



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA

O RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO ENTRE *Mico*, *Cebuella* E *Callithrix*
AVALIADO POR MEIO DE DADOS MOLECULARES

PRISCILA FIGUEIREDO SANTOS

Santarém/Pará, 2016

PRISCILA FIGUEIREDO SANTOS

**O RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO ENTRE *Mico*, *Cebuella* E *Callithrix*
AVALIADO POR MEIO DE DADOS MOLECULARES**

MARIA IRACILDA DA CUNHA SAMPAIO

Orientadora

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Conservação e Manejo da Biodiversidade na Amazônia.

Santarém/Pará, 2016

PRISCILA FIGUEIREDO SANTOS

**O RELACIONAMENTO FILOGENÉTICO ENTRE *Mico*, *Cebuella* E *Callithrix*
AVALIADO POR MEIO DE DADOS MOLECULARES**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio
Orientadora

Prof. Dr. Horácio Schneider
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Gabriel Iketani Coelho
Universidade Federal do Oeste do Pará

Prof. Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Universidade Federal do Oeste do Pará

Santarém/Pará, 2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste do Pará por disponibilizar o Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Agradeço o Laboratório de Biologia Molecular do campus de Bragança (UFPA) pela infraestrutura para realização do trabalho.

Agradeço a professora Dra. Izeni da UFAM pelas amostras cedidas (projeto SISBIOTA) e ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, que também cedeu amostras (Dr. Alcides Pissinatti).

Agradeço infinitamente a minha orientadora Iracilda Sampaio por todo o apoio desde os primórdios até atualmente, não sei se teria chegado até aqui sem o apoio dela. Cada dia com ela é um aprendizado que carrego comigo.

Agradeço ao professor Horácio Schneider, que um uma pessoa incrível que tive o prazer de conhecer e que considero da família.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia.

Agradeço a minha família por todo o apoio e compreensão, meu pai Flávio Santos e minha mãe Ana Figueiredo. A minha avó que tanto amo, Iracema, e minha tia Livramento Rodrigues que fala quase todos os dias comigo, o meu Muito Obrigada.

Ao meu namorado Pedro Henrique, obrigada por entender minhas ausências, e estar sempre ao meu lado.

Não poderia esquecer dela, minha querida amiga Adrienne Freitas, que tive o prazer de conhecer, e que passou a fazer parte da família. Obrigada!!

Aos pais da minha amiga Yasmin Coimbra que me ajudaram bastante em Santarém, Rosana Lobato e Paulo Escher. Só tenho a agradecer a toda família, pois foram super

gentis comigo, sou muito grata por tudo. Não posso esquecer da Nildinha, que era uma “mãe” pra mim.

Aos amigos que estão sempre presentes, Barbara Branches, Julya Mesquita, Adriana Alves, Fernanda Gomes, Luciana Watanabe, Fátima Gomes, Lídia Nogueira e Mariana Mazza.

Agradeço também ao grande amigo Jeferson Carneiro, que foi um cara que ajudou muito com este trabalho. Reconheço que seu papel foi essencial. Muito obrigada!

Ao Ronylson, que sempre quando as coisas não estavam dando certo ele me ajudava. Eu super agradeço.

Não esqueço os amigos de Santarém, Renata Batista, Simone Moreira, Albetiza Alves e Raquel, obrigada por tudo, meninas.

Obrigada a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os primatas do Novo Mundo pertencem ao Infra Ordem Platyrrhini e estão distribuídos pelas florestas tropicais da América do Sul e América Central. Embora amplamente estudados, novas espécies continuam a ser descritas em áreas inexploradas da região amazônica. A subfamília Callitrichinae é a que possui a maior diversidade, com 41 espécies conhecidas, com pelo menos 60 táxons válidos. Esta subfamília reúne os platirrinos de menor porte, que ocorrem tanto na Amazônia quanto na Mata Atlântica. Suas espécies estão distribuídas em seis gêneros: *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Callithrix*, *Mico* e *Cebuella*. Para o presente estudo foram considerados os três gêneros mais derivados da subfamília, *Callithrix*, *Mico* e *Cebuella*, cuja taxonomia ainda tem muitas questões não resolvidas. As sequências de DNA do gene mitocondrial Citocromo b mitocondrial (Cyt B) foram obtidos para sete espécies de *Mico*, cinco de *Callithrix* e para o monotípico sagui pigmeu, *Cebuella pygmaea*. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando *Callimico goeldii* como o grupo externo. Os arranjos filogenéticos mostraram monofiletismo recíproco do grupo da Mata Atlântica (*Callithrix*) em relação ao grupo Amazônico (*Mico* e *Cebuella*). Com respeito aos arranjos internos observou-se a seguinte configuração para *Callithrix*: a espécie *C. aurita* é claramente a mais basal em comparação com os outros táxons, mas há uma politomia envolvendo espécies *C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. geoffroyi* e *C. kuhlli*. Para o grupo Amazônico foi observado *Cebuella* como a linhagem mais basal. *Mico humilis* aparece como a espécie resultante da primeira diversificação no gênero, seguindo-se de uma radiação explosiva que originou as outras espécies de *Mico*. A posição taxonômica de "*humilis*", se como espécie de *Mico* ou espécie de um gênero novo (*Callibella*), foi avaliada com base em divergências nucleotídicas. Os dados mostram que a divergência de "*humilis*" em relação a outras

espécies *Mico* é menor do que a divergência de *Callithrix aurita* em relação a outras espécies de *Callithrix*. Portanto, podemos concluir que, se "*humilis*" merece o estatuto de gênero diferente, como postulado por alguns autores, os mesmos critérios devem ser aplicados para elevar "*aurita*" a um gênero novo, separando-a de *Callithrix*. Finalmente, *Cebuella pygmaea*, até o presente reconhecida pela literatura como monotípica, parece conter mais de uma espécie, já que elevadas divergências nucleotídicas foram observadas entre os indivíduos analisados neste estudo. Os resultados da presente análise são bastante informativos para elucidar aspectos importantes da história evolutiva dos primatas pequenos da subfamília Callitrichinae.

Palavras-chave: Filogenia Molecular, DNA mitocondrial, Primatas do Novo Mundo, Amazônia, Taxonomia.

ABSTRACT

The New World primates belong to the infraorder Platyrrhini and are distributed by the tropical forests of South America and Central America. Although extensively studied, new species continue to be described to unexplored areas of the Amazon region. The Callitrichinae subfamily is the one that has the greatest diversity, with 41 known species, with at least 60 valid rate. The primates of the subfamily Callitrichinae gather the smaller platyrrhines occurring in the Amazon and Atlantic Forest. Its species are distributed in six genera: *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Callithrix*, *Mico* and *Cebuella*. For the present study were considered the three most derived genera *Callithrix*, *Mico* and *Cebuella* and whose taxonomy still has many unresolved issues from the taxonomic point of view. DNA sequences of the mitochondrial gene cytochrome b (CytB) were obtained for seven species of *Mico*, five from *Callithrix*, and for four specimens of the monotypic Pygmy marmoset (*Cebuella*). Phylogenetic analyzes were performed using *Callimico goeldii* as the outgroup. The phylogenetic arrangement showed reciprocal monophyly of the Atlantic Forest group (*Callithrix*) in relation to the Amazon group (*Mico* and *Cebuella*). Regarding the internal arrangements, there was the following configuration for *Callithrix*: the species *C. aurita* is the most basal compared to other taxa, but there has been a polytomy involving species *C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. geoffroyi* and *C. kuhlli*. For the Amazon group was observed pygmy marmoset as the most basal lineage. *Mico humilis* appears as the first species to diverge in this genus, followed by a monophyletic group, possibly resulting from an explosive diversification that originated the other species of *Mico*. The taxonomic status of "*humilis*", whether it be a species of *Mico* or species of a new genus (*Callibella*) was evaluated on the basis of nucleotide differences. It was observed that the divergence of "*humilis*" in relation to other species *Mico* is

smaller than the divergence of *C. aurita* in relation to other species of *Callithrix*. Therefore, we can conclude that if "*humilis*" deserves the different genus status, as postulated by some authors, the same criteria should be applied to raise "*aurita*" to a new genus, separating it from *Callithrix*. In turn, pygmy marmoset appears to be a complex of species, since high nucleotide differences were observed among individuals of this species, to the present recognized by literature as monotypic. The results of this analysis are quite informative to elucidate important aspects of the evolutionary history of small primates of the Callitrichinae subfamily.

Key words: Molecular Phylogeny, Mitochondrial DNA, New World Primates, Amazonia, Taxonomy.

LISTA DE FIGURAS	PAG.
Figura 1. Arranjos cladísticos propostos para os primatas do Novo Mundo, com base em caracteres de morfologia: a) Rosenberger (1980); b) Ford (1986); Kay (1990). Figura adaptada de Schneider <i>et al</i> (2001).....	16
Figura 2 - Arranjo filogenético molecular produzido por Schneider (2000), e uma classificação taxonômica para os primatas do Novo Mundo composta por três famílias. A figura foi retirada do artigo em questão.....	17
Figura 3 – Proposta de classificação taxonômica para os primatas do Novo Mundo, com três famílias, recomendada por Schneider & Sampaio (2013). A figura foi retirada do artigo em questão.....	18
Figura 4. Distribuição geográfica dos calitriquíneos. Modificado de Rylands <i>et al.</i> (1993), van Roosmalen & van Roosmalen (2003).....	21
Figura 5. Cladograma obtido por van Roosmalen & van Roosmalen (2003), a partir de sequências de DNA mitocondrial usado para descrever o novo gênero <i>Callibella</i> . Figura copiada do artigo.....	24
Figura 6. Cladograma obtido por Schneider <i>et al.</i> (2011), a partir de sequências de DNA nuclear, usado para propor a reclassificação de <i>Callibella</i> como <i>Mico humilis</i> . Figura copiada do artigo.....	25
Figura 7. Distribuição geográfica das espécies de <i>Mico</i> e <i>Cebuella</i> . Mapa confeccionado por Jeferson Carneiro.....	28
Figura 8. Distribuição geográfica das espécies de <i>Callithrix</i> . Mapa confeccionado por Jeferson Carneiro.....	30
Figura 9. Percentual de divergências nucleotídicas (P), obtidas a partir de uma base de dados de sequências de DNA do gene mitocondrial CytB com representantes de <i>Callimico goeldii</i> , espécies de <i>Mico</i> e <i>Cebuella pygmaea</i> . Os triângulos em cor representam as comparações entre indivíduos da mesma espécie.....	38
Figura 10. Percentual de divergências nucleotídicas (P), obtidas a partir de uma base de dados de sequências de DNA do gene mitocondrial CytB com representantes de <i>Callimico goeldii</i> e espécies de <i>Callithrix</i> . Os triângulos em cor representam as comparações entre indivíduos da mesma espécie.....	39
Figura 11. Percentual de divergências nucleotídicas (P), obtidas a partir de uma base de dados de sequências de DNA do gene mitocondrial CytB com representantes de <i>Callimico goeldii</i> , <i>Mico</i> , <i>Callithrix</i> e <i>Cebuella</i> . Os triângulos em cor representam as comparações entre indivíduos da mesma espécie.....	40

- Figura 12. Árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos, construída no MEGA 7.0 a partir de uma base de dados de 960 pares de bases do gene mitocondrial CytB. Os números nos nós são valores de Bootstrap com 1000 pseudoréplicas..... 43
- Figura 13. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia, construída no MEGA 7.0 a partir de uma base de dados de 960 pares de bases do gene mitocondrial CytB. Os números nos nós são valores de Bootstrap com 1000 pseudoréplicas..... 44
- Figura 14. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana, construída no Mr Bayes a partir de uma base de dados de 960 pares de bases do gene mitocondrial CytB. Os números nos nós são valores de Probabilidade a Posteriori. 45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Os primatas do Novo Mundo e as primeiras classificações sistemáticas.....	13
1.2 As mudanças na taxonomia dos platirrinos a partir das filogenias moleculares...	14
1.3 A subfamília Callitrichinae sensu Schneider & Sampaio (2013).....	19
1.4 A taxonomia e a distribuição geográfica de <i>Mico e Cebuella</i>	25
1.5 A taxonomia e a distribuição geográfica de <i>Callithrix</i>	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Amostragem e Extração de DNA.....	31
3.2 Amplificação e Sequenciamento de DNA do gene CytB	31
3.3 Análises das sequências de DNA.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Divergências nucleotídicas.....	35
4.2 Relações filogenéticas.....	40
5. DISCUSSÃO.....	45
5.1 O padrão de diversificação em <i>Mico e Callithrix</i>	45
5.2 O status taxonômico da linhagem “ <i>humilis</i> ”	48
5.3 O status taxonômico de <i>Cebuella</i> e sua diversidade intraespecífica.....	50
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os primatas do Novo Mundo e as primeiras classificações sistemáticas

Os primatas do Novo Mundo pertencem à infra ordem Platyrrhini, e estão distribuídos pelas florestas tropicais da América do Sul e América Central. São macacos que variam de pequeno a médio porte (100g a pouco mais de 1kg), são arborícolas, determinadas espécies possuem cauda preênsil. De acordo com a compilação recente de Rylands & Mittermeier (2009), os platirrininos devem ser acomodados em 19 gêneros, 139 espécies, e, considerando-se subespécies, este número chega a 199 formas distintas. Esta compilação sobre as formas taxonômicas atuais é resultante de intensos debates que vem sendo travados por cientistas durante décadas de estudos. Inclusive, nos anos recentes, várias espécies novas têm sido descobertas em áreas pouco exploradas da região amazônica.

As classificações sistemáticas mais antigas, em nível de família e subfamília, consideravam apenas duas famílias, Callitrichidae (com *Cebuella*, *Callithrix*, *Saguinus* e *Leontopithecus*), e Cebidae incluindo os demais gêneros. Esse esquema de duas famílias foi mantido em publicações ao longo de décadas, desde Simpson (1945), Hill (1957, 1960 e 1962), Cabrera (1958), Napier & Napier (1967), Simons (1972). Hershkovitz (1977) foi o primeiro a sugerir uma terceira família, Callimiconidae, esta somente para *Callimico*.

Após o trabalho de Hershkovitz, os primeiros arranjos como base em análises cladísticas, usando dados morfológicos, foram publicados Rosenberger (1981), Ford (1986) e Kay (1990). Estes três autores concordavam com três grupos claramente bem definidos, atelíneos (*Ateles*, *Brachyteles*, *Lagothrix* e *Alouatta*), pitecíneos (*Pithecia*, *Chiropotes* e *Cacajao*), e calitriquíneos (*Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callithrix*, *Cebuella* e *Callimico*), mas divergiam essencialmente em relação ao posicionamento de *Cebus*, *Saimiri*, *Aotus* e *Callicebus*. Rosenberger (1981) defendia que *Cebus* e *Saimiri* como grupo

irmãos dos calitriquíneos, e *Callicebus* e *Aotus* como sendo linhagens irmãs ligadas clado dos pitecíneos. Por sua vez, Ford (1986) considerava *Cebus* como a primeira linhagem da radiação dos primatas do Novo Mundo, e posicionava *Callicebus* como grupo irmão de *Callicebus/Aotus*, estes como o segundo ramo mais basal dos platirrinos. Já enquanto Kay (1990) colocava *Callicebus* como o platirrino mais basal, *Cebus* como o segundo mais basal, *Saimiri* como grupo irmão dos calitriquíneos, e *Aotus* como uma linhagem isolada entre atelíneos e calitriquíneos. Essas três topologias são mostradas na Figura 1.

1.2 As mudanças na taxonomia dos platirrinos a partir das filogenias moleculares

As primeiras propostas taxonômicas com base em dados moleculares foram obtidas na década de 1990. Schneider *et al.* (1993), em um estudo precursor envolvendo todos os 16 gêneros platirrinos publicaram a primeira filogenia molecular a partir de sequências de DNA do gene nuclear Epsilon-globina, resolvendo algumas das discordâncias dos arranjos referidos anteriormente. Por exemplo, *Callicebus* destacou-se como o gênero mais basal no clado dos Pitecíneos; *Callimico* posicionou-se como o grupo irmão de *Callithrix-Cebuella*; *Cebus*, *Saimiri* e *Aotus* agruparam juntos em um único ramo, mais proximamente relacionados com os calitriquíneos do que com os outros platirrinos. Esses arranjos da filogenia de Schneider *et al.* eram todos fortemente apoiados na estatística de bootstrap.

Nos anos subsequentes uma série de filogenias moleculares foram geradas, algumas concentradas apenas em clados particulares, e outras com todos os gêneros de platirrinos existentes, todos corroborando os dados da primeira filogenia molecular (Schneider *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1998; Meireles *et al.*, 1999; Canavez *et al.*, 1999; Tagliaro *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1999).

Schneider (2000), em uma revisão agregando dezenas de marcadores moleculares, propôs uma classificação para os platirrinos composta de três famílias: Atelidae, Cebidae e Pitheciidae (Figura 2), com a seguinte composição: I - **Cebidae**, com três subfamílias: **Cebinae** (*Cebus* e *Saimiri*), **Aotinae** (*Aotus*), e **Callitrichinae** (*Cebuella*, *Mico*, *Callithrix*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*); II - **Pitheciidae** (*Callicebus*, *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*), sem subdivisão em subfamílias, e III - **Atelidae** (*Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix*, *Oreonax* e *Brachyteles*), também sem subdivisão. É importante salientar que estas conclusões foram embasadas em uma análise global de dados moleculares de vários estudos (Schneider *et al.*, 1996; Canavez *et al.*, 1999; Chaves *et al.*, 1999; Porter *et al.* 1997; Porter *et al.*, 1999; Pastorini *et al.*, 1998; Meireles *et al.*, 1999).

Groves (2001) propôs uma nova classificação, com cinco famílias: Cebidae (*Cebus* e *Saimiri*), Aotidae (*Aotus*), Callitrichidae (calitriquíneos), Atelidae e Pitheciidae.

Nova mudança foi proposta por Rylands & Mittermeier (2009), desta vez mantendo Atelidae, Pitheciidae, Aotidae, e retornando *Cebus* e *Saimiri* para a família Cebidae juntamente com os calitriquíneos.

Na revisão mais recente sobre este tema, Schneider & Sampaio (2013) defendem que não há ainda resolução na posição de *Aotus* e *Cebus/Saimiri* junto aos calitriquíneos que justifique as classificações propostas por Groves (2001) e por Rylands e Mittermeier (2009). Com isso, argumentando sobre a necessidade de novos dados robustos para resolver as politomias ainda existentes na história evolucionária dos platirrinos, Schneider & Sampaio (2013) defendem a manutenção das três famílias propostas por Schneider (2000): Atelidae, Pitheciidae e Cebidae (Figura 3).

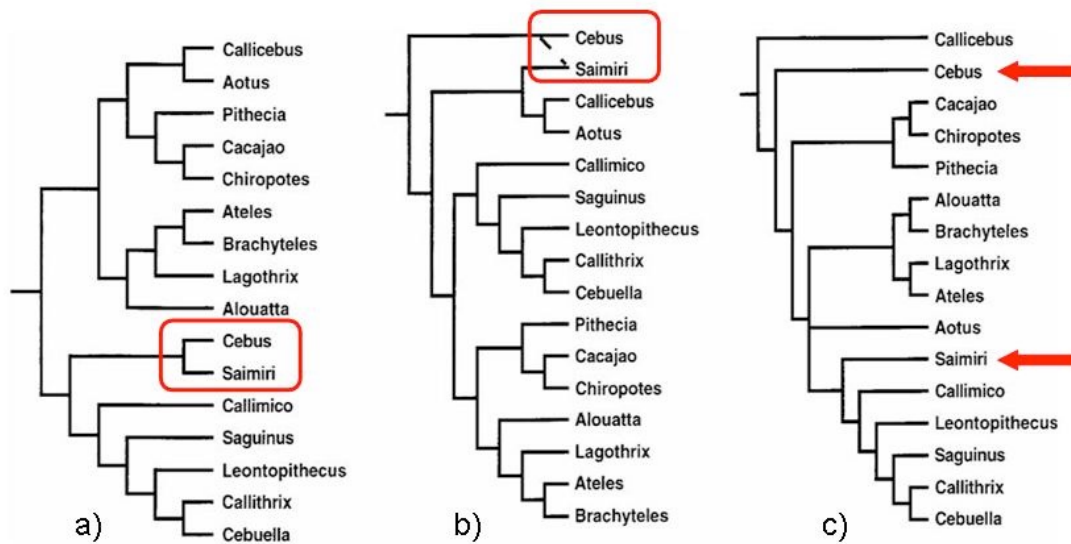


Figura 1. Arranjos cladísticos propostos para os primatas do Novo Mundo, com base em caracteres de morfologia: a) Rosenberger (1980); b) Ford (1986); Kay (1990). Figura adaptada de Schneider *et al* (2001).

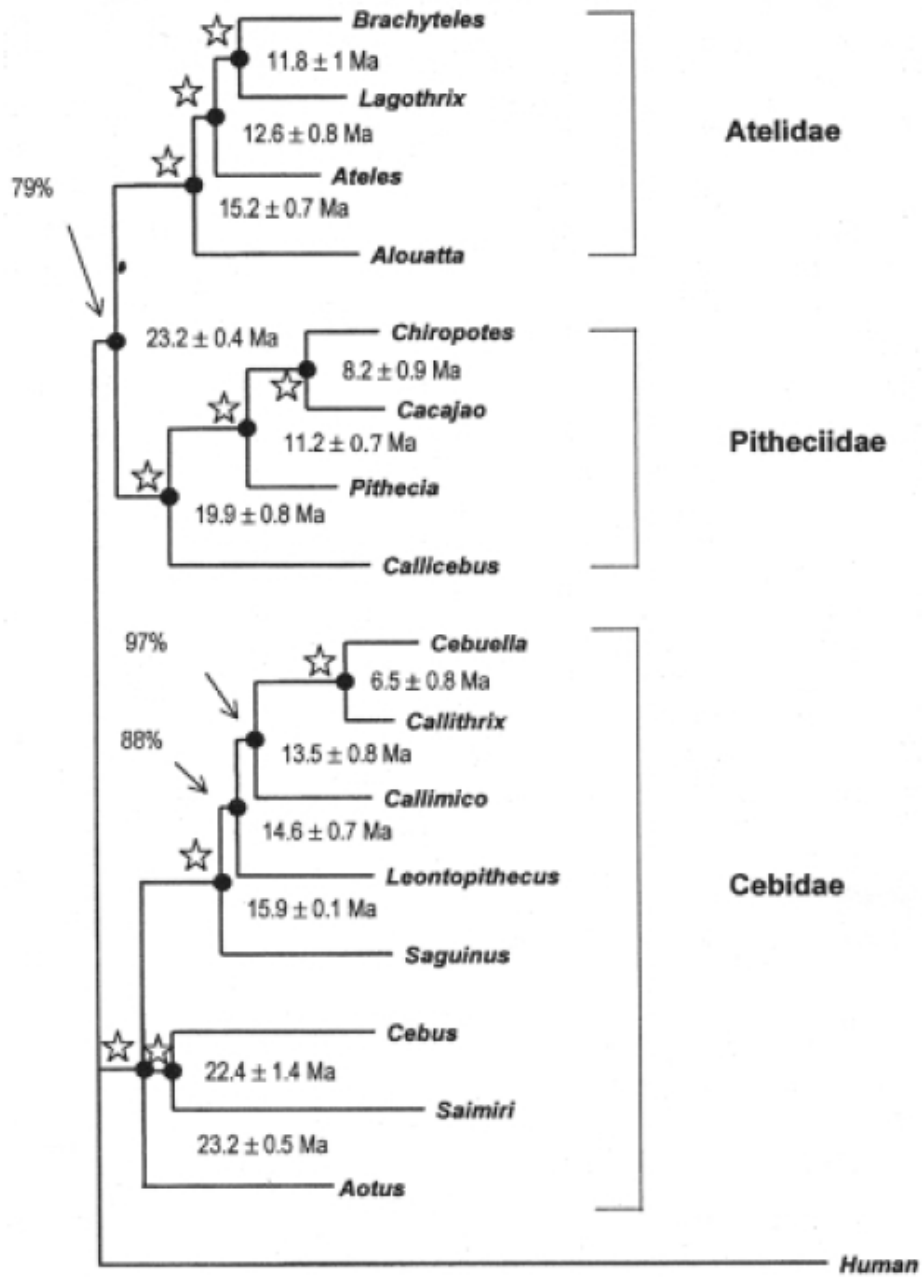


Figura 2 - Arranjo filogenético molecular produzido por Schneider (2000), e uma classificação taxonômica para os primatas do Novo Mundo composta por três famílias. A figura foi retirada do artigo em questão.

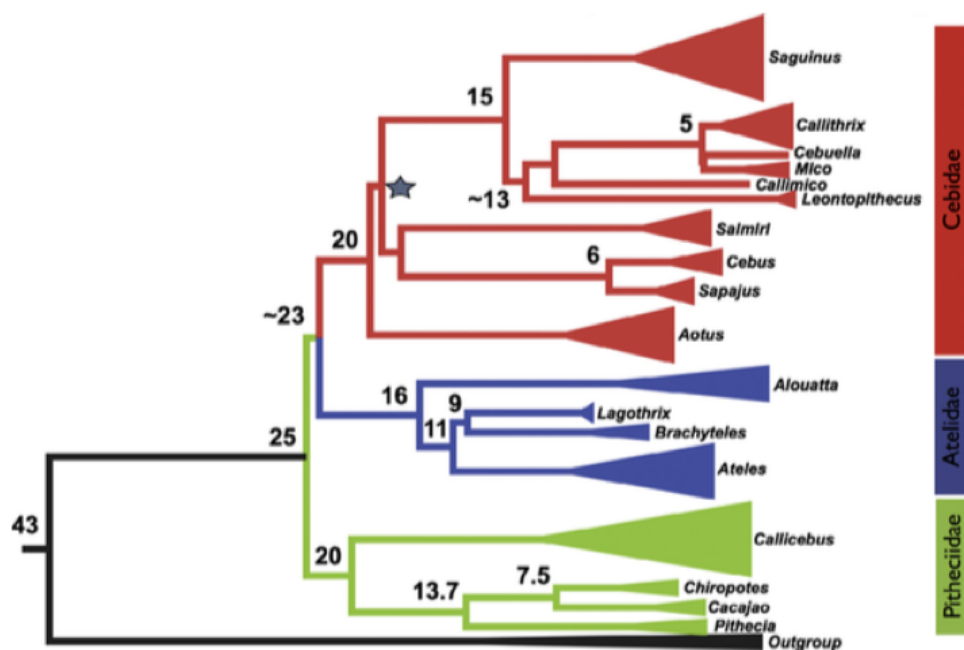


Figura 3 – Proposta de classificação taxonômica para os primatas do Novo Mundo, com três famílias, recomendada por Schneider & Sampaio (2013). A figura foi retirada do artigo em questão.

1.3 A subfamília Callitrichinae sensu Schneider & Sampaio (2013)

A subfamília Callitrichinae possui grande diversidade de formas. Rylands & Mittermeier (2009) reconhecem 42 espécies para este grupo, distribuídas nos gêneros *Saguinus* (15), *Leontopithecus* (4), *Callimico* (1), *Callithrix* (6), *Mico* (14), *Callibella* (1) e *Cebuella* (1). Este grupo possui uma distribuição geográfica bastante ampla, explorando os mais diversificados tipos de habitats (Figura 4).

Os calitriquíneos apresentam como principais características a variação na coloração da pelagem, o pequeno tamanho corporal, como o *Cebuella pygmaea* que é considerado o menor primata neotropical, pesando aproximadamente 130g e com um comprimento total de 338 mm (Spix, 1823); as unhas em forma de garras, exceto no polegar (ausente em *Callimico*); molares com três cúspides e ausência de terceiro molar, exceto em *Callimico*, que apresenta o terceiro molar de forma reduzida; parto gemelar (exceto em *Callimico*, que apresenta parto com apenas um filhote) (Hershkovitz, 1977). Sua alimentação é muito variada, sendo a dieta rica em frutos, insetos, néctar, exsudados e pequenos vertebrados, e preferem áreas de vegetação secundárias ou perturbadas devido à grande e disponibilidade de alimentos (Rylands & Faria, 1993; Snowdon & Soini, 1988).

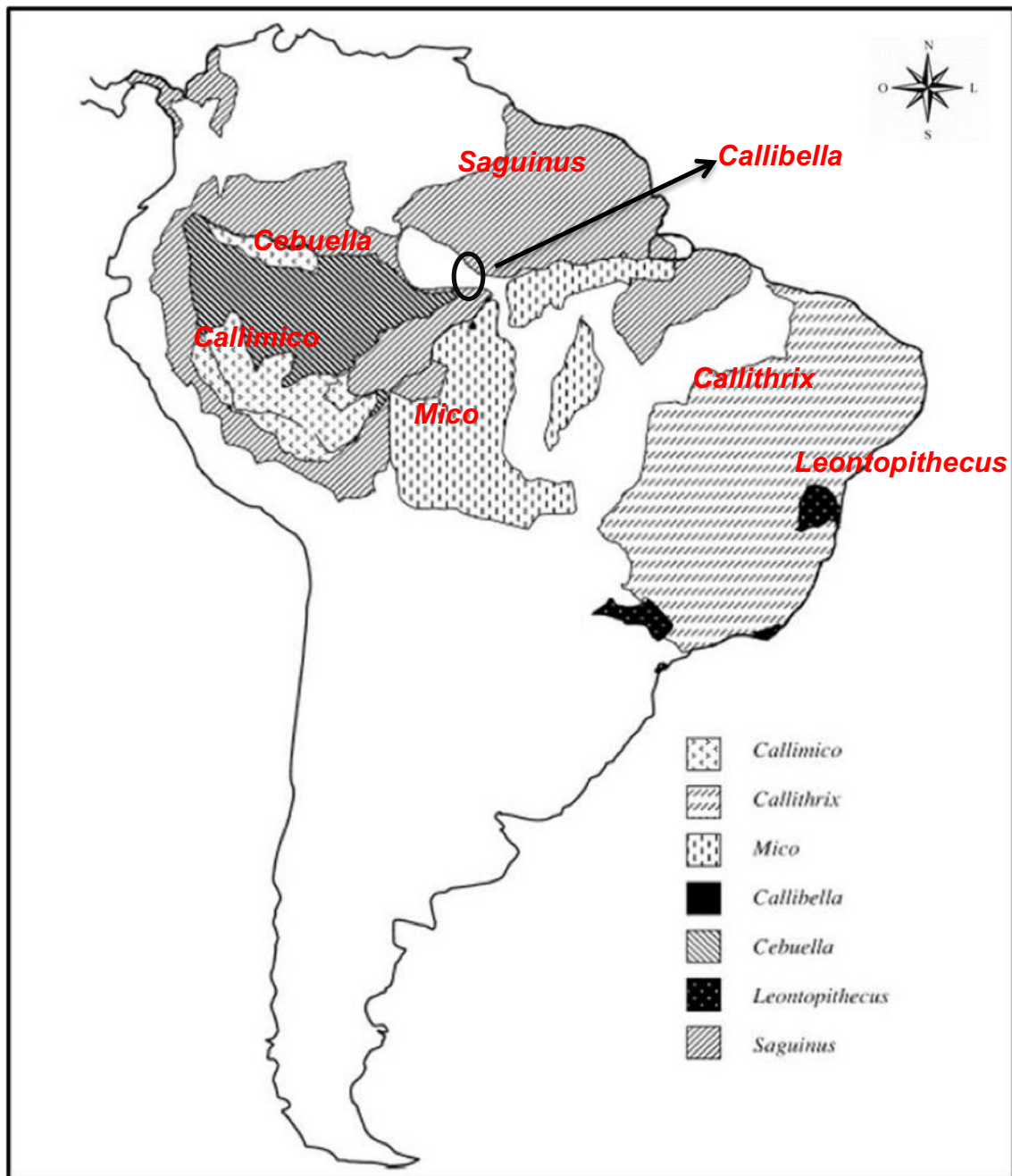


Figura 4. Distribuição geográfica dos calitriquíneos. Modificado de Rylands *et al.* (1993), van Roosmalen & van Roosmalen (2003).

A história sobre gêneros novos na subfamília Callitrichinae, como *Mico* e *Callibella*, está intimamente relacionada a achados de filogenias moleculares recentes, e que tem sido motivo de grande debate entre grupos que defendem a redução do número de gêneros, com base em alta similaridade genérica entre táxons, e os defensores da manutenção do status genérico de algumas formas tradicionais, apesar da grande semelhança genética entre alguns.

Uma das primeiras propostas de mudanças no status genérico nos calitriquíneos foi a de Barroso (1995) e Barroso *et al.* (1997), que sugeriram que *Cebuella pygmaea* passasse a ser chamado de *Callithrix pygmaea*, após uma análise com sequências de DNA do gene IRBP. O arranjo filogenético obtido pelos autores citados mostrou que *Cebuella pygmaea* era mais semelhante às espécies de *Callithrix* da Amazônia do que *Callithrix* da Amazônia *versus* *Callithrix* da Mata Atlântica, justificando assim o rebaixamento de *Cebuella* ao status de espécie de *Callithrix*. Estas conclusões foram obtidas por outros autores, como Schneider *et al.* (1996), Schneider & Rosenberger (1996), Tagliaro *et al.* (1997), Porter *et al.* (1997), e Canavez *et al.* (1999).

Rylands *et al.* (2000) reconheceram a estreita similaridade genética entre *Cebuella* com as espécies de *Callithrix* da Amazônia, mas defenderam a manutenção do status genérico de *Cebuella*, com base no seu diminuto tamanho e suas especializações morfológicas, que o diferenciava claramente das outras espécies amazônicas de *Callithrix*. Neste caso, para *Cebuella* ser mantido como um gênero separado, Rylands *et al.* propuseram que os grupos “jacchus” e “argentata” de *Callithrix* deveriam ser nominados como gêneros diferentes, isto para manter a congruência com a filogenia molecular. Neste sentido, os autores propuseram o resgate do nome *Mico* Lesson, 1840 para representar o gênero que abrigaria as espécies amazônicas de *Callithrix*, e o nome *Callithrix* foi mantido, para representar as espécies da Mata Atlântica.

Uma nova forma amazônica que havia sido descrita como *Callithrix humilis* (van Roosmalen et al., 1998) foi elevada ao status genérico, sendo nominada de *Callibella humilis* por van Roosmalen & van Roosmalen (2003). De ocorrência em uma pequena área no meio da distribuição de *Mico* e *Cebuella*, no interflúvio entre os rios Madeira e Aripuanã, o seu status genérico foi defendido com base em uma filogenia molecular a partir de sequências da Região Controle do DNA mitocondrial, mostrada na Figura 5, em que *C. humilis* aparece externamente ao agrupamento de *Cebuella* como as espécies de *Mico*.

Entretanto, o status genérico de *Callibella* foi questionado por Schneider et al. (2011), com base em uma reanálise dos mesmos dados mitocondriais usados por van Roosmalen & van Roosmalen, e em novos dados de sequências de segmentos de inserções Alu do genoma nuclear. As árvores filogenéticas obtidas por Schneider et al. (2011) posicionaram *C. humilis* mais estreitamente relacionado a *Mico* do que a *Cebuella*, em contraposição ao obtido por van Roosmalen & van Roosmalen (2003). Com base nesse novo arranjo filogenético (Figura 6) e nos níveis de divergências nucleotídicas, Schneider et al. defenderam que *Callibella humilis* deveria “retornar” ao seu status original de espécie de *Mico*, ou seja, *Mico humilis*.

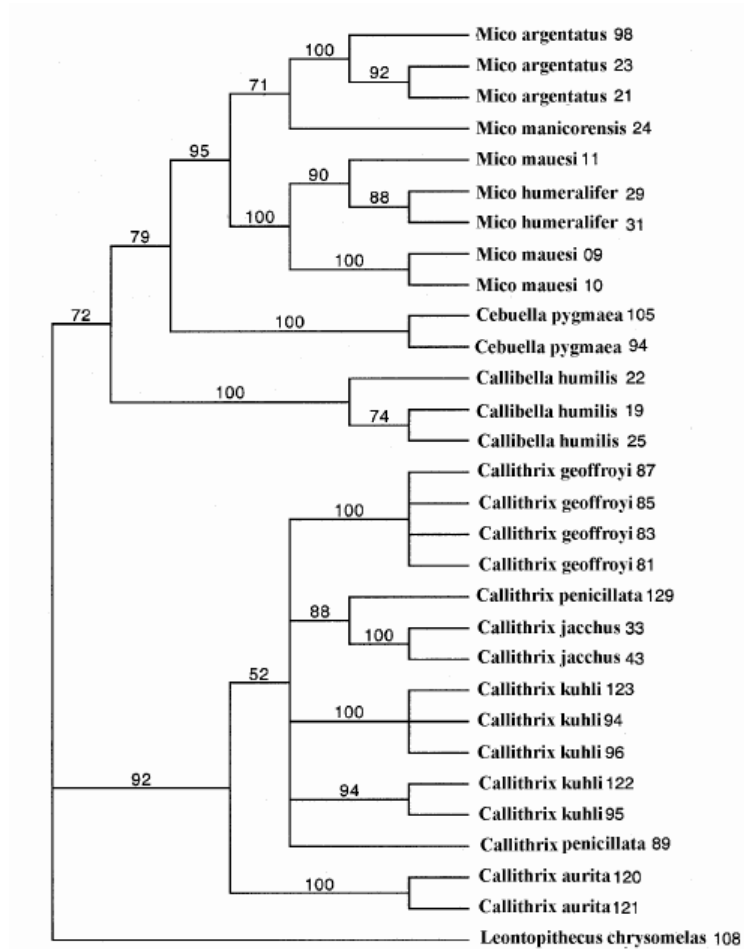


Figura 5. Cladograma obtido por van Roosmalen & van Roosmalen (2003), a partir de seqüências de DNA mitocondrial usado para descrever o novo gênero *Callibella*. Figura copiada do artigo.

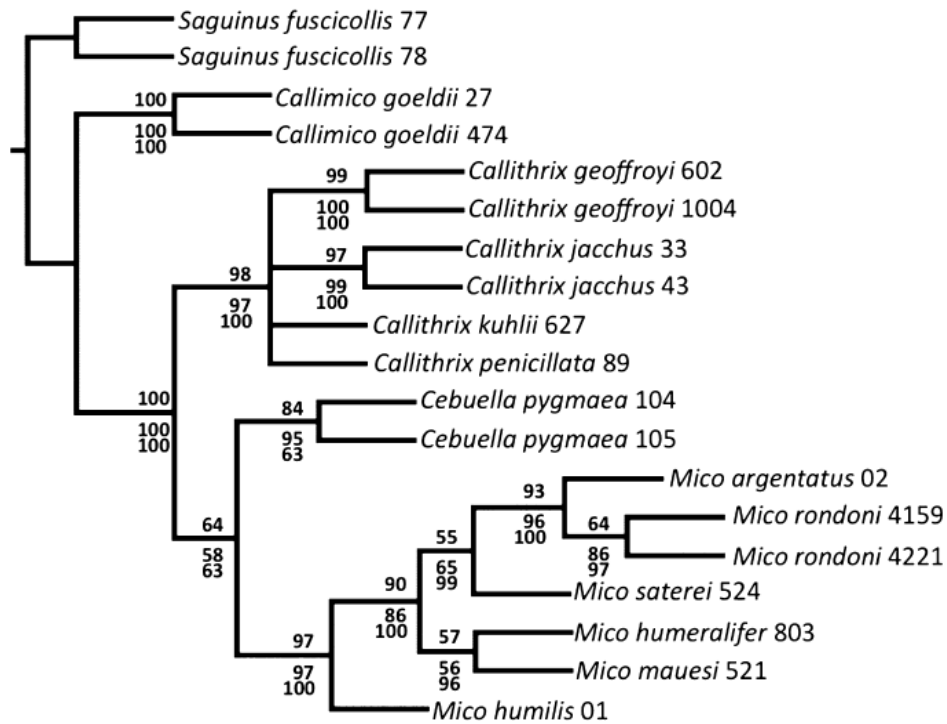


Figura 6. Cladograma obtido por Schneider *et al.* (2011), a partir de sequências de DNA nuclear, usado para propor a reclassificação de *Callibella* como *Mico humilis*. Figura copiada do artigo.

1.4 A taxonomia e a distribuição geográfica de *Mico* e *Cebuella*

O gênero *Mico* compreende 14 espécies reconhecidas (Rylands & Mittermeier, 2009), que estão geograficamente distribuídas ao sul do Amazonas, desde o Rio Madeira até o interflúvio Xingu-Tocantins. Trata-se de um gênero bastante complexo, pois as espécies possuem distribuições contíguas, ou muito próximas umas das outras, as vezes separadas apenas por pequenos afluentes, que podem ou não representar barreiras efetivas. Outra peculiaridade deste gênero é que algumas espécies só foram descritas recentemente e ainda são carentes de estudos mais aprofundados.

Sete espécies de *Mico* foram descritas da década de 1990 para cá, todas do interflúvio Madeira-Tapajós. São elas: *Mico nigriceps* Ferrari & Lopes, 1992, *Mico mauesi* Mittermeier et. al., 1992, *Mico marcai* Alperin, 1993, *Mico saterei* Silva Jr. & Noronha, 1998, *Mico manicorensis* Van Roosmalen et al. 2000, *Mico acariensis* Van Roosmalen et al. 2000, e *Mico rondoni* Ferrari et al. 2010. *Mico saterei* e *Mico marcai* pertenciam anteriormente à espécie *Mico humeralifer* (Hershkovitz, 1997). As outras cinco foram descritas a partir de uma grande variedade que se acreditava ser *M. melanurus* (Rylands, 2012), e que Hershkovitz (1977) havia citado como sendo *Callithrix argentata melanurus*. A espécie *Mico rondoni* foi descrito em Rondônia por Ferrari et al. (2010).

Os representantes de *Mico* ocupam as florestas Amazônicas dos estados do Pará, Amazonas, Mato Grosso e Rondônia, habitam florestas com vegetação densa e seringais, andam em grupos de 5 a 15 indivíduos (Stevenson & Rylands, 1998; Van Roosmalen et al., 2000).

Cebuella pygmaea tem sido tratada como abrigando duas subespécies, *C. p. pygmaea* e *C. p. niveiventris* (Van Roosmalen e Van Roosmalen (1997). *C. p. pygmaea* ocorre na bacia do alto Amazonas, ao norte do Rio Solimões no Brasil, a oeste do Rio

Japurá e ao sul do Rio Caquetá, na Colômbia, Equador e Peru, tendo como limite leste da distribuição o Rio Japurá.

A subespécie *C. p. niveiventris* ocorre ao sul do Rio Solimões-Amazonas-Marañon a leste do Baixo Rio Huallaga e acima do rio Ucayali. Foi registrada no Peru, a leste dos rios Mayo e Huallaga, e se estendendo para leste e norte da Bolívia até a região de Cobija (Aquino & Encarnación, 1994).

A distribuição geográfica das 14 espécies de *Mico* e a de *Cebuella pygmaea* é mostrada na Figura 7.

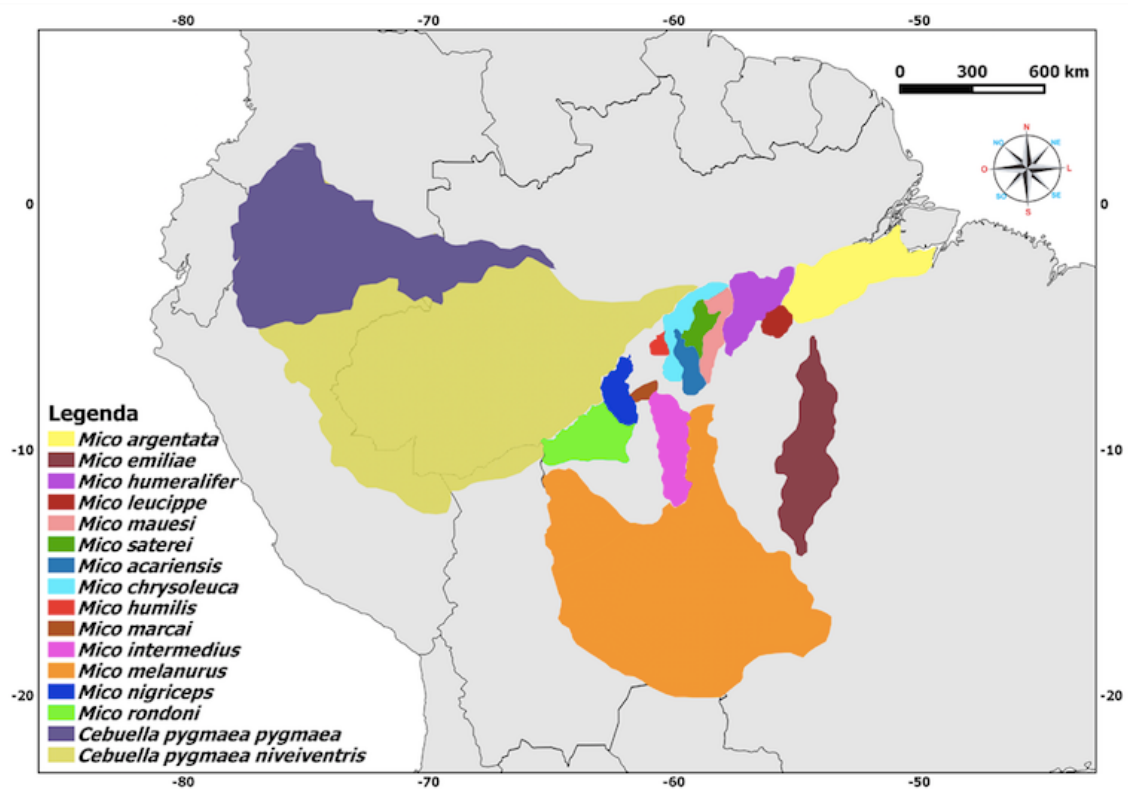


Figura 7. Distribuição geográfica das espécies de *Mico* e *Cebuella*. Mapa confeccionado por Jeferson Carneiro.

1.5 A taxonomia e a distribuição geográfica de *Callithrix*

O gênero *Callithrix* abriga seis espécies que ocorrem na Mata Atlântica: *Callithrix aurita* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812), *C. jacchus* (Linnaeus, 1758), *C. geoffroyi* (Humboldt, 1812), *C. penicillata* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812), *C. kuhlli* (Coimbra-Filho, 1985) e *C. flaviceps* (Thomas, 1903).

As espécies de *Callithrix* estão distribuídas nos diferentes biomas do leste brasileiro, como Caatinga, Cerrado, Florestas, Unidades de Conservação, e também em áreas altamente antropizadas (Rylands *et al.*, 2009).

Como pode ser visto na Figura 8, *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* são as que apresentam as distribuições geográficas mais amplas, *C. jacchus* ocorrendo ao extremo norte da distribuição, e *C. penicillata* na porção mais central do sudeste brasileiro. As outras quatro espécies apresentam distribuições geográficas menores e ao longo do litoral, com *C. kuhlli* mais ao norte, seguida de *C. geoffroyi*, *C. flaviceps* e *C. aurita*, esta última no limite sul da distribuição. Percebe-se que há sobreposição da ocorrência entre elas, como por exemplo *C. penicillata*, que tem áreas de contato com todas as outras espécies; *C. kuhlli* faz contato com *C. geoffroyi*; *C. flaviceps* possui zona contato com *C. geoffroyi* ao norte e com *C. aurita* ao sul. O mapa mostrado na Figura 8 foi montado a partir das distribuições mostradas no site da IUCN (<http://www.iucnredlist.org/search>).

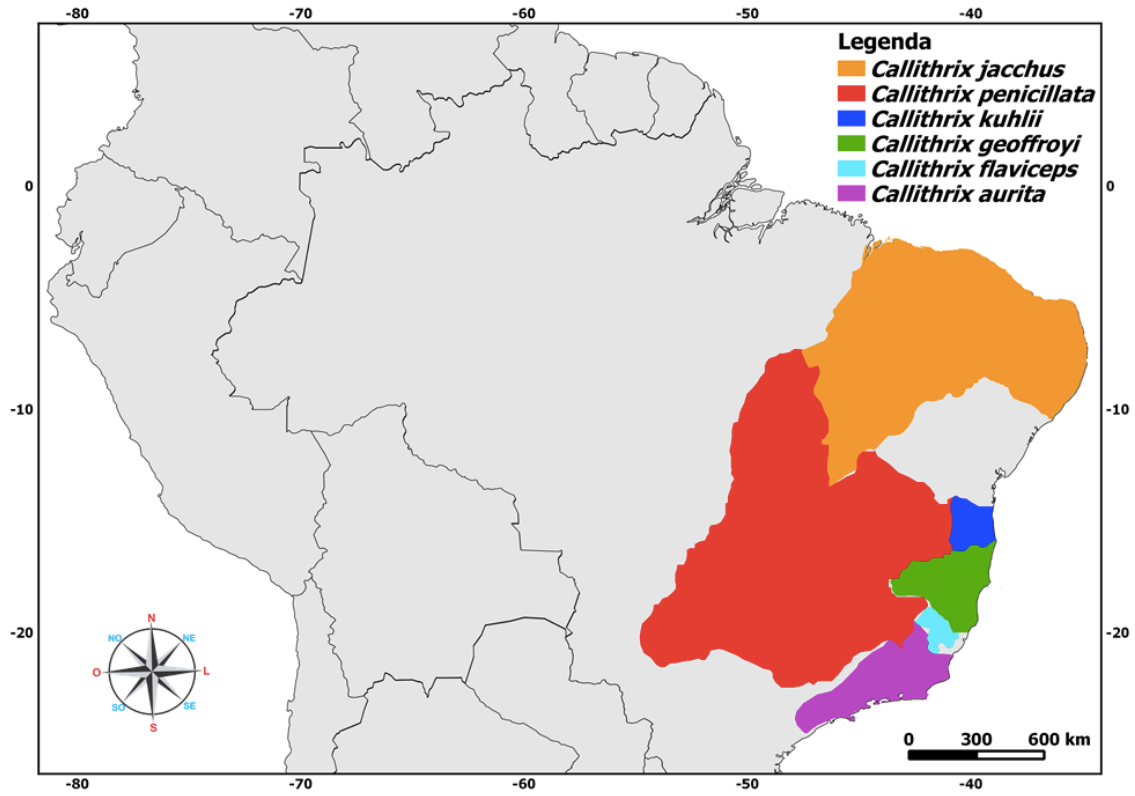


Figura 8. Distribuição geográfica das espécies de *Callithrix*. Mapa confeccionado por Jeferson Carneiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo utilizar dados de sequências de DNA do gene mitocondrial Citocromo b (CytB) no intuito de entender melhor as relações filogenéticas entre espécies dos gêneros *Mico*, *Cebuella* e *Callithrix*, e contribuir com subsídios para a discussão sobre o status taxonômico dessas linhagens.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever a topologia das árvores filogenéticas;
- Comparar as divergências nucleotídicas entre as espécies e entre os gêneros;
- Discutir o status taxonômico da linhagem “*humilis*”;
- Discutir o status taxonômico de *Cebuella*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e Extração de DNA

A amostragem do presente estudo é constituída por 55 exemplares, incluindo sequencias já depositadas no Genbank. Estas amostras representam sete espécies do gênero *Mico* (50% da diversidade de espécies do gênero), cinco das seis espécies de *Callithrix*, além de *Cebuella pygmaea*. *Callimico goeldii* foi usada como grupo externo nas análises.

A maioria das amostras do presente estudo faz parte da coleção de DNA do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Estudos Costeiros do Campus de Bragança, UFPA. Amostras adicionais de *Mico*, *Cebuella* e *Callithrix* foram gentilmente cedidas pela UFAM (Dra. Izeni Farias, projeto SISBIOTA) e pelo Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (Dr. Alcides Pissinatti). A relação das amostras usadas no presente estudo é apresentada na Tabela 1.

Quando necessário, a extração DNA total foi realizada a partir de amostras de sangue ou tecido muscular, usando-se o Kit de extração de DNA *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, da Promega, usando-se as instruções do fabricante.

3.2 Amplificação e Sequenciamento de DNA do gene CytB

Foi amplificado um segmento com cerca de 1000 pares de base do gene Cyt b, por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), usando-se para tal o seguinte par de iniciadores: F - 5' GCACCTACCCACGAAAAGAA 3' e R - 5' ACATTGCCTCTGCAAATTGA 3' (Bi et al., 2012).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L, contendo os seguintes componentes: 4 μ L da solução de DNTP (1,25 mM), 2,5 μ L de Tampão 10X,

1µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de cada um dos iniciadores (50ng/µL), 1µL de DNA, 0,25µL de Taq polimerase (5U/µL), e água bidestilada estéril para completar o volume final.

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial 95°C por 5 minutos, seguindo 30 ciclos por 94°C a 1 minuto, de 50°C a 65°C por 1 minuto para hibridização, e 72°C por 1 minuto; ao final foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 1%, corado com GelRed e visualizados e luz ultravioleta.

As PCRs positivas foram purificadas com PEG 8000 (Dun e Blattner, 1987), e no passo seguinte foram sequenciadas pelo método de didesoxiterminal proposto por Sanger e colaboradores 1977. O sequenciamento do DNA precipitado foi feito no ABI 3500 XL (*Applied Technologies*).

Tabela 1. Relação das amostras usadas no presente estudo.

ESPÉCIE	CÓDIGO	LOCALIDADE
<i>Callimico goeldii</i>	NC024628	Genbank
<i>Callithrix geoffroyi</i>	KC757388	Genbank
<i>Callithrix geoffroyi</i>	HM368005	Genbank
<i>Callithrix jacchus</i>	AB572419	Genbank
<i>Callithrix jacchus</i>	KM588314	Genbank
<i>Callithrix jacchus</i>	AF295586	Genbank
<i>Callithrix jacchus</i>	33	Extremós, RN
<i>Callithrix jacchus</i>	43	Extremós, RN
<i>Callithrix aurita</i>	2161	CPRJ
<i>Callithrix aurita</i>	2936	CPRJ
<i>Callithrix aurita</i>	3001	CPRJ
<i>Callithrix penicillata</i>	5056	UNB
<i>Callithrix penicillata</i>	5057	UNB
<i>Callithrix penicillata</i>	5058	UNB
<i>Callithrix penicillata</i>	5060	UNB
<i>Callithrix kuhlli</i>	714	CPRJ
<i>Callithrix kuhlli</i>	812	CPRJ
<i>Callithrix kuhlli</i>	1093	CPRJ

<i>Callithrix kuhlli</i>	484	CPRJ
<i>Callithrix kuhlli</i>	1143	CPRJ
<i>Callithrix kuhlli</i>	1063	CPRJ
<i>Callithrix geoffroyi</i>	88	Criadouro Barbuse Leal, DF
<i>Callithrix geoffroyi</i>	442	Criadouro Barbuse Leal, DF
<i>Callithrix geoffroyi</i>	630	Criadouro Barbuse Leal, DF
<i>Callithrix geoffroyi</i>	956	Criadouro Barbuse Leal, DF
<i>Callithrix geoffroyi</i>	1004	Criadouro Barbuse Leal, DF
<i>Callithrix geoffroyi</i>	5062	Criadouro Barbuse Leal, DF
<i>Mico argentata</i>	21	Cametá (Pará)
<i>Mico argentata</i>	49	CENP
<i>Mico argentata</i>	98	CENP
<i>Mico argentata</i>	LB518	Cametá, PA
<i>Mico argentata</i>	ABA	CENP
<i>Mico argentata</i>	CA02	CENP
<i>Mico argentata</i>	LB516	Cametá
<i>Mico humeralifer</i>	LB802	Jurutí, PA
<i>Mico humeralifer</i>	CTGAM211	INPA
<i>Mico humeralifer</i>	CA18	CENP
<i>Mico humeralifer</i>	CA16	CENP
<i>Mico humeralifer</i>	1	CENP
<i>Mico mauesi</i>	2765	Nova Olinda, AM
<i>Mico mauesi</i>	4	Nova Olinda, AM
<i>Mico mauesi</i>	1307	Nova Olinda, AM
<i>Mico mauesi</i>	1308	Nova Olinda, AM
<i>Mico rondoni</i>	3108	CPRJ
<i>Mico rondoni</i>	2465	Rio Jamari, RO
<i>Mico saterei</i>	1300	Nova Olinda, AM
<i>Mico saterei</i>	520	Nova Olinda, AM
<i>Mico saterei</i>	1293	Nova Olinda, AM
<i>Mico saterei</i>	524	Nova Olinda, AM
<i>Mico saterei</i>	1312	Nova Olinda, AM
<i>Mico humilis</i>	1	Nova Olinda, AM
<i>Mico chrysoleuca</i>	2614	CPRJ
<i>Cebuella pygmaea</i>	723	CPRJ
<i>Cebuella pygmaea</i>	724	CPRJ
<i>Cebuella pygmaea</i>	8	CENP
<i>Cebuella pygmaea</i>	KC757389	Genbank

CENP: Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, Pará; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro; INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; UNB: Universidade de Brasília.

3.3 Análises das sequências de DNA

As sequências de DNA foram alinhadas no BioEdit (Hall, 1999).

No MEGA 7.0 (Kumar et al., 2015) foi gerada uma matriz de divergências nucleotídicas P (sem correção).

Para a reconstrução filogenética foram usados três métodos, Agrupamento de Vizinhos, Parcimônia e Análise Bayesiana.

As árvores de Agrupamento de Vizinhos e Máxima Parcimônia foram obtidas no MEGA 7.0. Para a de Agrupamento de Vizinhos foi usado o modelo de Tamura-Nei, e em ambas foi usada a estatística de bootstrap como estimativa de apoio dos agrupamentos (Felsenstein, 1985).

A terceira abordagem foi a análise Bayesiana, e para tal usou-se programa Mr Bayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), com valores de probabilidade a posteriori nos nós da árvore, que é estatística de apoio dos arranjos neste método. O modelo evolutivo usado, estimado pelo Kakusan 4 foi HKY85+G (Tanabe, 2007)

O grupo externo nas análises filogenética foi a espécie *Callimico goeldii*, já demonstrada em estudos prévios ser basal em relação a *Mico*, *Cebuella* e *Callithrix* (Schneider & Sampaio, 2013).

4. RESULTADOS

O presente estudo usou uma base de dados de sequências de DNA contendo 990 pares de bases do gene mitocondrial CytB para avaliar as relações filogenéticas entre espécies de *Mico*, *Callithrix* e *Cebuella*. Foram incluídos na análise espécimes representando sete espécies de *Mico* (*M. argentata*, *M. chrysoleuca*, *M. humeralifer*, *M. mauesi*, *M. saterei*, *Mico humilis* e *M. rondoni*), cinco de *Callithrix* (*C. aurita*, *C. jacchus*, *C. geoffroyi*, *C. penicillata* e *C. kuhlli*) e uma de *Cebuella* (*C. pygmaea*).

4.1 Divergências nucleotídicas

As divergências nucleotídicas em *Mico* variaram de 0% a 6,8% (Figura 9). De um modo geral as divergências entre indivíduos da mesma espécie foram inferiores a 1%. Alguns pares de espécies, como *M. humeralifer* x *M. mauesi* e *M. saterei* x *M. mauesi* também apresentaram divergências inferiores a 1%. As divergências nucleotídicas mais elevadas foram entre *Mico humilis* e demais espécies de *Mico*, estas variando de 5,3% a 6,8%.

Em *Cebuella pygmaea*, com quatro indivíduos analisados, observou-se divergência nucleotídicas de 0,1%, de 1,6% e de 1,7%, mas também divergências variando de 6% a 8,5% entre os indivíduos dessa espécie (Figura 9).

No caso de *Callithrix*, as divergências entre indivíduos da mesma espécie foram inferiores a 1%, com exceção de *C. penicillata*, onde observou-se divergência de 2,3% entre os indivíduos. Já a divergência entre espécies diferentes variou de 1,3% (*C. penicillata* x *C. kuhlli*) a 8,6% (*C. aurita* x *C. penicillata*) (Figura 10).

A Figura 11 mostra os percentuais de divergências nucleotídicas entre espécies do grupo da Mata Atlântica (*Callithrix*) e as do grupo da Amazônia (*Mico* e *Cebuella*). No quadro marcado em cinza, no centro da figura, tem-se a divergência entre *Callithrix* e *Mico*, que variou de 10,2% a 11,4%. Na coluna 2, o destaque na cor creme mostra a divergência dentro de *Callithrix* (6,6% a 7,7%), e da mesma cor na linha 15 a divergência entre *Mico humilis* e demais espécies de *Mico* (5,3 a 6,2%). Essa comparação é importante pois será usada para discutir adiante a questão do status taxonômico da linhagem “*humilis*”.

Outras comparações em destaque na Figura 11 estão marcadas em azul, que representam as divergências nucleotídicas de *Cebuella* com *Mico* e *Callithrix*, e que variaram de 7,7% a 12,2%.

Na cor salmão, no triângulo à direita da figura, destaca-se a divergência nucleotídica dentro de *C. pygmaea*, que variou de 0,1% a 6,5%.

Figura 9. Percentual de divergências nucleotídicas (P), obtidas a partir de uma base de dados de seqüências de DNA do gene mitocondrial CytB com representantes de *Callimico goeldii*, espécies de *Mico* e *Cebuella pygmaea*. Os triângulos em cor representam as comparações entre indivíduos da mesma espécie.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1 <i>C. goeldii</i> KR528428																												
2 <i>M. chrysoleuca</i> 2614	15																											
3 <i>M. argentata</i> 21	15.7	4.4																										
4 <i>M. argentata</i> 49	15.4	4.6	0.3																									
5 <i>M. argentata</i> 98	15.7	4.4	0	0.3																								
6 <i>M. argentata</i> 518	15.5	4.5	0.1	0.1	0.1																							
7 <i>M. argentata</i> Aba	15.7	4.4	0	0.3	0	0.1																						
8 <i>M. argentata</i> Ca02	15.7	4.4	0	0.3	0	0.1	0																					
9 <i>M. argentata</i> Lb516	15.5	4.5	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0.1																				
10 <i>M. humeralifer</i> 802	15.3	2.1	3.6	3.9	3.6	3.7	3.6	3.6	3.7																			
11 <i>M. humeralifer</i> CTGAM211	15.3	2.1	3.6	3.9	3.6	3.7	3.6	3.6	3.7	0																		
12 <i>M. humeralifer</i> Ca18	15.3	2.1	3.9	4.1	3.9	4	3.9	3.9	4	0.3	0.3																	
13 <i>M. humeralifer</i> Ca16	15.3	2.1	3.6	3.9	3.6	3.7	3.6	3.6	3.7	0	0	0.3																
14 <i>M. mauesi</i> 2765	15.1	2.3	3.7	4	3.7	3.9	3.7	3.7	3.9	0.4	0.4	0.7	0.4															
15 <i>M. mauesi</i> 04	15.1	1.7	2.9	3.2	2.9	3.1	2.9	2.9	3.1	0.7	0.7	0.9	0.7	0.8														
16 <i>M. mauesi</i> 1307	15.1	1.7	2.9	3.2	2.9	3.1	2.9	2.9	3.1	0.7	0.7	0.9	0.7	0.8	0													
17 <i>M. mauesi</i> 1308	15.1	1.7	2.9	3.2	2.9	3.1	2.9	2.9	3.1	0.7	0.7	0.9	0.7	0.8	0	0												
18 <i>M. rondoni</i> 3108	14.9	2.4	3.3	3.3	3.3	3.5	3.3	3.3	3.5	2.1	2.1	2.4	2.1	2.3	1.7	1.7	1.7											
19 <i>M. rondoni</i> 2465	14.9	2.4	3.3	3.3	3.3	3.5	3.3	3.3	3.5	2.1	2.1	2.4	2.1	2.3	1.7	1.7	1.7	0										
20 <i>M. saterei</i> 1300	15.1	2.3	3.7	4	3.7	3.9	3.7	3.7	3.9	1.2	1.2	1.5	1.2	1.3	0.8	0.8	0.8	2	2									
21 <i>M. saterei</i> 520	15.1	1.7	2.9	3.2	2.9	3.1	2.9	2.9	3.1	0.7	0.7	0.9	0.7	0.8	0	0	0	1.7	1.7	0.8								
22 <i>M. saterei</i> 1293	15.1	2.3	3.7	4	3.7	3.9	3.7	3.7	3.9	1.2	1.2	1.5	1.2	1.3	0.8	0.8	0.8	2	2	0	0.8							
23 <i>M. saterei</i> 524	14.9	2.3	3.7	4	3.7	3.9	3.7	3.7	3.9	1.2	1.2	1.5	1.2	1.3	0.8	0.8	0.8	2	2	0.3	0.8	0.3						
24 <i>M. saterei</i> 1312	14.9	2.3	3.7	4	3.7	3.9	3.7	3.7	3.9	1.2	1.2	1.5	1.2	1.3	0.8	0.8	0.8	2	2	0.3	0.8	0.3	0					
25 <i>M. humilis</i> 1	14.2	5.8	6.8	6.5	6.8	6.6	6.8	6.8	6.6	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7	5.7	5.7	5.7	5.3	5.3	6.2	5.7	6.2	6.2	6.2				
26 <i>C. pygmaea</i> 723	14.6	8.9	9.3	9.3	9.3	9.4	9.3	9.3	9.4	9	9	9	9	8.9	8.8	8.8	8.8	9.2	9.2	9.3	8.8	9.3	9	9	8.4			
27 <i>C. pygmaea</i> 724	14.7	8.8	9.2	9.2	9.2	9.3	9.2	9.2	9.3	8.9	8.9	8.9	8.9	8.8	8.6	8.6	8.6	9	9	9.2	8.6	9.2	8.9	8.9	8.5	0.1		
28 <i>C. pygmaea</i> 8	14.6	8.9	9.2	8.9	9.2	9	9.2	9.2	9	8.8	8.8	8.8	8.8	8.6	8.5	8.5	8.5	8.9	8.9	9.3	8.5	9.3	9.3	9.3	7.7	6.5	6.6	
29 <i>C. pygmaea</i> KC757389	14.7	8.5	9	8.8	9	8.9	9	9	8.9	8.6	8.6	8.6	8.6	8.5	8.4	8.4	8.4	8.8	8.8	8.9	8.4	8.9	8.6	8.6	8.1	1.6	1.7	6

Figura 10. Percentual de divergências nucleotídicas (P), obtidas a partir de uma base de dados de seqüências de DNA do gene mitocondrial CytB com representantes de *Callimico goeldii* e espécies de *Callithrix*. Os triângulos em cor representam as comparações entre indivíduos da mesma espécie.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26
1	<i>C. goeldii</i> KR528428																									
2	<i>C. aurita</i> 3001	16.7																								
3	<i>C. aurita</i> 2161	16.5	0.2																							
4	<i>C. aurita</i> 2936	16.5	0.2	0																						
5	<i>C. jacchus</i> AB572419	15.7	8.4	8.2	8.2																					
6	<i>C. jacchus</i> KM588314	15.7	8.4	8.2	8.2	0																				
7	<i>C. jacchus</i> AF295586	15.7	8.4	8.2	8.2	0	0																			
8	<i>C. jacchus</i> 33	15.7	8.4	8.2	8.2	0	0	0																		
9	<i>C. jacchus</i> 43	15.7	8.4	8.2	8.2	0	0	0	0																	
10	<i>C. geoffroyi</i> KC757388	16.6	7.6	7.5	7.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6																
11	<i>C. geoffroyi</i> HM368005	16.6	7.6	7.5	7.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	0															
12	<i>C. geoffroyi</i> 88	16.5	7.6	7.5	7.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	0.4	0.4														
13	<i>C. geoffroyi</i> 442	16.7	7.7	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	0.6	0.6	0.4													
14	<i>C. geoffroyi</i> 630	16.7	7.7	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	0.6	0.6	0.4	0												
15	<i>C. geoffroyi</i> 956	16.5	7.8	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	0.6	0.6	0.4	0.7	0.7											
16	<i>C. geoffroyi</i> 1004	16.5	7.8	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	0.6	0.6	0.4	0.7	0.7	0										
17	<i>C. geoffroyi</i> 5062	16.5	7.6	7.5	7.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	0.4	0.4	0	0.4	0.4	0.4	0.4									
18	<i>C. penicillata</i> 5056	15.9	8.6	8.5	8.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8	2.4	2.4	2.7								
19	<i>C. penicillata</i> 5057	15.9	8.6	8.5	8.5	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.7	2.7	2.7	2.8	2.8	2.4	2.4	2.7	0							
20	<i>C. penicillata</i> 5058	16	8	7.8	7.8	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.3	2.6	2.6	2.2	2.2	2.3	2.3	2.3						
21	<i>C. penicillata</i> 5060	16	8	7.8	7.8	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.3	2.6	2.6	2.2	2.2	2.3	2.3	2.3	0					
23	<i>C. kuhlli</i> 714	16.3	7.7	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.3	2.6	2.6	2.2	2.2	2.3	2.5	2.5	1.3	1.3				
24	<i>C. kuhlli</i> 812	16.4	7.8	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.4	2.4	2.2	2.5	2.5	2.2	2.2	2.2	2.6	2.6	1.3	1.3	0.1			
25	<i>C. kuhlli</i> 1093	16.3	7.7	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.3	2.6	2.6	2.2	2.2	2.3	2.5	2.5	1.3	1.3	0	0.1		
26	<i>C. kuhlli</i> 1143	16.3	7.7	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.3	2.6	2.6	2.2	2.2	2.3	2.5	2.5	1.3	1.3	0	0.1	0	
27	<i>C. kuhlli</i> 1063	16.3	7.7	7.6	7.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.3	2.6	2.6	2.2	2.2	2.3	2.5	2.5	1.3	1.3	0	0.1	0	0

Figura 11. Percentual de divergências nucleotídicas (P), obtidas a partir de uma base de dados de seqüências de DNA do gene mitocondrial CytB com representantes de *Callimico goeldii*, *Mico*, *Callithrix* e *Cebuella*. Os triângulos em cor representam as comparações entre indivíduos da mesma espécie.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	<i>Callimico goeldii</i> KC592391																		
2	<i>Callithrix aurita</i> 2161	15.8																	
3	<i>Callithrix jacchus</i> 43	14.6	7.6																
4	<i>Callithrix geoffroyi</i> 5062	15	6.8	2.1															
5	<i>Callithrix penicillata</i> 5056	14.9	7.7	1.7	2														
6	<i>Callithrix penicillata</i> 5058	15	7	2.1	1.3	2													
7	<i>Callithrix kuhlli</i> 1063	15.3	6.6	2	1.2	1.9	0.9												
8	<i>Mico chrysoleuca</i> 2614	15	11.2	10.6	10.4	10.5	10.6	10.2											
9	<i>Mico argentata</i> Lb516	15.5	11.6	10.9	10.6	11	11	10.5	4.5										
10	<i>Mico humeralifer</i> CTGAM211	15.3	10.9	10.9	10.6	11.3	10.6	10.2	2.1	3.7									
11	<i>Mico mauesi</i> 2765	15.1	11	11	10.8	11.4	11	10.6	2.3	3.9	0.4								
12	<i>Mico rondoni</i> 3108	14.9	10.4	10.6	10.1	10.5	10.4	10.2	2.4	3.5	2.1	2.3							
13	<i>Mico saterei</i> 1300	15.1	11.3	11	10.8	11.2	10.8	10.6	2.3	3.9	1.2	1.3	2						
14	<i>Mico saterei</i> 1312	14.9	11.3	10.8	10.8	11.2	10.8	10.6	2.3	3.9	1.2	1.3	2	0.3					
15	<i>Mico humilis</i> 1	14.2	10.1	9.4	9.2	9.6	9.2	8.9	5.8	6.6	5.8	5.7	5.3	6.2	6.2				
16	<i>Cebuella pygmaea</i> 723	14.6	12	10.8	10.8	11.7	11.3	10.8	8.9	9.4	9	8.9	9.2	9.3	9	8.4			
17	<i>Cebuella pygmaea</i> 724	14.7	12.1	10.6	10.6	11.6	11.2	10.6	8.8	9.3	8.9	8.8	9	9.2	8.9	8.5	0.1		
18	<i>Cebuella pygmaea</i> 8	14.6	11.3	10.2	10	10.4	10.2	9.6	8.9	9	8.8	8.6	8.9	9.3	9.3	7.7	6.5	6.6	
19	<i>Cebuella pygmaea</i> KC757389	14.7	11.3	10.5	11	11.4	11	10.4	8.5	8.9	8.6	8.5	8.8	8.9	8.6	8.1	1.6	1.7	6

4.2 Relações filogenéticas

As filogenias moleculares geradas por três métodos diferentes são congruentes em recuperar o monofiletismo de vários agrupamentos. É o caso da clara separação entre os micos da Amazônia dos micos da Mata Atlântica. O monofiletismo de *Callithrix* é apoiado por 100% de bootstrap na árvore de Agrupamento de Vizinhos, 99% na de Máxima Parcimônia, e 100% na árvore de Inferência Bayesiana.

O monofiletismo de *Mico* incluindo *M. humilis* tem de 100% de apoio na árvore de Mr Bayes, 94% na árvore de Agrupamento de Vizinhos e 73% na árvore de Máxima Parcimônia. Por sua vez, o grupo reunindo as outras seis espécies de *Mico* (*M. argentata*, *M. chrysoleuca*, *M. rondoni*, *M. saterei*, *M. mauesi* e *M. humeralifer*) tem apoio de 100% em Agrupamento de Vizinhos e Inferência Bayesiana, e 99% em Máxima Parcimônia. Esta configuração filogenética posiciona *Cebuella pygmaea* como a linhagem mais externa deste clado amazônico.

A maioria das espécies, tanto em *Mico* quanto em *Callithrix*, mostrou homogeneidade em seus agrupamentos, com todos os indivíduos em um ramo significativamente apoiado (apoio maior que 95%), mas algumas exceções foram evidentes: 1) o exemplar de *M. saterei* 520 agrupou no ramo de *M. mauesi*; 2) o exemplar de *M. mauesi* 2765 agrupou com os exemplares de *M. humeralifer*; 3) os exemplares de *C. penicillata* 5056 e 5057 agruparam como linhagens irmãs de *C. jacchus*, enquanto os outros dois espécimes (5058 e 5060) se posicionaram próximos a *C. kuhlli*; 4) o espécime *C. kuhlli* 484 não agrupou com os demais da espécie. Essas incongruências filogenéticas foram comuns nas três árvores.

No gênero *Callithrix* destaca-se o posicionamento basal de *C. aurita* em reação às demais espécies, topologia apoiada por 100% nos três métodos usados.

A similaridade do padrão filogenético tanto em *Mico* como em *Callithrix* é que, com exceção de *Mico humilis* e *C. aurita*, claramente as linhagens basais de cada gênero, o relacionamento entre as demais espécies é uma grande politomia não resolvida.

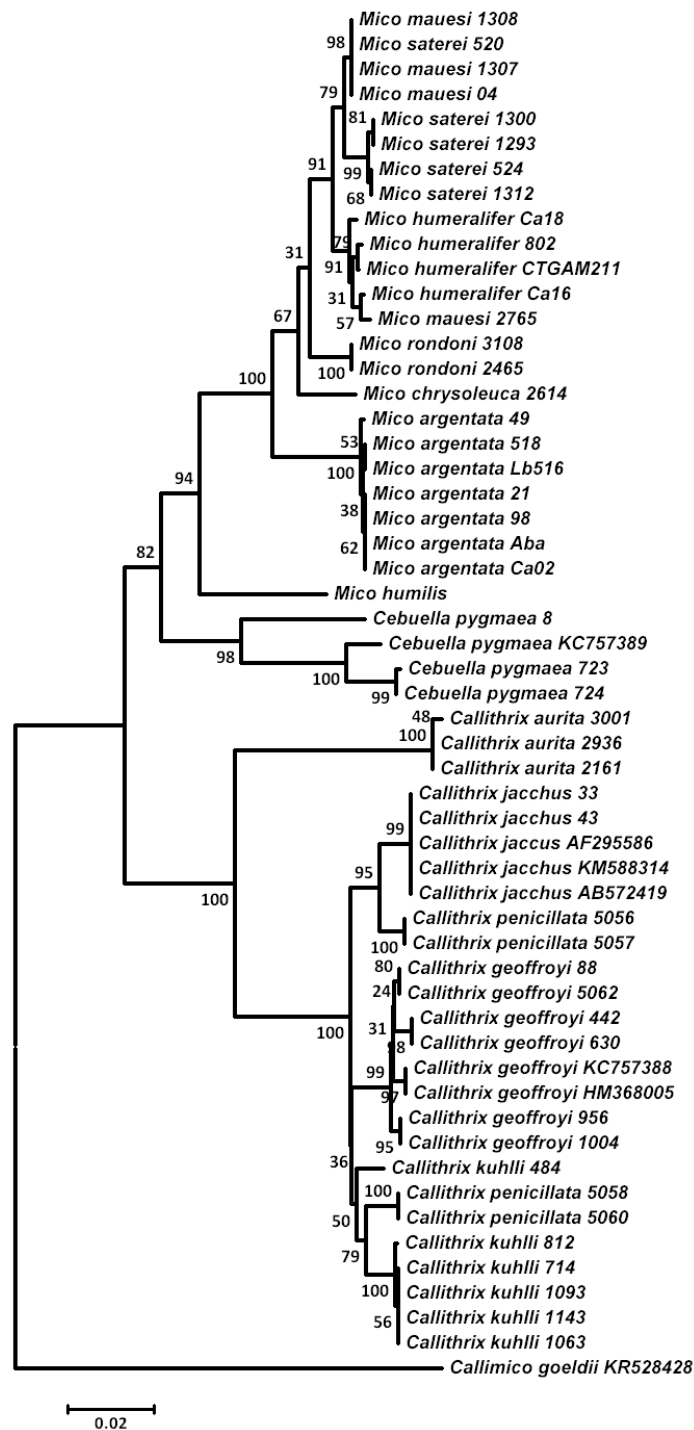


Figura 12. Árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos, construída no MEGA 7.0 a partir de uma base de dados de 960 pares de bases do gene mitocondrial CytB. Os números nos nós são valores de Bootstrap com 1000 pseudoréplicas.

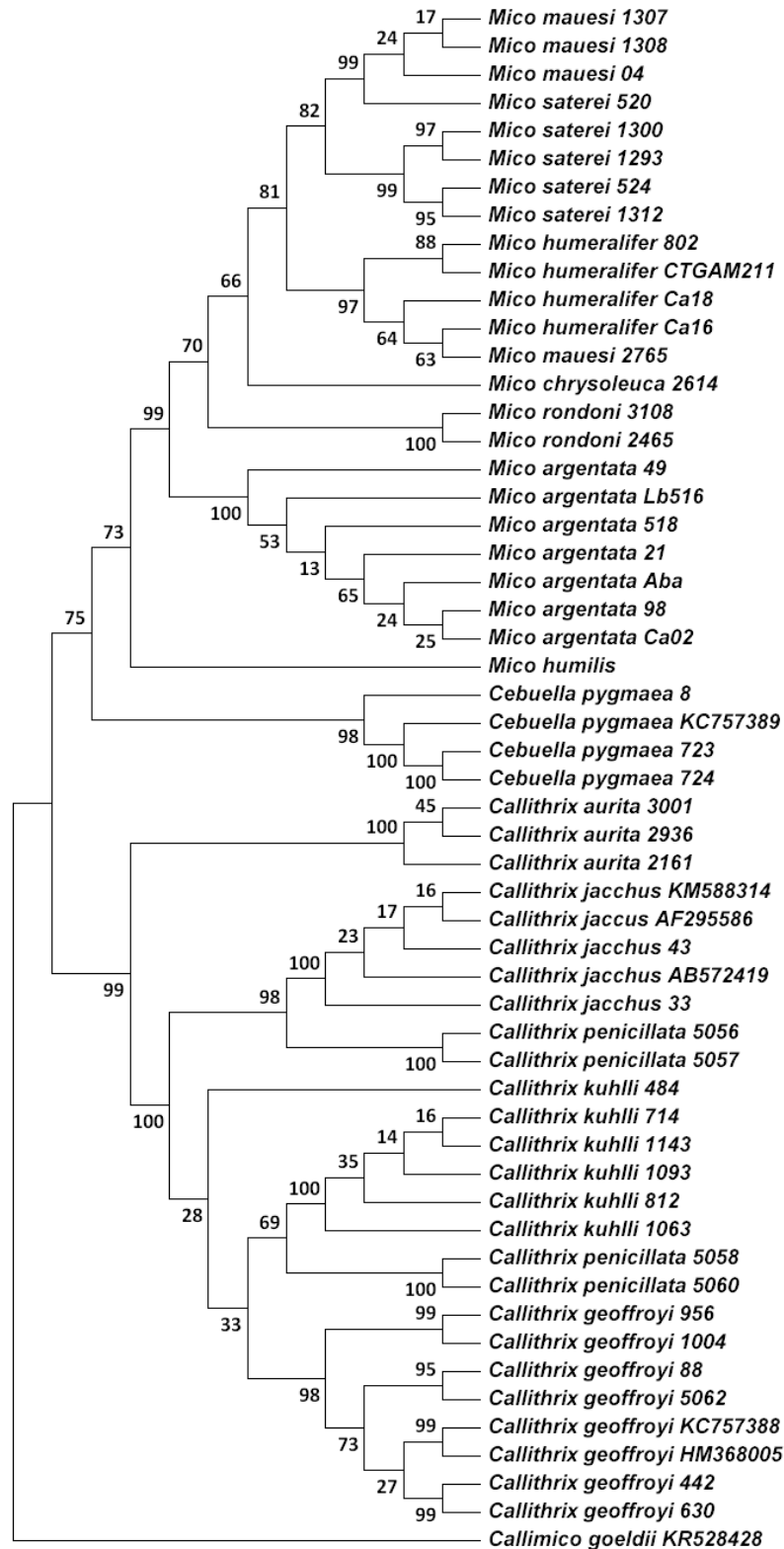


Figura 13. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia, construída no MEGA 7.0 a partir de uma base de dados de 960 pares de bases do gene mitocondrial CytB. Os números nos nós são valores de Bootstrap com 1000 pseudoréplicas.

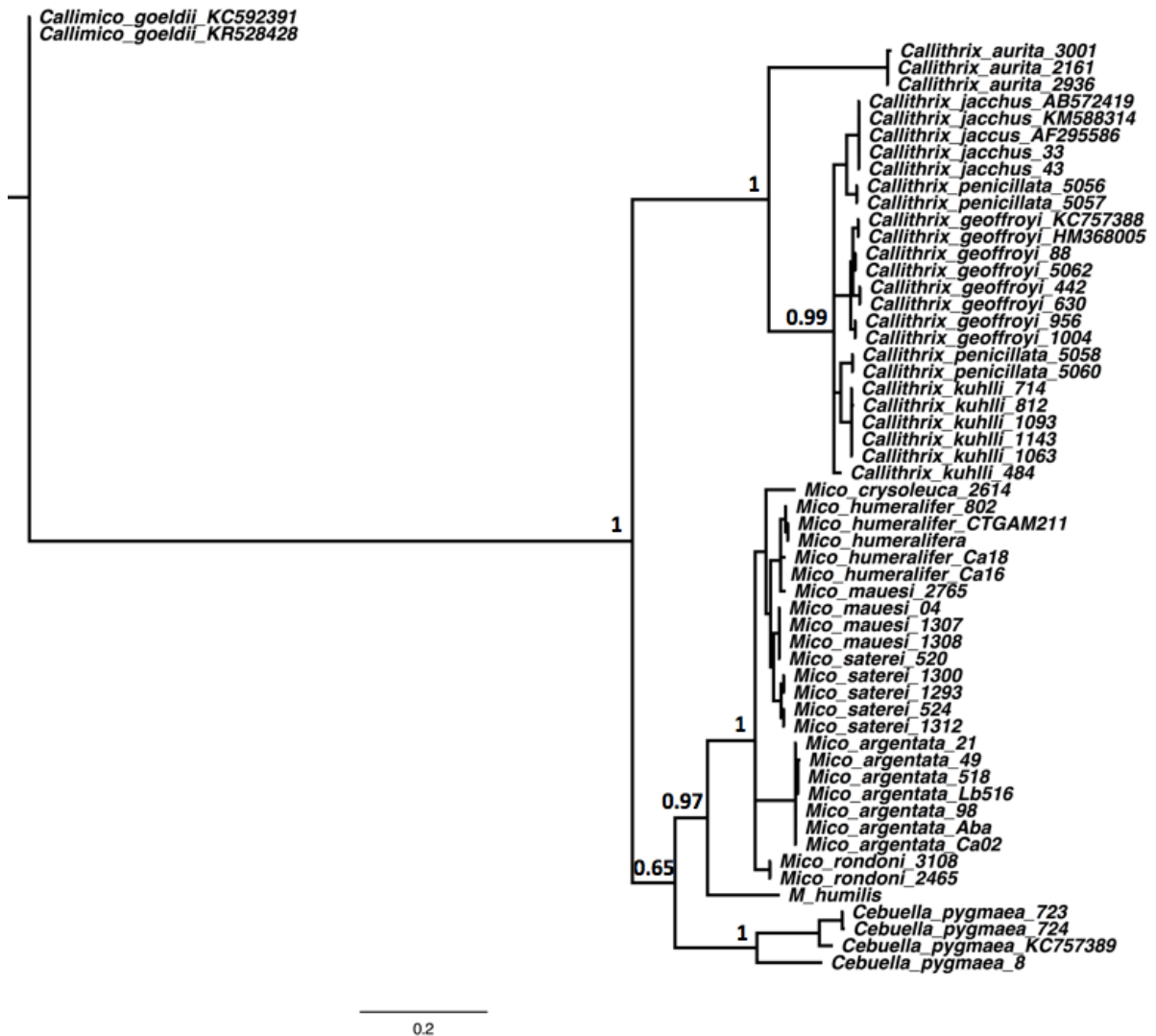


Figura 14. Árvore filogenética de Inferência Bayesiana, construída no Mr Bayes a partir de uma base de dados de 960 pares de bases do gene mitocondrial CytB. Os números nos nós são valores de Probabilidade a Posteriori.

5. DISCUSSÃO

5.1 O padrão de diversificação em *Mico* e *Callithrix*

As árvores filogenéticas obtidas no presente estudo, a partir de sequências de DNA do gene mitocondrial CytB revelam um padrão de diversificação muito similar para *Mico*, na Amazônia e *Callithrix*, na Mata Atlântica. Os dados, tanto do padrão de ramificação das árvores como pelas divergências par-a-par, mostram uma primeira radiação originando simultaneamente *Mico humilis* (Amazônia) e *Callithrix aurita* (Mata Atlântica). Estas duas espécies são bem diferentes geneticamente do grupo resultante de uma segunda radiação que originou as demais espécies em cada grupo. A árvore de Agrupamento de Vizinhos (Figura 12), que é baseada em divergências genéticas, mostra bem que a emergência de *M. humilis* e de *C. aurita* ocorrem praticamente num mesmo momento. Por exemplo, as divergências de *M. humilis* em relação às outras espécies de *Mico* variam 5,3% a 6,6%, e as de *Callithrix aurita* em relação às demais espécies de *Callithrix* variam entre 6,6% e 7,7%, ou seja, bastante similares.

Os dados moleculares mostram uma segunda radiação, bem mais recente, que originou as demais espécies representadas neste estudo, no caso *M. argentata*, *M. chrysoleuca*, *M. rondoni*, *M. humeralifer*, *M. mauesi* e *M. saterei*, estas do clado amazônico, e *C. jacchus*, *C. geoffroyi*, *C. penicillata* e *C. kuhlli*, do clado da Mata Atlântica.

As relações interespecíficas nesses dois grupos da radiação mais recente não puderam ser elucidadas na presente análise. As topologias são politômicas, sugerindo um padrão de radiação explosiva em ambos os biomas.

Os estudos filogenéticos prévios possuem pouca representatividade de táxons, de forma que, com exceção da posição basal de *C. aurita* no grupo da Mata Atlântica, nada está elucidado ainda na taxonomia de *Mico* e *Callithrix*.

Tagliaro et al (1997) realizaram a primeira filogenia molecular em nível interespecífico em *Callithrix*, usando sequências da Região Controle mitocondrial. Nas topologias geradas, *C. aurita* revelou-se basal no clado da Mata Atlântica, mas todos os outros arranjos com as espécies desse grupo foram fracamente apoiados. No grupo da Amazônia, *M. mauesi* mostrou-se estreitamente relacionado a *M. humeralifer*, mas apenas três espécies (*M. mauesi*, *M. argentata* e *M. humeralifer*) estiveram representadas no estudo. Van Roosmalen & Van Roosmalen recuperaram topologia similar a de Tagliaro et al para *Callithrix* da Mata Atlântica (politomia), e para a Amazônia *C. mauesi* agrupou fortemente com *C. humeralifer*, acrescentando na base de dados da Região Controle a espécie *C. manicorensis* além das estudadas no estudo anterior.

Schneider et al (2011), avaliou as relações filogenéticas de *Mico* e *Callithrix* usando também a Região Controle mitocondrial e dados nucleares, recuperaram no clado *Mico* um arranjo fortemente apoiado de *M. humeralifer*, *M. mauesi* e *M. saterei*, tendo *M. argentata* como grupo irmão e *M. humilis* como a linhagem mais basal de *Mico*. No grupo da Mata Atlântica ficou confirmada somente a posição basal de *C. aurita*, e os demais relacionamentos foram politômicos. Um cenário similar foi obtido com os dados nucleares.

Um achado interessante em todos os estudos acima citados, e também registrado na presente análise, foi o parafiletismo de algumas espécies, tanto em *Mico* como em *Callithrix*. É o caso de indivíduos de *M. mauesi* agrupando com *M. humeralifer* e também *M. saterei* no ramo de *M. mauesi*. Em *Callithrix*, observou-se indivíduos de *C. penicillata*

divididos em dois grupos distintos, um proximamente relacionado a *C. jacchus* e outro como uma linhagem independente próxima a *C. kuhlli*. Também não foi possível recuperar o monofiletismo de *C. kuhlli*. É importante mencionar que os espécimes de *Mico* envolvidos no parafiletismo são os mesmos dos estudos de Tagliaro et al (1997), Van Roosmalen & Van Roosmalen (2003) e na presente análise.

O parafiletismo observado neste e em estudos prévios pode ser consequência de hibridização natural nestas espécies. No caso do clado amazônico, *M. saterei*, *M. mauesi* e *M. humeralifer* tem distribuição contígua, com zonas de contato (ver Figura 7), o que certamente pode favorecer a hibridização natural entre estas espécies. É importante mencionar ainda que estas espécies são geneticamente muito similares, com divergências nucleotídicas inferiores a 1,5%, indicando pouco tempo de separação após a diversificação. No caso do clado atlântico, *C. penicillata*, a espécie que mostra claro parafiletismo, é a que apresenta a distribuição geográfica mais ampla e com zonas de contato com todas as outras espécies do gênero. Portanto, hibridização na natureza é bastante provável entre essas espécies, que só apresentam divergências genéticas da ordem de 3% para CytB, ou seja, são espécies muito recentes, que ainda não atingiram a quantidade de diferenças genéticas necessárias para garantir um isolamento reprodutivo eficiente.

Alguns autores têm relatado hibridização entre espécies de *Callithrix*, como Nogueira et al (2011), que estudaram o cariótipo de híbridos de *C. aurita* com *C. jacchus* ou *C. penicillata*. Silva (2014) realizou um amplo levantamento da ocorrência de híbridos de *Callithrix* no estado de Minas Gerais, tendo registrado muitos híbridos de espécies nativas com as invasoras *C. jacchus* e *C. penicillata*.

5.2 O status taxonômico da linhagem “*humilis*”

Os dados da presente análise mostram *Cebuella pygmaea* como a linhagem mais basal do clado amazônico, e *Mico humilis* como a espécie irmã de todas as demais do gênero *Mico*, arranjo este observado em todas as árvores. Este posicionamento é apoiado por 97% na análise de Inferência bayesiana, 94% na árvore de Agrupamento de Vizinhos, e 73% na árvore de Parcimônia. Estes dados, subsidiados pela topologia das árvores envolvendo as espécies de *Callithrix*, e pelas divergências nucleotídicas par-a-par, apoiam fortemente a nossa proposta de que “*humilis*” deva permanecer como espécie de *Mico* e não como espécie de *Callibella*, como previamente proposto na literatura.

A linhagem “*humilis*” foi apresentada ao mundo pela primeira vez no final da década de 1990, como *Callithrix humilis*, por Van Roosmalen *et al.* (1998). É importante lembrar que antes de 2000 os pequenos micos da Amazônia e da Mata Atlântica eram classificados como espécies pertencentes ao gênero *Callithrix*, do grupo “*argentata*” (Amazônia) e do grupo “*jacchus*” (Mata Atlântica) (Hershkovitz, 1977). Esta nova forma de *Callithrix* descoberta por Van Roosmalen apresentava um porte pequeno, algo intermediário entre o pigmeu *Cebuella* e as outras espécies de *Callithrix* da região. Segundo Van Roosmalen, a distribuição geográfica de *Callithrix humilis* era muito pequena, encravada entre os rios Madeira e Aripuanã. A descrição de *Callithrix humilis* foi feita somente com base em características morfológicas.

Em 2003 Van Roosmalen e Van Roosmalen propuseram a mudança do status de *Callithrix humilis*, elevando-o ao nível de gênero, propondo assim um gênero novo para a Amazônia, denominado de *Callibella*. Esta proposta de revisão taxonômica foi baseada em uma análise realizada pelos autores a partir de uma filogenia molecular com sequências de DNA da Região Controle mitocondrial, em que *Callithrix humilis* agrupava

externamente ao agrupamento de *Cebuella* com as demais espécies de *Callithrix* da Amazônia (ver Figura 5).

O novo gênero, *Callibella*, foi bem aceito pela comunidade científica. Na revisão publicada por Rylands *et al.* (2000) este táxon é listado como *Callibella humilis*. Ford e Davis (2009), baseados em morfologia e análises do esqueleto pós-craniano, concluíram que *Callibella* é morfologicamente diferente dos outros calitriquíneos.

A problemática taxonômica envolvendo a linhagem “*humilis*” foi retomada por Schneider *et al.* (2012), que reanalisaram a mesma base dados usada por Van Roosmalen & Van Roosmalen (2003), acrescentando algumas sequências novas da Região Controle mitocondrial e uma base de dados adicional de sequências de DNA nuclear de inserções Alu. Estes autores demonstraram que, tanto na análise com DNA mitocondrial como na de dados nucleares, a linhagem “*humilis*” agrupava com as espécies de *Mico* e não externamente a *Cebuella* como haviam mostrado Van Roosmalen & Van Roosmalen (2003). Com base em altos valores de apoio estatístico das duas árvores (mitocondrial e nuclear), Schneider *et al* recomendaram o retorno de “*humilis*” ao status de espécie de *Mico*, como originalmente descrito por Van Roosmalen *et al.* (1998).

Garbino (2013), a partir de análises puramente morfológicas, mostrou a existência de um grupo monofilético entre *Cebuella* e *Mico*, com *Callibella* se posicionando dentro de *Mico*. A partir dessa análise, Garbino refere-se a “*humilis*” como *Mico humilis*, discordando de trabalhos anteriores com o de Ford e Davis (2009).

O fato de *Mico humilis* ser a espécie mais basal do gênero, e bastante divergente das demais, poderia suscitar novamente o questionamento de “por que não o considerar como gênero diferente”? De fato, se a árvore filogenética for analisada somente com *Mico* e *Cebuella*, não há nenhuma incoerência em deixar *Callibella* com seu status genérico,

pois teríamos *Cebuella* como o gênero mais basal, *Callibella* como a segunda linhagem a diversificar, e finalmente *Mico* como outro gênero, monofilético, irmão de *Callibella*.

Para reforçar nossa tese de que “*humilis*” pertence a *Mico* e não a *Callibella*, analisamos as divergências nucleotídicas de CytB tanto no clado *Mico* como em *Callithrix*, e verificamos que a divergência de “*humilis*” em relação às espécies de *Mico* é menor (5,3% a 6,6%) do que de *Callithrix aurita* em relação às demais espécies de *Callithrix* (6,6% a 7,7%). Estes dados consolidam a nossa proposta de manter “*humilis*” como espécie de *Mico*. Caso contrário, a taxonomia de *Callithrix aurita* deveria ser revista, passando esta a um status de gênero novo na Mata Atlântica.

Embora havendo esta possibilidade de se criar novos gêneros com base em filogenia molecular combinada com níveis de divergências nucleotídicas, é importante observar os relatos da literatura sobre a ocorrência de hibridização natural, principalmente entre espécies de *Callithrix*. O estudo de Silva et al. (2014) explora esta questão, descrevendo grande quantidade de registros de híbridos no estado de Minas Gerais. Temos também o estudo de Nogueira et al (2011) que confirmou por análise cromossômica a ocorrência natural de híbridos de *C. aurita* com *C. jacchus* ou *C. penicillata*. Portanto, talvez seja inapropriado elevar ao status de gênero uma espécie que cruza naturalmente com outra espécie no ambiente natural.

É importante destacar que conclusões similares foram levantadas por Schneider et al. (2012) com marcadores moleculares diferentes dos aqui utilizados.

5.3 O status taxonômico de *Cebuella* e sua diversidade intraespecífica

Cebuella pygmaea, o menor platirrino conhecido tem sido considerado como abrigando uma única espécie, *C. pygmaea*. A descoberta de novas áreas de ocorrência e exames mais detalhados sobre a sua morfologia, tem subsidiado a proposta de existência

de duas subespécies, *C. p. pygmaea* e *C. p. niveiventris* (Van Roosmalen e Van Roosmalen (1997), separadas pelo Rio Solimões. *Cebuella p. pygmaea* ocorre na bacia do alto Amazonas, ao norte do Rio Solimões no Brasil, a oeste do Rio Japurá e ao sul do Rio Caquetá, na Colômbia, Equador e Peru, tendo como limite leste da distribuição o Rio Japurá. Por sua vez, *C. p. niveiventris* ocorre ao sul do Rio Solimões-Amazonas-Marañon a leste do Baixo Rio Huallaga e acima do rio Ucayali. Foi registrada no Peru, a leste dos rios Mayo e Huallaga, e se estendendo para leste e norte da Bolívia até a região de Cobija (Aquino & Encarnación, 1994).

Sobre a posição de *Cebuella* em relação aos demais platirrinos, Natori (1994), em um estudo de fenologia, sugeriu pela primeira vez que *Cebuella* era um táxon mais próximo dos saguis da Amazônia.

Barroso et al. (1997), em um trabalho utilizando sequencias de DNA do gene IRBP, confirmou a estreita relação de *Cebuella pygmaea* com as espécies de *Callithrix* do grupo “argentata”, os da Amazônia. Com base nisso, os autores propuseram sua incorporação ao gênero *Callithrix*, passando a denomina-la de *Callithrix pygmaea*.

As filogenias moleculares obtidas por Tagliaro *et al.* (1997), com dados mitocondriais, e de Chaves et al. (1999), com dados nucleares, confirmaram a maior proximidade de *Cebuella* com os micos da Amazônia.

Foi então que Rylands et al 2000 reacenderam a discussão sobre o status taxonômico de *Cebuella*. Defendendo que por ser um primata com características morfológicas peculiares, este merecia recuperar o seu status genérico. Entretanto, entendendo também a necessidade de manter a coerência entre os arranjos filogenéticos e classificações taxonômicas, esses autores propuseram o seguinte arranjo conciliador: *Cebuella* seria mantido como gênero, os calitriquíneos amazônicos seriam acomodados

em um novo gênero, *Mico*, e os da Mata Atlântica permaneceriam no gênero *Callithrix*. Esta proposta tem sido aceita até os dias atuais.

Os dados do presente estudo mostram que filogeneticamente *Cebuella* é a linhagem mais basal dos micos amazônicos. E analisando sob esta ótica do arranjo filogenético, não é possível negar a *Cebuella* o seu status genérico.

Mas é interessante ressaltar que os dados de divergência nucleotídica (ver Figura 11), não deixam *Cebuella* muito “confortável” nessa posição de gênero distinto. É possível ver que a divergência de *Cebuella* para *Mico* varia de 7,7% a 8,9%, de *Cebuella* para *Callithrix* de 9,6% a 12,1%, e de *Mico* para *Callithrix* de 10,2% a 11,4%, ou seja, *Cebuella* é geneticamente mais similar a *Mico* do que *Mico* é a *Callithrix*. Estes achados, se confirmados com análises adicionais com outros marcadores, podem trazer de volta esta importante questão sobre o status genérico de *Cebuella*.

Finalmente chama a atenção o fato de que altos valores de divergência nucleotídica foram observados entre os indivíduos de *C. pygmaea*. Enquanto espécimes mostram divergência de 0,1% e 1,7%, valores que podem ser considerados para comparações intraespecíficas, outros apresentam divergências variando de 6 a 6,6% (Figura 11), que são muito maiores que as comparações de vários pares de espécies tanto em *Mico* como em *Callithrix*. Os espécimes 723 e 724 são oriundos da margem direita do Japurá, área de ocorrência de *C. p. pygmaea*. Os outros dois espécimes são amostras de cativeiro e sem a procedência real conhecida. Mas os dados obtidos sugerem que podem pertencer talvez a *C. p. niveiventris*. O fato é que, estamos diante de duas formas genéticas de *Cebuella*, com níveis de divergência nucleotídica compatíveis com o status de espécies diferentes. Portanto, sugere-se estudos adicionais com amostras de procedência conhecida, para confirmar esta tese de que *Cebuella* pode conter mais do que uma espécie.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste estudo são:

- 1) Os gêneros *Mico* e *Callithrix* são monofilético;
- 2) *Cebuella pygmaea* é a linhagem mais basal dos pequenos calitriquíneos amazônicos;
- 3) A linhagem “*humilis*” deve ser considerada uma espécie do gênero *Mico* e não um gênero novo;
- 4) *Mico humilis* e *Callithrix aurita* são as linhagens basais de seus respectivos gêneros, e surgiram em um tempo evolutivo bem similar;
- 5) A topologia em formato de estrela sugere que a radiação que originou as espécies mais novas tanto de *Mico* como em *Callithrix* parece ter sido um evento explosivo.
- 6) O compartilhamento de haplótipos entre espécies sugere contato secundário e hibridização. Isso parece ter ocorrido com *Mico mauesi*, *M. saterei*, *M. humeralifer*, na Amazônia, e com *Callithrix penicillata* e *C. kuhlli*, na Mata Atlântica;
- 7) *Cebuella pygmaea* apresenta divergências nucleotídicas com *Mico* e *Callithrix* da mesma ordem de magnitude que entre *Mico* e *Callithrix*, o que pode colocar em dúvida o seu status de gênero diferente;
- 8) *Cebuella* parece abrigar mais de uma espécie, isto indicado pelas elevadas divergências nucleotídicas entre os espécimes deste táxon.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPERIN. *Callithrix argentata* (Lineus, 1977): Considerações taxonômicas e descrição de uma subespécie nova. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, Série Zoologia**, v. 9 (2), p. 317–328, 1993.
- AQUINO, R.; ENCARNACION, F. Primates of Peru/Los Primates del Perú. **Primate Report**, v. 40, p. 1 – 127, 1994.
- BARROSO, C. M. L. Filogenia Molecular da Subfamília Callitrichinae sensu Rosenberger. **Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará**. 1995.
- BARROSO, C.M.L., SCHNEIDER, H., SCHNEIDER, M.P.C., SAMPAIO, I., HARADA, M.L., 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.
- CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”**, v. 4 (1), n. 1–307, 1957.
- CANAVEZ, C. et al. Phylogenetic relationships of the Callitrichinae (Platyrrhini, Primates) based on β 2-microglobulin DNA sequences. **American Journal of Primatology**, v. 48, p. 225–236, 1999.
- CHAVES, R. et al. The place of *Callimico goeldii* in the Callitrichine Phylogenetic tree: evidence from von Willebrand factor gene intron 2 sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 13, p. 392–404, 1999.
- DOLLMAN, G. (1933). *Primates, Series 3*. **British Museum** (Natural History), London.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.

- Evolution**, v. 39, p. 783–791, 1985.
- FERRARI, S. F. et al. Rondon's marmoset, *Mico rondoni* sp. n., from southwestern Brazilian Amazonia. **International Journal of Primatology**, v. 31, n. 693-714, 2010.
- FERRARI, S. F.; LOPES, M. A. A new species of marmoset, genus *Callithrix* Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates) from western Brazilian Amazonia. **Goeldiana Zoologia**, v. 12, n. 1-3, 1992.
- FORD, S. M. Systematics of the New World Monkeys In Comparative primate biology. **Systematics, evolution and anatomy (Dr Swindler e J Erwin Eds)**, v. 1, p. 73–135, 1986.
- GEOFFROY SAINT-HILAIRE, 1812. Tableau des quadrumanes ou des animaux compris le premier ordre de la classe des mammifères. **Annales Du Muséum D'Histoire Naturelle Paris** 19:85-112.
- GOODMAN, M. et al. Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 9, n. 585–598, 1998.
- GROVES, C. P. Why Taxonomy stability is a bad idea, or why are there so few species of primates (or are there?). **Evolutionary Anthropology**, v. 10, p. 192–198, 2001.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HERSHKOVITZ, P. Living New World Monkeys, part 1 (Platyrrhini). **Chicago University Press**, v. 1, p. 1–17, 1977.
- HILL, W. C. O. Primates – Comparative Anatomy and Taxonomy, III, Pithecoidea, Platyrrhini (Families Hapalidae and Callimiconidae). **Edinburgh University**

Press, Edinburgh, 1957.

KAY, R. F. The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthropeidea). **J. Human Evolution**, v. 19, p. 175–208, 1990.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33(7), p. 1870–1874, 2016.

MEIRELES, C. M. M. et al. Molecular Phylogeny of Ateline New World Monkeys (Platyrrhini, Atelinae) based on γ -globin gene sequences: evidence that *Brachyteles* is the sister group of *Lagothrix*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, p. 10–30, 1999.

MITTERMEIER, R. A.; SCHWAR, M.; AYRES, J. M. A new species of marmoset, genus *Callithrix* Erxleben 1777 (Callitrichidae, Primates), from the Rio Maués region, state of Amazonas, Central Brazilian Amazonia. **Goeldiana Zoologia**, v. 14, p. 1–17, 1992.

NAPIER, J.; NAPIER, P. A Handbook of Living Primates. **Academic Press**, 1967.

NOGUEIRA, D. M. et al. Cytogenetic study in natural hybrids of *Callithrix* (Callitrichidae: Primates) in the Atlantic forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, 101(3): 156-160, 2011.

PASTORINI, J. et al. A reexamination of the phylogenetic position of *Callimico* (Primates) incorporating new mitochondrial DNA sequence data. **J. Mol. Evol**, v. 47, p. 32–41, 1998.

PORTER, C. A. et al. Phylogeny and Evolution of Selected Primates as Determined by Sequences of the epsilon-globin locus and 5' flanking regions. **International Journal of Primatology**, v. 18, p. 261–295, 1997.

PORTER, C. A. et al.). Sequences from the 5' flanking region of the epsilon-globin gene

- support the relationship of Callicebus with the Pitheciins. **American Journal of Primatology**, v. 48, p. 69–75, 1999.
- ROSENBERGER, A. L. Systematics: the higher taxa. In: Ecology and behavior of Neotropical Primates. **Acad Brasil Cienc**, v. 1, p. 9–27, 1981.
- RYLANDS, A. B. et al. An assessment of the diversity of New World Primates. **Neotropical Primates**, v. 8, p. 61–93, 2000.
- RYLANDS, A. B.; DE FARIA, D. S. 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**, p. 262– 272, 1993.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. **P.A. Garber et al. (eds.)**, 2009.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA, J. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Year book**, v. 46, p. 1–14, 2012.
- SCHNEIDER, H. et al. Molecular phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 2, p. 225–242, 1993.
- SCHNEIDER, H. et al. Molecular phylogeny of the New World Monkeys (Platyrrhini, Primates) based on two unlinked nuclear genes: IRBP intron 1 and ϵ -globulin sequences. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 100, p. 153–179, 1996.
- SCHNEIDER, H. The current status of the New World Monkey Phylogeny. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 72, p. 165–170, 2000.
- SCHNEIDER, H. et al. **Can molecular data place each Neotropical monkey in its own branch?** *Chromosoma* 109, 515–523. 2001.
- SCHNEIDER, H. et al. A molecular analysis of the evolutionary relationships in the

- Callitrichinae, with emphasis on the position of the dwarf marmoset. **Zoologica Scripta**, v. 41, p. 1–10, 2011.
- SCHNEIDER, H.; ROSENBERGER, A. L. Molecules, Morphology, and Platyrrhine systematics. In: *Adaptative Radiations of Neotropical Primates*. **MA Norconk, AL Rosenberger & PA Garber (eds). Plenum Press**, 1996.
- SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. The systematics and evolution of New World primates – A review. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, p. 1–10, 2103.
- SILVA, F. F. R. distribuição do gênero *Callithrix* no estado de Minas Gerais: Introdução de espécies e hibridação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Universidade de Viçosa. 200p., 2014.
- SILVA, J.; NORONHA, M. A. On a new species of bare-eared marmoset, genus *Callithrix* Erxleben, 1777, from central Amazonia, Brazil (Primates: Callitrichidae). **Goeldiana Zoologia**, v. 21, p. 1–28, 1998.
- SIMONS, E. L. *Primate Evolution: An Introduction to Man's Place in Nature*. **Macmillan, New York**, 1972.
- SIMPSON, G. G. The principles of classification and a classification of mammals. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist**, v. 85, p. 1–350, 1945.
- SNOWDON, C. T.; SOINI, P. The tamarins, genus *Saguinus* In Mittermeier, R.A., Rylands, A.B., Coimbra-Filho, A.F. & Da Fonseca, G.A.B. (eds) *Ecology and behavior of neotropical primates*. **World Wildlife Fund Washington**, v. 2, 1988.
- STEVENSON, M. F.; RYLANDS, A. B. The marmosets, genus *Callithrix* In Mittermeier A, Rylands AB, Coimbra-Filho AF & Da Fonseca GAB (eds) *ecology and behavior of Neotropical Primates*. **World Wildlife Fund Washington DC**, p. 131–222, 1988.
- TAGLIARO, H. . et al. Marmoset Phylogenetics, conservation perspectives, and

- evolution of the mtDNA control region. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 674–684, 1997.
- TANABE, A. S. Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Molecular Ecology Notes* 7, 962-4, 2007.
- VAN ROOSMALEN, M. G. et al. **Van roomalen_A New and Distinctive Species of marmoset.pdf**, 1998.
- VAN ROOSMALEN, M. G. M. Two new species of marmoset, genus *Callithrix* Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates), from the Tapajós/Madeira interfluvium, south central Amazonia, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 8, p. 1–18, 2000.
- VAN ROOSMALEN, M. G. M.; VAN ROOSMALEN, T. An eastern extension of the geographical range of the pygmy marmoset, *Cebuella pygmaea*. **Neotropical Primates**, v. 5, p. 3–6, 1997.
- VAN ROOSMALEN, M. G. M.; VAN ROOSMALEN, T. The description of a new marmoset genus, *Callibella* (Callitrichinae, Primates), including its molecular phylogenetic status. **Neotropical Primates**, v. 11, p. 1–10, 2003.
- WILL K.W, RUBINOFF D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics**. 20:47–55, 2005.