPEN92	10.5	6.8	6.4	6.3	6.1	8.3	6.7	7.2		0.6	0.8	0.6	2.3	2.1	2.3	1.8
10 CJAC (2)	9.3	5.8	6.5	6.9	6.3	7.1	6.7	7.2	0.6		0.8	0.6	2.0	2.0	2.0	1.8
11 CGEO (2)	9.4	5.9	6.6	6.6	6.3	6.6	6.2	6.8	0.9	0.8		0.4	1.9	1.9	1.8	1.7
12 CKU627	10.6	6.6	6.3	6.3	5.9	7.5	6.5	7.0	0.6	0.7	0.4		1.9	1.7	1.8	1.5
13 MEMI (2)	8.4	5.3	6.4	6.9	6.3	6.9	6.6	7.5	2.5	2.2	2.1	2.0		0.2	0.9	1.4
14 MARG02	8.4	5.3	6.3	6.8	6.1	6.7	6.4	7.4	2.3	2.1	2.0	1.9	0.2		0.8	1.3
15 CALL2	9.2	5.8	6.0	6.5	5.9	6.9	6.4	7.2	2.4	2.2	1.9	1.9	1.0	0.9		1.4
16 CPYG (2)	9.3	5.2	6.2	6.8	6.1	6.8	6.4	7.1	2.0	1.9	1.8	1.6	1.5	1.4	1.5	

3.3-Relações Filogenéticas

Foram criadas árvores de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (MV) e inferência Bayesiana (IB) (Figura 11) e Inferência Bayesiana Hierárquica (IBH) (Figura 12). Nas topologias produzidas, os valores de suporte dos ramos abaixo de 85% de *bootstrap* MP, MV e menores do que 0,5 de probabilidade posterior foram omitidos. Além disso, foram geradas árvores para todos os loci individualmente, contudo, não foi notado nenhum agrupamento significativo (*bootstrap* > 50%), sendo as mesmas não incluídas no texto.

As árvores filogenéticas geradas através dos métodos de MP, MV e IB apresentaram topologias muito semelhantes, assim como a topologia a partir da árvore gerada pelo método Bayesiano Hierárquico (árvore de espécies).

Dentro do gênero *Saguinus* foram observados dois clados, um representado pelos sagüis de corpo pequeno, (*S. fuscicollis*) e os de corpo grande representados pelas demais espécies, sendo *S. fuscicollis* o táxon mais basal do gênero. O táxon *S. bicolor* é grupo irmão de *S. midas*/*S. niger* com altos valores de suporte estatístico, contudo a relação das últimas não é resolvida, pois uma politomia foi observada. O clado dos “bigodudos” é monofilético e é grupo irmão de *S. bicolor*/*S. midas*/*S. niger*. Todos os demais agrupamentos acima foram confirmados por meio do método bayesiano hierárquico.

No que diz respeito aos calitriquíneos da Amazônia (*Mico*, *Callibella* e *Cebuella*), um importante resultado observado é o posicionamento de *Cebuella pygmaea* como linhagem mais basal do clado, com alto suporte estatístico (89% MP, 81% MV e 1.0 IB). O recente gênero descrito, *Callibella* (*C. humilis*), é grupo irmão de *Mico*, aparecendo como grupo irmão de *M. argentata*/*M. emiliae*. Os dados de

divergência nucleotídica também reforçam a maior similaridade entre *Callibela* e *Mico* do que destes com *Cebuella*.

Com relação aos arranjos em *Callithrix*, a árvore filogenética com os dados concatenados mostra *C. jacchus* como grupo irmão de um clado não resolvido formado por *C. penicillata*/*C. kuhlii*/*C. geoffroyi*, porém, sem suporte estatístico, ou seja, uma politomia envolvendo as quatro espécies da Mata Atlântica, isto revelado em todas as análises.

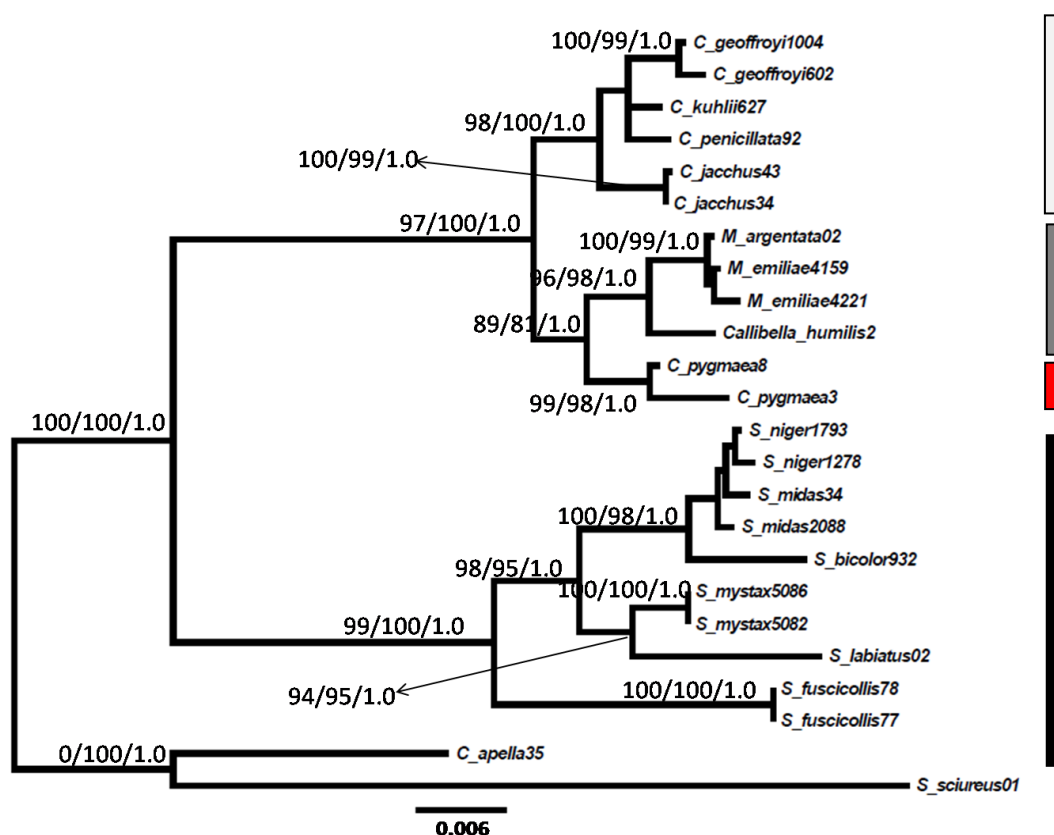


Figura 11: Árvore de máxima verossimilhança gerada a partir de cinco loci de seqüências Alu concatenadas para três gêneros de primatas do Novo Mundo (*Saguinus*, *Callithrix* e *Mico*). Os suportes dos ramos estão dispostos de acordo com os métodos de MP, MV com 1000 pseudoréplicas e IB. A cor cinza claro representa o gênero *Callithrix*, o cinza escuro os *Micos*, vermelho *Cebuella* e preta os *Saguinus*. (Árvore de MV com $-\ln L = -5987.87150$ e MP com 10 árvores igualmente parcimoniosas, 449 passos de comprimento, índice de consistência = 0,871 e índice de retenção = 0,943).

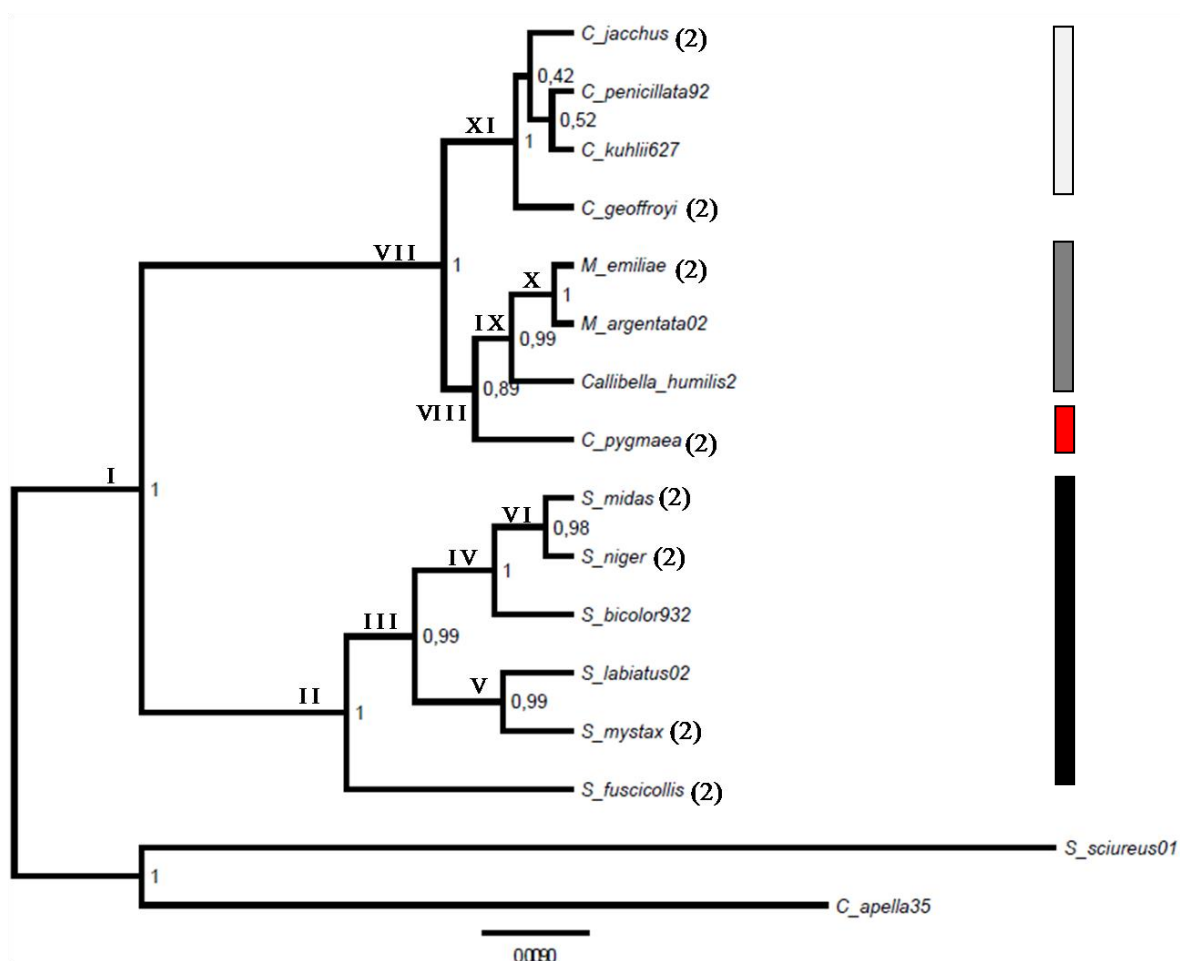


Figura 12: Árvore de espécies (IBH) gerada a partir de seqüências de cinco loci inserções Alu para os três gêneros *Saguinus*, *Callithrix* e *Mico*. Os suportes dos ramos estão dispostos de acordo com o método do modelo Bayesiano hierárquico multi-alelo com 100 milhões de gerações, os valores entre os ramos representam os índices de credibilidade. Os números entre parênteses representam o número de amostras da mesma espécie. Os números romanos acima dos ramos indicam os nós para os quais os tempos de divergência foram estimados (Tabela 7). As cores cinza claro, cinza escuro, vermelho e preta representam os grupos *Callithrix*, *Mico*, *Cebuella* e *Saguinus*, respectivamente.

3.4-Tempo de divergência entre os Callitrichineos

As estimativas do tempo do ancestral comum mais recente (TMRCA) dos principais ramos e os seus intervalos de credibilidade (IC) estão dispostos na Tabela 7 e também são mostrados na Figura 12. O TMRCA dos calitriquíneos indica que a diferenciação teve início no Mioceno há quase 15,8 milhões de anos atrás. *Saguinus* surge como o mais basal do grupo, sendo que as principais diversificações dentro deste

gênero ocorreram no Mioceno tardio há 8,6 e 5,7 milhões de anos. No que diz respeito a *Mico* e *Callithrix*, as diversificações tiveram início no final do Mioceno há seis milhões de anos.

Tabela 7: Estimativa do tempo de divergência dos nós obtidos da reconstrução filogenética dos gêneros *Saguinus*, *Mico* e *Callithrix*.

Nós	TMRCa (Ma)	Intervalo de credibilidade
I	15,9	15,81-22
II	8,6	6,18-11,4
III	5,7	3,90-8
IV	2,6	1,44-4,20
V	3,7	2,02-5,64
VI	1,2	0,51-2,16
VII	6	4,94-7,6
VIII	4,22	2,85-5,7
IX	2,32	1,29-3,56
X	0,67	0,24-1,31
XI	3	1,52-4,78

4 DISCUSSÃO

4.1-Relações Filogenéticas

Estudos filogenéticos dos Primatas do Novo Mundo baseados em dados moleculares sugerem uma origem comum para todos os Platyrrhinos e apoiam a monofilia da subfamília Callitrichinae. Estes estudos têm mostrado significativos níveis de apoio a vários relacionamentos entre os gêneros, mas muitas das relações intra-genéricas continuam não resolvidas.

4.1.1 - *Saguinus*

No presente trabalho avaliou-se 12 espécies destes pequenos primatas, com uma base de dados com cerca de 3000 pares de bases por indivíduo, de cinco loci de inserções Alu.

A reconstrução filogenética a partir destes marcadores mostra que o gênero *Saguinus* é dividido em três grupos, tendo *Saguinus fuscicollis* como táxon mais basal do gênero, arranjo apoiado por altos valores de *bootstrap*. Este arranjo confirma achados anteriores com marcadores moleculares e morfométricos (Tagliaro *et al.*, 2005, Jacobs *et al.*, 1995, Croop *et al.*, 1999 e Araripe *et al.*, 2008).

O grupo dos *Saguinus* de corpo grande reúne várias espécies cujas relações filogenéticas são controversas. Alguns estudos apontam *S. imperator* mais próximo de *S. leucopus* e estes seriam clado irmão do grupo “*fuscicollis*”, enquanto que os demais membros deste grupo (*S. labiatus* e *S. mystax*) seriam grupo irmão de *S. inustus* (Natori e Hanihara, 1992; Jacobs *et al.*, 1995). Para os dados da região controle do mtDNA obtidos por Cropp *et al.* (1999) observou-se *S. imperator* e *S. labiatus* como táxons irmãos e estes agrupando com o clado formado por *S. geoffroyi*, *S. oedipus* e *S. midas*.

Todas estas propostas apóiam o caráter parafilético do clado dos “bigodudos” e rejeita a monofilia deste clado sugerida inicialmente por Hershkovitz (1977), contudo nenhum desses trabalhos apresenta bons suportes estatísticos.

O estudo recente de Araripe *et al.* (2008) propõem que *S. labiatus* e *S. mystax* são grupos irmãos e posicionam este clado como grupo irmão de *S. imperator*. No presente estudo foram obtidas topologias muito semelhantes às de Araripe *et al.* (2008), mostrando *S. labiatus* como táxon irmão de *S. mystax*, com alto suporte estatístico, e este clado agrupando com o ramo *S. bicolor*/*S. midas*/*S. niger*. A matriz de distância corrobora tal arranjo, assim como a árvore de espécie com altos índices de credibilidade. Desta forma, apesar da ausência de *S. imperator*, nossos resultados apoiam a monofilia do clado dos “bigodudos”.

Nossas análises filogenéticas suportam fortemente o clado formado por *S. bicolor* e *S. midas*/*S. niger* (*bootstrap* 100% MP, 98% MV e 1.0 IB) corroborando outros estudos com dados moleculares e morfológicos (Natori e Hanihara, 1992, Rylands *et al.*, 1993. Jacobs *et al.*, 1995, Meireles *et al.*, 1997, Cropp *et al.*, 1999, Tagliaro *et al.*, 2005 e Araripe *et al.*, 2008). A proposta clássica de Hershkovitz (1977) considerando caracteres morfológicos e distribuição geográfica era de que o traço “face-cabeluda” (*S. midas*) seria o mais primitivo e “face-nua” (*S. bicolor*) o mais derivado. As filogenias recentes, entretanto, não corroboram esta divisão das espécies de *Saguinus* com base na presença ou ausência de pêlos na face.

Com relação ao grupo de espécies da porção mais oriental da Amazônia, nossas análises mostram estreita similaridade entre *S. midas* e *S. niger* e destas com *S. bicolor*, o grupo como um todo sendo apoiado por altos valores de suporte estatístico. Contudo, o relacionamento entre as três espécies não pode ser esclarecido, sendo observada uma politomia.

O grupo *bicolor/midas/niger* tem sido muito estudado por abordagens moleculares, mas o conjunto de dados acumulados até o momento parece ainda insuficiente para resolver as relações de parentesco deste pequeno grupo de espécies. Canavez *et al.* (1999), com base em dados moleculares nucleares, sugeriram que *S. midas* era mais próximo de *S. bicolor* do que esta última de *S. niger*, uma hipótese com apoio da biogeografia (*S. bicolor/S. midas* ao norte e *S. niger* ao sul do Rio Amazonas), mas discrepante na morfologia já que a maior similaridade entre *S. midas* e *S. niger* é altamente evidente. O estudo de Vallinoto *et al.* (2006) com sequências da região controle mitocondrial colocou *S. bicolor* como a espécie mais basal e demonstrou que a população de *S. niger* da margem direita do Rio Tocantins era mais similar a *S. midas* do norte do Rio Amazonas do que a *S. niger* da margem esquerda do Tocantins (interflúvio Tocantins-Xingu). Já Araripe *et al.* (2008), usando sequências do gene mitocondrial 16S, confirmaram a posição de *S. bicolor* como basal e evidenciam a estreita similaridade entre as populações de *S. midas* e *S. niger*, mas com padrão politômico.

4.1.2 – *Cebuella/Mico/Callibela/Callithrix*

A taxonomia dos calitriquíneos até a virada do milênio considerava *Callithrix* como sendo formado por dois grupos formalmente definidos: o grupo “*jacchus*” com uma distribuição geográfica na Mata Atlântica, e o grupo “*argentata*” distribuído na região Amazônica. Além de *Callithrix*, a literatura já reportava o gênero *Cebuella* para a Amazônia, e recentemente foi descrito um gênero novo, *Callibela* (Van Roosmalen e Van Roosmalen 2003), ambos convivendo simpatricamente com as espécies do grupo “*argentata*”.

É importante enfatizar a problemática taxonômica de *Cebuella*, pois ela remonta há várias décadas. Os primeiros arranjos taxonômicos com base em morfologia (Rosenberger, 1981; Rosenberger e Coimbra-Filho, 1984; Arden, 1998) já propunham que *Cebuella* deveria ser colocado dentro do gênero *Callithrix*. Com o surgimento das primeiras análises moleculares, a estreita similaridade nucleotídica entre *Cebuella* e *Callithrix* foi confirmada (Schneider *et al* 2003 e 2006), e a parafilia (*Cebuella* mais próximo de “*argentata*” do que de “*jacchus*”) ficou evidente (Porter *et al.*, 1997b; Barroso *et al.*, 1997; Tagliaro *et al.*, 1997; Goodman *et al.*, 1998; Chaves *et al.*, 1999), desencadeando assim a necessidade de uma urgente revisão taxonômica para o grupo. Esta revisão foi feita por um grupo de especialistas das diferentes áreas da primatologia, e apresentada por, Rylands *et al.* (2000), sendo os representantes de *Callithrix* da Amazônia elevados ao nível de gênero (*Mico*) e os da mata Atlântica mantidos como *Callithrix*, *Cebuella* manteve seu status de gênero.

Com relação ao gênero novo, *Callibela*, é importante que se diga que ele foi descrito inicialmente como espécie de *Callithrix* do grupo “*argentata*” (*Callithrix humilis*) por Van Roosmalen *et al* (1998), e só posteriormente elevado ao status de gênero (Van Roosmalen e Van Roosmalen 2003). Por meio de sequências de DNA da região controle do DNA mitocondrial, e de dados morfológicos e de comportamento, os autores que o descreveram demonstraram que este era estreitamente relacionado a *Cebuella* e *Mico*.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a estreita similaridade de *Callibela* com *Mico* e *Cebuella*, mas ao contrário de Van Roosmalen e Van Roosmalen (2003) o colocam mais próximo de *Mico* (*M. argentata* e *M. emiliae*). Essa estreita relação é corroborada pela matriz de distância, sendo a média da divergência genética

entre *Callibela* e *Mico* de apenas 1%, menor do que entre *Callibela* e *Cebuella* (1.5%) e entre *Callibela* e *Callithrix* (1.5-2%).

Com base nos achados do presente estudo, apresentamos três cenários taxonômicos possíveis para *Cebuella*, *Callibela* e *Mico*. O primeiro seria o de manter cada um com seu status de gênero; o segundo seria propor *Cebuella* e *Mico* como gêneros e colocar *Callibela* como espécie de *Mico* (*M. humilis*), conforme a descrição inicial de Van Roosmalen *et al* (1998); já o terceiro cenário seria de considerar apenas um gênero para a Amazônia, *Mico*, e colocar *Cebuella* e *Callibela* como espécies de *Mico* (*M. pygmaea* e *M. humilis*). Do ponto de vista de topologia filogenética cada uma das três propostas seria aceitável, mas, com base nas divergências nucleotídicas, o segundo cenário seria o mais coerente para este conjunto de dados nucleares: *Cebuella* mantido como gênero, e *Callibela* como espécie de *Mico* e não como gênero próprio. Isto justifica-se no fato de que as divergências nucleotídicas entre as espécies de *Callithrix* (ver Tabela 6) são todas inferiores a 1%, o mesmo observado entre *Callibela* e espécies de *Mico*, enquanto que a divergência de *Cebuella* com *Callibela* e com *Mico* são maiores do que 1%. Contudo, uma ampla revisão de dados moleculares já publicados, combinada com análises suplementares de morfologia e biogeografia serão necessárias para consolidar (ou refutar) a proposta acima.

Finalmente é necessário chamar a atenção para um achado em relação aos indivíduos de *Cebuella* aqui analisados. Observamos alta divergência nucleotídica entre os dois espécimes (0,6%), maior do que a divergência entre *M. argentata* e *M. emiliae* (0,2%). Esta acentuada divergência em dados nucleares poderia ser um indicativo da existência de subespécies em *Cebuella*, algo já sugerido anteriormente com base em dados de DNA mitocondrial (Tagliaro *et al.*, 1997). É importante ressaltar que *Cebuella* é muito pouco estudado, e que os exemplares usados nas análises moleculares deste e

dos outros estudos prévios foram obtidas de cativeiro (Centro Nacional de Primatas) e suas procedências eram desconhecidas. Portanto, estes dados preliminares apontam *Cebuella pygmaea* como uma espécie a ser criteriosamente investigada no âmbito de sua variabilidade genética populacional e taxonomia.

Em relação às árvores de espécie e dos dados concatenados observam-se algumas pequenas incongruências dentro do clado de *Callithrix*. No entanto, isto se deve ao fato de que as diferentes análises não conseguirem resolver a politomia entre os diferentes táxons. No entanto, os dados concatenados podem acarretar em incongruências das árvores gênicas e de espécie, pois processos como polimorfismo ancestral causarão ruídos na análise e o simples concatenamento terá consequências diretas nestas diferentes histórias evolutivas. Além disto, a análise de banco de dados contendo múltiplos alelos possui mais informação sobre a história evolucionária das espécies do que somente um alelo (Liu *et al.*, 2007; Liu e Pearl 2007). O teste de Farris *et al.* (1994, 1995) (“*incongruence length difference*”-ILD) é utilizado para avaliar a hipótese nula de que caracteres contendo dois ou mais conjuntos de partições são tirados aleatoriamente de uma única população, sendo que neste é considerado que a população de caracteres reflete uma única filogenia e um único processo evolucionário. Nos últimos anos este teste tem sido alvo de fortes críticas para avaliar a combinação de dados, pois as homoplasias contidas em um dado banco de dados terão fortes consequências na árvore final, pois tal topologia irá subestimar os reais ramos decorrentes dos processos cladogenéticos (Yoder *et al.* 2001).

O programa Best utiliza o modelo Bayesiano hierárquico para reconstruir árvores de espécies a partir de dados contendo múltiplos alelos, sendo que o modelo Bayesiano hierárquico multi-alelo é capaz de extrair informações para todos os alelos individualmente das espécies, e fazer inferências a respeito da história ancestral das

mesmas, visto que, o programa estima a árvore de espécie ignorando o fato de que as unidades taxonômicas dentro da árvore gênica são alelos (Liu *et al.*, 2008).

As análises com Alu não conseguiram resolver a politomia dentro do clado de *Callithrix*. Os calitriquíneos da mata Atlântica são todos reconhecidos por Vivo (1991) com base em medidas cranianas e distribuição geográfica, exceto *C. kuhlii*, o qual é considerado mais uma forma de *C. penicillata*. Para Hershkovitz (1975, 1977) com base no padrão de coloração da pelagem afirma que *C. kuhlii* é somente um híbrido entre *C. penicillata* e *C. geoffroyi*, sendo que Rosenberger (1984) também com base na morfologia propõe a classificação em nível de espécie para todos os táxons do gênero.

Os dados citogenéticos mostram que as cinco espécies de *Callithrix* (*C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. kuhlii*, *C. geoffroyi* e *C. aurita*) são extremamente homogêneas nos seus cariótipos (Nagamachi *et al.*, 1997). Meireles *et al.* (1992, 1998), com base em dados de isoenzimas afirmam que *C. geoffroyi* é o mais primitivo do gênero e *C. penicillata* e *C. kuhlii* são formas híbridas. Tagliaro *et al.* (1997), usando sequências de DNA mitocondrial, também não conseguiram resolver esta problemática taxonômica entre *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. kuhlii*. Portanto, *Callithrix* continua sendo um gênero que merece ampla investigação taxonômica com dados moleculares.

4.2-Tempo de divergência e História Biogeográfica

Na última década surgiram várias hipóteses para explicar a alta diversidade de espécies da região Amazônica, sendo que os modelos tradicionalmente têm se concentrado em eventos vicariantes como as mudanças causadas por instabilidade climática no Plioceno-Pleistoceno (teoria dos refúgios, a hipótese vicariância-distúrbio) ou ainda de que os rios serviram de barreiras para diferentes táxons (hipótese dos rios) (Haffer 1997). No entanto, recentemente outros modelos têm dado

ênfase nos grandes eventos paleogeográficos como formação dos Andes, fechamento do Istmo do Panamá, mudanças no nível do mar e formação dos sistemas de rios (Moritz *et al.*, 2000; Nores 2004; Wesselingh e Salo 2006; Rull 2008; Vallinoto *et al.*, 2009).

Segundo Hershkovitz (1977) *Saguinus* originou-se no sul da Amazônia e posteriormente dispersou para o norte e oeste desta região. No entanto, Ferrari (1993), de acordo com a hipótese do nanismo filético (Leutenegger, 1979), sustenta que os saguis originaram-se ao norte da bacia Amazônica e dispersaram-se em seguida para oeste. Outros estudos propõem que os sagüis dispersaram dentro de duas grandes ondas de migração: uma na direção oeste, a mais importante das distribuições dos *Saguinus* de corpo-pequeno, e outra para o noroeste seguindo na direção oeste resultando na distribuição de *S. bicolor* e *S. midas* (Cropp *et al.*, 1999). Contudo, tal hipótese carece de sustentação, pois os resultados deste estudo não mostram separações estatisticamente significativas destes dois grupos. Além disso, este estudo, com base na idade do fóssil de *Lagonimico* (Kay 1994) sustenta que *Saguinus* surgiu há aproximadamente 13,5 milhões de anos. No presente estudo, usando programas baseados em coalescência, os valores obtidos sugerem um tempo de (15,8 milhões de anos atrás) similar ao obtido por estes autores, assim como por outros trabalhos (Schneider 2000; Opazo *et al.*, 2006).

As análises filogenéticas combinadas com os dados de divergência aqui produzidas sugerem que a separação entre o clado dos *Saguinus* de corpo pequeno e corpo grande ocorreu há 8,6 milhões de anos no Mioceno tardio, sendo que num período posterior ocorre a separação entre os pequenos primatas da Amazônia e o clado dos calitriquíneos da mata Atlântica (6 milhões de anos atrás).

Vale ressaltar que a diversificação dos *Micos* amazônicos parece ser anterior aos *Callithrix* da mata Atlântica. O que explica a maior diversificação de gêneros na primeira em relação à segunda. A diversificação dos calitriquíneos da mata Atlântica

tem início no Holoceno e devido à baixa resolução na filogenia, assim como a alta similaridade entre os mesmos em termos de divergência, os tempos de separação são completamente sobrepostos. Isto deve indicar um padrão de irradiação rápida entre os membros deste grupo que pode ter culminado com a expansão do cerrado no Holoceno/Pleistoceno após um período de isolamento deste bioma próximo a floresta Amazônica (Pessenda *et al.*, 2001). Mas é bom ressaltar que nossa análise não contemplou a espécie mais basal do gênero, *C. aurita*, o que sugere cautela em conclusões definitivas.

O tempo estimado para a maioria das diversificações dos diferentes gêneros coincide com a proposta de formação do sistema de bacias hidrográficas da América do Sul, inundando grande parte da região durante o período que vai da metade até o final do Mioceno, o qual tem fortes implicações na diversidade de vários grupos de vertebrados (Symula *et al.*, 2003; Noonan e Wray 2006; Santos *et al.*, 2009; Vallinoto *et al.*, 2009). Contudo, as relações dos dados com estas hipóteses devem ser tratadas com cautela, visto que a presente amostragem é bastante limitada em termos biogeográficos para fazer correlações tão complexas, pois muitas espécies crípticas vêm sendo descritas ou ainda identificadas nos mais diversos táxons analisados (Fouquet *et al.*, 2007, Maurício *et al.*, 2008; Vallinoto *et al.*, 2009), inclusive dentro do gênero *Saguinus* (Vallinoto *et al.* 2006).

Da mesma forma, os presentes dados mostram que o tempo de separação, assim como as próprias divergências dentro do gênero *Saguinus* (variando 0,3 a 4,1%), são muito maiores que as divergências entre os quatro diferentes gêneros analisados em conjunto, isto é, *Callibela*, *Mico*, *Cebuella* e *Callithrix* (variando de 0,2 a 2,5%). Ou seja, uma nova revisão taxonômica dentro de *Saguinus* é necessária para a descrição ou não de novos gêneros.

CONCLUSÕES

Os resultados mais importantes obtidos através das sequências de injeções *Alu* para os três gêneros da subfamília Callitrichinae foram:

1. Há uma clara separação entre os calitriquíneos distribuídos na região Amazônica (*Mico*, *Callibela* e *Cebuella*) e da Mata Atlântica (*Callithrix*) com uma diversificação mais antiga nos táxons da Amazônia;
2. O gênero *Saguinus* é o grupo mais antigo com suas principais especiações ocorridas no Mioceno tardio, além de que, existe uma alta divergência genética dentro desse gênero, maior que a observada entre diferentes gêneros (*Mico* e *Callithrix* 2%, *Cebuella* e *Callithrix* 1,8%, *Cebuella* e *Mico* 1,4%);
3. A reconstrução filogenética e os dados de divergência nucleotídica sugerem que *Cebuella* deve ser mantido em seu status de gênero e que *Callibela* deve ser alocado como uma espécie de *Mico* e não como gênero separado;
4. Os dados concatenados analisados segundo a ótica clássica e a metodologia de coalescência mostraram algumas incongruências. Contudo, em ambas as análises não foi possível resolver a politomia existente dentro do gênero *Callithrix*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott DH, and Hearn JP (1978) Physical, hormonal & behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil 53:155-166.
- Arden DD (1998) 1997 North American Regional Studbook of the Pygmy Marmoset (*Callithrix pygmaea*). Denver Zoological Gardens, Denver. 45pp.
- Araripe J, Tagliaro CH, Rêgo PS, Sampaio I, Ferrari SF & Schneider H (2008) Molecular phylogenetics of large-bodied tamarins, *Saguinus* spp (Primates, Platyrrhini). J Zoologi. Script 37(5): 461-467.
- Barroso CML, Schneider H, Schneider MPC, Sampaio I, Harada ML, Czelusniak J & Goodman M (1997) Update on the Phylogenetic Systematics of New World Monkeys: further evidence for placing the pygmy marmoset (*Cebuella*) within the genus *Callithrix*. Int J Primatol 18: 645-668.
- Batzler MA & Deininger PL (2002) *Alu* repeats and human genomic diversity. Nat Rev Genet 3: 370–379.
- Canavez FC, Moreira MAM, Ladoski JL, Pissinatti A, Parham P & Seuanez HN (1999a) Molecular Phylogenetics of New World Primates (Platyrrhine) based on $\beta 2$ -microglobulin DNA sequences. Mol Phylogenet Evol 12:74-82.
- Canavez FC, Moreira MAM, Simon F, Parham P & Seuanez HN (1999b) Phylogenetic relationships of the Callitrichinae (Platyrrhini, Primates) based on $\beta 2$ -microglobulin DNA sequences. Am J primatol 48:225-236.
- Capy P (1998) Dynamics and evolution of transposable elements. 1st France Landes Bioscience 197p.
- Caterino MS, Reed RD, Kuo MM & Sperling AH (2001) A partitioned likelihood analysis of swallowtail butterfly phylogeny (Lepidoptera: Papilionidae). Syst Biol 50:106-127.
- Chaves R, Sampaio I, Schneider MPC, Schneider H, Page SL & Goodman M (1999) The place of *Callimico goeldii* in the Callitrichine Phylogenetic tree: evidence from von Willebrand factor gene intron 2 sequences. Mol Phylogenet Evol 13: 392-404.
- Coimbra-Filho AF, Pissinatti A & Rylands AB (1993b) Experimental multiple hybridism among *Callithrix* species from eastern Brazil. In: Marmosets and

- tamarins: Systematics, Ecology, and Behaviour, Rylands AB, (ed.), pp.95-120. Oxford University Press, Oxford.
- Cook JM & Tristem M (1997) “sines of the times”- transposable elements as clade markers for their hosts Tree 12: 295-297.
- Cropp SJ, Larson A & Cheverud JM (1999) Historical biogeography of Tamarins, genus *Saguinus*: the molecular phylogenetic evidence. Am J Phys Anthropol 108: 65-89.
- Digby LJ & Ferrari SF (1994) Multiple breeding females in free-ranging groups of *Callithrix jacchus*. Int J Primatol 15:389–397.
- Drummond, A J, Ho, SYW, Phillips, M J & Rambaut, A (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol*, 4- e88.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology.7: 214.
- Epple G & Katze Y (1980) Social influences on first reproductive success and related behaviors in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*, Callitrichidae). Int J Primatol 1:171–183.
- Eisenberg JF & Redford KH (1999) Mammals of the neotropics: the central neotropics. Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil vol 3 University of Chicago Press Chicago.
- Farris JD, Källersjö M, Kluge AG & Bult C (1994) Testing significance of incongruence. Cladistics 10: 315–319.
- Farris JD, Källersjö M, Kluge AG & Bult C (1995) Constructing a significance test for incongruence. Syst Biol 44: 570–572.
- Felsenstein J (1981) Confidence limits on phylogeny: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
- Ferrari SF & Lopes Ferrari MA (1989) A re-evaluation of the social organization of the Callitrichidae, with references to the ecological differences between genera. Folia primatol 52:132-147.
- Ferrari SF (1993) Ecological differentiation in the callitrichidae In Rylands AB (ed) Marmosets and tamarins: systematics, ecology and behaviour. Oxford University Press Oxford Pp 314-328.
- Ferrari SF, Iwanaga S, Ramos EM, Messias MR, Ramos PCS & Cruz Neto EH (1999) Expansion of the known distribution of goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) in southwestern Brazilian Amazonia Folia primatol 70:112-116.

- Ford SM (1986) Systematics of the New World Monkeys In Comparative primate biology, volume I: systematics, evolution and anatomy (Dr Swindler e J Erwin Eds) Pp 73-135 Alan R Liss New York.
- Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C & Blanc M (2007a) Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. PLoS ONE. 2: 1–10.
- Ginther AJ, Carlson AA, Ziegler TE & Snowdon CT (2002) Neonatal and pubertal development in males of a cooperatively breeding primate, the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus oedipus*) Biol Reprod 66:282–290.
- Goodman M, Porter CA, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J, Gunnell G & Grves C (1998) Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. Mol Phy Evol 9:585-598.
- Guindon S & Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large Phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52(5):696-704.
- Haffer J (1997). Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia. Biodiversity and Conservation. 6: 451–476.
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- Hamdi H, Nishio H, Zielinski R, Dugaiczuk A (1999) Origin and phylogenetic distribution of Alu DNA repeats: irreversible events in the evolution of primates. J Mol Biol 289: 861 871.
- Heymann EW (1996) Social behavior of wild moustached tamarins, *Saguinus mystax*, at the estación biológica quebrada blanca, peruvian Amazonia. Am J Primatol 38:101–113.
- Hershkovitz P (1975) Comments on the taxonomy of Brazilian marmosets (*Callithrix*, Callitrichidae). Fol Primatol 24: 137-172.
- Hershkovitz P (1977) Living New World Monkeys, part 1 (Platyrrhini). Chicago: Chicago University Press 1117pp.
- Hillis DM (1999) SINES of the perfect character. Proc Natl Acad Sci Usa 96: 9979-9981.
- Holland BS & Hadfield (2004) Origin and diversification of the endemic Hawaiian tree snails (Achatinellinae: Achatinellidae) based on molecular evidence. . Mol Phylogenet Evol 32: 588-600.

- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. Oxford Univ Press. 17(8): 754-755
- Jacobs SC, Larson A & Cheverud JM (1995) Phylogenetic relationships and orthogenetic evolution of coat color among tamarins (genus *Saguinus*). *Syst Biol* 44:515-532.
- Kay RF (1990) The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthropoidea). *J Human Evol* 19: 175-208.
- Kazazian HHJ (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626-1632.
- Lagemaat LN, Gagnier L, Medstrand P & Mager DL (2005) Genomic deletions and precise removal of transposable elements mediated by short identical DNA segments in primates. *Genome Research* 15: 1243–1249.
- Leutenegger W (1979) Evolution of litter size in primates. *Am Nat* 114:525–531.
- Li W-H, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A (2001) Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 409: 847–849.
- Liu L, Pearl DK, Brumfield RT & Edwards SV (2007) Estimating species trees using multiple-allele dna sequence data. *Evolution* 62-8: 2080-2091.
- Liu L (2008) Best: Bayesian estimation of species trees under the coalescent model. *Bioinformatics Applications Note*. 24: 2542-2543.
- Liu L & Pearl DK (2007) Species trees from gene trees: reconstructing Bayesian posterior distributions of a species phylogeny using estimated gene tree distributions. *Syst Biol* 56: 504–514.
- Lorini VG & Persson ML (1990) Uma nova espécie de *Leontopithecus lesson*, 1840, do sul do Brasil (Primates, Callitrichidae). *Bol Mus Nac Rio janeiro zool* 338:1-14.
- Maurício GN, Mata H, Bornschein MR, Cadena CD, Alvarenga H & Bonatto SL (2008) Hidden generic diversity in Neotropical birds: molecular and anatomical data support a new genus for the ‘*Scytalopus*’ indigoticus species-group (Aves: Rhinocryptidae). *Mol Phylog Evol*. 49: 125–135.
- Meireles CMM, Sampaio NIC, Schneider H & Schneider MPC (1992). Protein variation, taxonomy and differentiation in five species of marmosets (genus *Callithrix* Erxleben, 1777). *Primates* 33(2): 227-238.

- Meireles CMM, Sampaio I, Schneider H, Ferrari SF, Coimbra-Filho AF, Pissinatti A & Schneider MPC (1997). A comparative study of eleven protein systems in tamarins, genus *Saguinus* (Platyrrhini, Callitrichinae). *Brazil J Genet* 20(1): 13-19.
- Meireles CMM, Czesluniak J, Sampaio I, Schneider H, Ferrari SF, Coimbra-Filho AF, Pissinatti A, Muniz JAPC, Ferreira HS & Schneider MPC (1998) Electrophoretic polymorphisms and their taxonomic implications in Callitrichini (Platyrrhini, Callitrichinae). *Biochem Genet* 36(7-8): 229-244.
- Meireles CMM, Czesluniak J, Schneider MPC, Muniz JAPC, Brigido MC, Ferreira HS & Goodman M (1999) Molecular Phylogeny of Ateline New World Monkeys (Platyrrhini, Atelinae) based on (γ -globin gene sequences: evidence that *Brachyteles* is the sister group of *Lagothrix*. *Mol Phylogenet Evol* 12: 10-30.
- Meyer D (1995) Árvores evolutivas humanas: uma discussão sobre a inferência filogenética. In *Série Monografias 3 Sociedade brasileira de genética* Ribeirão Preto 1-162.
- Mittermeier RA, Gil CG, Mittermeier CG & Myers N (2000) Hotspots earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. *Cemex Conservation International* 430p.
- Miyamoto MM (1999) Molecular systematics: perfect SINES of evolutionary History?. *Curr Biol* 9: 816-819.
- Moritz C, Patton J L, Schneider CJ & Smith TB (2000). Diversification of rainforest faunas: an Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 31: 533–563.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Schwarz M, Barros RMS & Mattevi MS (1997) Comparative chromosomal study of five of genus *Callithrix*, group *jacchus* (Platyrrhini, Primates). *Am J Primatol* 41(1): 53-60.
- Natori M, Hanihara T (1992) Variations in dental measurements between *Saguinus* species and their systematic relationships. *Folia Primatol* 58: 84-92.
- Noonan BP & Wray KP (2006) Neotropical diversification: the effects of a complex history on diversity within the poison frog genus *Dendrobates*. *Journal of Biogeography*. 33: 1007–1020.
- Nores M (2004) The implications of tertiary and quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography*. 13: 49–161.

- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. 2. Program distributed by the author.
Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Opazo JC, Wildman DE, Prychitko T, Johnson RM & Goodman M (2006).
Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys
(Platyrrhini, primates). *Mol Biol Evol* 40: 274-280.
- Ogiwara I, Miya M, Ohshima k & Okada N (1999) Retropositional parasitism of SINES
on lines: identification of SINES and LINES in elasmobranchs. *Mol Biol Evol*
16: 1238-1250.
- Okada N, Hamada M, Ogiwara I & Ohshima K (1997) SINES and LINES share
common 30 sequences: A review. *Gene* 205: 229-243.
- Pastorini J, Forstner MRJ, Martin RD & Melnick DJ (1998) A Reexamination of the
Phylogenetic Position of *Callimico* (Primates) incorporating new mitochondrial
DNA sequence data. *J Mol Evol* 47:32-41.
- Pessenda LCR, Boulet R, Aravena R, Rosolen V, Gouveia SEM, Ribeiro AS, Lamotte
M (2001) Origin and dynamics of soil organic matter and vegetation changes
during the Holocene in a Forest-savanna transition zone. *Brazilian Amazon*
region 11(2): 250-254.
- Porter LM (2001a) Social organization, reproduction and rearing strategies of *Callimico*
goeldii: new clues from the wild. *Folia Primatol* 72:69-79.
- Porter CA, Czelusniak J, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I & Goodman M (1999)
Sequences from the 5' flanking region of the epsilon-globin gene support the
relationship of *Callicebus* with the Pitheciins. *Am J Primatol* 48:69-75.
- Porter CA, Page SL, Czesluniak J, Schneider H, Schneider MPC, Sampaio I &
Goodman M (1997a) Phylogeny and Evolution of Selected Primates as
Determined by Sequences of the epsilon-globin locus and 5' flanking regions.
Int J Primatol 18: 261-295.
- Porter CA, Czelusniak J, Schneider H, Schneider MPC, Sampaio I & Goodman M
(1997b) Sequences of the Primate epsilon-globin gene: implications for
systematics of the marmosets and other New World Primates. *Gene* 205: 59-71.
- Posada D & Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution.
Bioinformatics 14: 817-818.
- Posada D (2008) jModelTest v0.1.1: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol*. In
press.
- Rambaut A & Drummond AJ (2007) Tracer v1. 4. Available from left angle bracket

<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> right-pointing angle bracket.

Rambaut A (2008) FigTree v1. 1.2 [cited 2009 Feb 9]. 2008.

Ray DA, Xing J, Hedges DJ, Hall MA, Laborde ME, Anders BA, White BR, Stoilova N, Fowlkes FD, Landry KE, Chemnick LG, Ryder OA & Batzer MA (2005) *Alu* insertion loci and Platyrrhine Primate Phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 35: 117-126.

Reed RD & Sperling FAH (1999) Interaction of process partitions in phylogenetic analysis: An example from the swallowtail butterfly genus *Papilio*. *Mol Phylogenet Evol* 16:286-297.

Ronquist F & Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics. Oxford Univ Press.* 19(12): 1572-1574.

Roy-Engel AM, Carroll ML, El-Sawy M, Salem AH, Garber RK, Nguyen SV, Deininger, PL & Batzer MA (2002) Non-traditional *Alu* evolution and primate genomic diversity. *J Mol Biol* 316, 1033–1040.

Rosenberger AL & Coimbra-Filho AF (1984) Morphology, taxonomic status and affinities of the lion tamarins, *Leontopithecus* (Callitrichinae, Cebidae). *Folia Primatol* 42:149-179.

Rubinoff D & Sperling FAH (2002) Evolution of ecological traits and wing morphology in *Hemileuca* (Saturniidae) based on a two-gene phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 25: 70-86.

Rull V (2008) Speciation timing and neotropical biodiversity: the tertiary-quaternary debate in the light of molecular evidence. *Molecular Ecology.* 17: 2722–2729.

Rylands AB, Schneider H, Langguth A, Mittermeier RA, Groves PE, Rodriguez-Lima E (2000) An assessment of the diversity of New World Primates. *Neotrop Primates* 8 (2): 61-93.

Rylands AB & DE Faria DS (1993) Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix* In Rylands AB (ed) marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology. Oxford University Press Oxford Pp 262-272.

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Santos JC, Coloma LA, Summers K, Caldwell JP, Ree R & Cannatella DC (2009). Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene Andean lineages. *PLoS Biology*, 7(3), e1000056. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000056.
- Sanger F, Nichlen S & Coulson AR (1987) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5468.
- Salem AH, Ray DA, Xing J, Callinan PA, Myers JS, Hedges DJ, Garber RK, Witherspoon, DJ, Jorde LB, Batzer MA (2003) Alu elements and hominid phylogenetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 100 (22):12787-12791
- Sena LS (1998) Filogenia do gênero *Callithrix* Erxleben 1777 (Callitrichinae, Platyrrhini) baseada em sequências do gene mitocondrial da citocromo oxidase II (COII). Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Pará 14pp.
- Sena LS, Vallinoto M, Sampaio I, Schneider H, Ferrari SF & Schneider MPC (2002) Mitochondrial COII gene sequences provide new insights into the phylogeny of marmoset species groups (Callitrichidae, Primates) *Folia primatol* 73: 240-251.
- Simons EL (1972) Primate evolution: an introduction to man's place in nature. Macmillan, New York.
- Soini P (1993) The ecology of the pygmy marmoset, *Cebuella pygmaea*: some comparisons with two sympatric tamarins In Rylands AB (ed) marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology. Oxford University Press Oxford Pp 257–261.
- Schmitz J, Ohme M & Zischler H (2001) SINE Insertions in Cladistic Analyses and the Phylogenetic Affiliations of *Tarsius bancanus* to Other Primates. *Primate Genetics* 157: 777–784
- Schmid CW & Jelinek WR (1982) The Alu family of dispersed repetitive sequences. *Science* 216: 1065-1070.
- Schneider H, Sampaio I, Harada ML, Barroso CML, Schneider MPC, Czelusniak JE, Goodman M (1996) Molecular phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates) based on two unlinked nuclear genes: IRBP intron 1 and ϵ -globulin sequences. *Am J Phys Anthropol* 100: 153-179.
- Schneider H, Schneider MPC, Sampaio MIC, Harada ML, Stanhope M & Goodman M (1993) Molecular phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates). *Mol Phylogenet Evol* 2: 225-242.
- Schneider H (2000) The current status of the New World Monkey Phylogeny *Nat Acad Bras Ci* 72 (2): 165-170.

- Shedlock AM, Okada N (2000) SINE insertions: powerful tools for molecular systematic. *Bioessays* 22: 148-160.
- Shimamura M, Yasue H, Ohshima K, Abe H, Kato H, Kishiro T, Goto M, Munechika I, Okada N (1997) Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates. *Nature* 388: 666-670.
- Snowdon CT & Soini P (1988) The tamarins, genus *Saguinus* In Mittermeier RA, Rylands AB, Coimbra-Filho AF & DA Fonseca GAB (eds) *Ecology and behavior of neotropical primates vol 2* World Wildlife Fund Washington DC Pp 223–298.
- Spix JDE (1823) *Semiarum et Vespertilionum Brasiliensium species novae ou Histoire Naturelle des Especies Nouvelles de Singes et de Chauves-souris observees et recueillies pendant le voyage dans l'interieur du bresil*. Typis Francisci Seraphici Hubschmanni, Monachii.
- Symula R, Schulte R & Summers K (2003) Molecular systematic and phylogeography of the Amazonian poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Mol Phylog Evol.* 26: 452–475.
- Stevenson MF & Rylands AB (1988) The marmosets, genus *Callithrix* In Mittermeier A, Rylands AB, Coimbra-Filho AF & DA Fonseca GAB (eds) *ecology and behavior of Neotropical Primates vol 2* World Wildlife Fund Washington DC Pp 131-222.
- Swofford, DL (2002) *Paup* beta version 4b10 Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)* Sinauer Associates Inc Publisher Sunderland Ma.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol biol evol.* 24: 1596.
- Tagliaro CH, Schneider H, Sampaio I, Schneider MPC, Vallinoto M & Stanhope M (2005) Molecular Phylogeny of the genus *Saguinus* (Platyrrhini, Primates) based on the ND1 mitochondrial gene and implications for conservation. *Genet Mol Biol* 28: 46-53.
- Tagliaro CH, Schneider MPC, Schneider H, Sampaio I & Stanhope M (1997) Marmoset Phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region. *Mol Biol Evol* 14:674-684.
- Takahashi K, Nishida M, Yuma M, Okada N (2001) Retroposition of the AFC family of SINES (Short Interspersed Repetitive Elements) before and during the adaptive

- radiation of cichlid fishes in lake malawi and related inferences about phylogeny. *J Mol Evol* 53: 496-507.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Ac Research* 24: 4876-4882.
- Vallinoto M, Sena LS, Sampaio I, Schneider H & Schneider MPC (2000) Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of *Saguinus* (Callitrichinae, Primates): transfer estimation. *Genet Mol Biol* 23: 35-42.
- Vallinoto M, Araripe J, Rego PS, Tagliaro CH, Sampaio I & Schneider H (2006). Tocantins river as an effective barrier to gene flow in *Saguinus niger* populations. *Genet Mol Biol* 29: 215-219.
- Vallinoto M, Sequeira F, Sodr  D, Bernardi JAR, Sampaio I & Schneider H (2009) Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. *Zoolog Scrip.* 39: 128-140.
- Van Roosmalen MGM & Van Roosmalen T (1997) An eastern extension of the geographical range of the pygmy marmoset, *Cebuella pygmaea*. *Neotrop Primates* 5:3-6.
- Van Roosmalen MGM, Van Roosmalen T, Mittermeier RA & Rylands AB (1998). A new and distinctive species of marmoset (Callitrichidae, Primates) from the lower Rio Aripuan , State of Amazonas, Central Brazilian Amazonia. *Goeldiana zool* 22:1-27.
- Van Roosmalen MGM & Van Roosmalen T (2003) The description of a new marmoset genus, *Callibela* (Callitrichinae, Primates), including its molecular phylogentic status. *Neotrop Primates* 11:1-10.
- Vivo M (1991) Taxonomia de *Callithrix* Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates). Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Waddell PJ, Kishino H, Ota R (2001) A phylogenetic foundation for comparative mamalian genomics Genome Inform Ser Workshop Genome Inform 12: 141-154.
- Wesselingh FP & Salo JA (2006) A Miocene perspective on the evolution of the Amazon basin. *Scripta Geologica.* 133: 439–458.
- Xia X & Xie Z (2001) Dambe: data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92: 371-373.

Yoder AD, Irwin JA & Payseur BA (2001) Failure of the ILD to determine data combinability for slow loris phylogeny. *Syst Biol* 50: 408–424.

ANEXOS

Modelos Evolucionários:

Modelos calculados para F3F, SF7, SAG39F, SAG132F, SAG29F e Concatenados, respectivamente e posteriormente foram submetidos aos cálculos de distância genética e análises filogenéticas. Para as análises dos bancos F3F, SF7, SAG39F, SAG132F e SAG29F foram escolhidos os seguintes modelos TPM3uf Base=(0.3082 0.1999 0.2607 0.2312) nst=6 rmat=(1.8189 6.8260 1.0000 1.8189 6.8260 1.0000) rates=equal pinvar=0; TrNef+G Base=equal nst=6 rmat=(1.0000 5.8830 1.0000 1.0000 1.8549 1.0000) rates=gamma shape=0.0940 ncat=4 pinvar=0; TPM2+G Base=equal nst=6 rmat=(5.2366 27.2312 5.2366 1.0000 27.2312 1.0000) rates=gamma shape=0.1240 ncat=4 pinvar=0; HKY+G Base=(0.3405 0.1904 0.2482 0.2209) nst=2 tratio=1.7011 rates=gamma shape=0.1610 ncat=4 pinvar=0 e TPM1uf Base=(0.3381 0.2160 0.2223 0.2236) nst=6 rmat=(1.0000 1.2342 0.0789 0.0789 1.2342 1.0000) rates=equal pinvar=0 respectivamente. Para as análises do banco de dados concatenados total foi escolhido o modelo evolucionário HKI + G com as seguintes características Base=(0.3258 0.2001 0.2424 0.2317) nst=2 tratio=2.1681 rates=gamma shape=0.2540 ncat=4 pinvar=0.

