



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DANILLO JORGE FIGUEIREDO DA SILVA

**FILOGENIA MOLECULAR E BIOGEOGRAFIA DOS MACACOS GUARIBA,
GÊNERO *Alouatta* LACÉPÈDE, 1799 (PRIMATES, ATELIDAE)**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Iracilda da Cunha Sampaio

Belém, 2022

DANILLO JORGE FIGUEIREDO DA SILVA

**FILOGENIA MOLECULAR E BIOGEOGRAFIA DOS MACACOS GUARIBA,
GÊNERO *Alouatta* LACÉPÈDE, 1799 (PRIMATES, ATELIDAE)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará,
como requisito obrigatório para a obtenção do grau de
doutor em Genética e Biologia Molecular

Belém, 2022

DANILLO JORGE FIGUEIREDO DA SILVA

Data da Defesa: 20/12/2022

Conceito: Excelente

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio
Instituto de Estudos Costeiros, UFPA (Orientadora)

Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena
Universidade Federal do Pará

Prof. Jeferson Costa Carneiro
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Júlio Cezar Pieczarka
Universidade Federal do Pará (Suplente)

Belém, 2022

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Iracilda Sampaio pela oportunidade, confiança e compreensão que foram fundamentais em todos os desdobramentos no decorrer desta tese.

Ao professor Horacio Schneider, in memoriam, por aceitar inicialmente a orientação e por seus ensinamentos, a maioria deixados em seu livro de métodos de análise filogenética, fundamentais para esta tese.

À Universidade Federal do Pará pela estrutura disponibilizada.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento, através da bolsa de doutorado, durante o curso.

Aos amigos e colegas dos laboratórios de genética da UFPA, em Belém e em Bragança, Adam Bessa, Yrlene Ferreira, Jeferson Carneiro, Luan Rabelo, Luciana Watanabe, Auricéia Guimarães e Valdemiro Muhala.

Aos professores da UFPA de Bragança e de Belém, Grazielle, Simoni e Marcelo.

À minha família, pela paciência e apoio, importantes no decorrer dessa tese.

Ao meu irmão Raimundo pelos conselhos que sempre esteve disposto a oferecer.

Às minhas amigas Auricéia Guimarães (ou Lyca), Damires Sanches, Luciana Watanabe, Nicolly Caroliny, Paula Praxedes, Thais Martins.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO I	14
Relações filogenéticas dos macacos guaribas (<i>Alouatta</i>, <i>Atelidae</i>, <i>Primates</i>) inferida através de sequências de DNA nuclear	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Amostragem, extração, amplificação e sequenciamento de DNA	18
2.2 Alinhamento de sequências, modelos evolutivos e descrição de banco de dados	20
2.3 Análises filogenéticas e estimativa de tempos de divergência	20
3. RESULTADOS	22
3.1 Caracterização dos dados	22
3.2 Análise filogenética	23
3.3 Tempos de divergência	25
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS	32
ANEXO I	37
CAPÍTULO II	44
Filogenia e biogeografia dos macacos guaribas (<i>Alouatta</i>, <i>Atelidae</i>) inferida usando DNA mitocondrial	44
1. INTRODUÇÃO	45

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Construção da matriz de dados	47
2.2 Alinhamento e modelos evolutivos.....	47
2.4 Análises Biogeográficas	49
3. RESULTADOS.....	50
3.1 Filogenia e datação molecular	50
3.2 História biogeográfica.....	52
4. DISCUSSÃO	54
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS	58
ANEXO II.....	63
CONCLUSÃO GERAL	67

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Relações filogenéticas de *Alouatta* usando morfologia por Gregorin (2006)**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2: Árvore filogenética baseada em máxima parcimônia e máxima verossimilhança usando sequências do pseudogene γ^1 -globina. Números mostrados acima dos nós representam os suportes de bootstrap por máxima verossimilhança, os números mostrados abaixo são bootstrap para máxima parcimônia..... 5

Figura 3: Árvore de agrupamento de vizinhos de Bonvicino et al. (2001), mostrando as relações somente para os taxa ocorrentes no Brasil. 5

Figura 4: Reconstrução da evolução cromossômica em *Alouatta* na árvore de máxima parcimônia por Oliveira et al. (2002). Os números nos nós indicam valores de bootstrap... 6

Figura 5: Árvore filogenética de Cortés-Ortiz et al. (2003), baseada em DNA mitocondrial, mostrando as datas de separação entre as espécies e grupos de espécies de *Alouatta* das Américas..... 7

Figura 6: Árvore filogenética de Doyle et al. (2021) com base em inferência bayesiana, do MrBayes, usando 14 íntrons concatenados. 8

Figura 7: Árvore de espécies gerada usando *BEAST com base em 14 íntrons nucleares por Doyle et al (2021)..... 9

Figura 8: Parte da árvore filogenética gerada por Janiak et al. (2022) usando inferência bayesiana do BEAST e, mostrando as relações entre as espécies de *Alouatta*. 9

Figura 9: Ilustração da espécie *Alouatta discolor*. Esse táxon já foi considerado subespécie de *A. belzebul*. Aqui, consideramos, *A. discolor* como espécie independente dentro do complexo *A. belzebul*, sensu Povill et al. 2022. Imagem produzida por Stephen Nash..... 15

Figura 10: Mapa da distribuição geográfica das espécies reconhecidas do gênero *Alouatta*, segundo Cortés-Ortiz et al. (2015). Informações geográficas estão adaptadas a partir da lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (dados baixados em 28/07/2022). 16

Figura 11: Árvore filogenética estimada usando MV e inferência bayesiana. Os números no lado esquerdo das barras, em cada nó, são os valores de probabilidade posteriori (IB), ao lado direito estão os valores de bootstrap (MV)..... 24

Figura 12: Árvore filogenética do gênero <i>Alouatta</i> , baseada em inferência bayesiana, no BEAST com loci mitocondriais e nucleares. Números em cada nó indicam as probabilidades posteriori. Ilustrações: Stephen Nash	25
Figura 13: Tempos de divergência estimados para <i>Alouatta</i> , através do BEAST, usando 24 marcadores moleculares, de DNA mitocondrial e DNA nuclear. Os números em cada nó estão referenciados na tabela 4	26
Figura 14: Representação da área de distribuição geográfica de <i>Alouatta</i> nas Américas. Mapa construído com base em dados adaptados a partir da lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (dados baixados em 28/07/2022).	46
Figura 15: Mapa com pontos de amostragem das espécies de <i>Alouatta</i>	48
Figura 16: Árvore filogenética mostrando as relações entre as espécies de <i>Alouatta</i> , baseada em inferência bayesiana, construída no BEAST usando os genes ATPase 6/8 e Cyt b.	51
Figura 17: Datas de divergência estimadas através do BEAST para as espécies de <i>Alouatta</i> com base em genes mitocondriais.	52
Figura 18: Árvore mostrando as áreas ancestrais (letras de A a I na tabela 5) estimadas para o gênero <i>Alouatta</i> usando o BioGeoBEARS com o modelo DIVALIKE+J.	52
Tabela 1: Propostas taxonômicas para o gênero <i>Alouatta</i> . *grupo analisado apenas para os táxons que ocorrem no Brasil.	2
Tabela 2: Espécies sequenciadas neste trabalho, códigos e origem geográfica.	19
Tabela 3: Distância genética média, em porcentagem, estimada entre as espécies de <i>Alouatta</i> e outros gêneros da família Atelidae usando o modelo K2P.	23
Tabela 4: Medianas de datas dos nós e intervalos HPD 95%, em milhões de anos (Ma), estimadas usando todos os marcadores concatenados, com análises usando relógio molecular relaxado não correlacionado sob distribuição Lognormal.	27
Tabela 5: Regiões biogeográficas consideradas na reconstrução da história biogeográfica de <i>Alouatta</i> com o BioGeoBEARS, suas respectivas espécies viventes e principais referências de cada área.	50
Tabela 6: Comparação de valores Log-verossimilhança, dispersão (D), extinção (E), efeito fundador (J), critérios de informação Akaike (AIC e AIC weight) entre os modelos calculados no BioGeoBEARS.	52

Tabela S1: Relação das espécies, marcadores moleculares, origem geográfica, código de acesso GenBank/ENA e referências.	37
Tabela S2: Marcadores moleculares, sequências de primers utilizados nas PCRs, temperaturas de anelamento e suas respectivas referências bibliográficas	40
Tabela S3: Marcadores moleculares, números de sítios variáveis e de sítios informativos para parcimônia, tamanho dos fragmentos (em pb), e seus respectivos modelos evolutivos. Sítios variáveis e sítios informativos para parcimônia considerando apenas o gênero <i>Alouatta</i> estão indicados entre parênteses.	42
Tabela S4: Distância genética média entre espécies de <i>Alouatta</i> , e os gêneros de Atelidae, com base em DNA mitocondrial, usando o modelo K2P.....	43
Tabela S5: Distância genética média estimada entre as espécies de <i>Alouatta</i> e os gêneros da família Atelidae, usando marcadores nucleares e o modelo K2P.....	43
Tabela S6: Espécies, origem geográfica, código de acesso e referências bibliográficas para as sequências de citocromo b usadas no presente estudo.	63
Tabela S7: Espécies, origem geográfica, código de acesso e referências bibliográficas para as sequências do gene ATP 6/8 usadas no presente trabalho.	63

RESUMO

O gênero *Alouatta* Lacépède (Primates Atelidae) apresenta a maior distribuição geográfica, entre os macacos do novo mundo ocorrendo do sul do México ao norte da Argentina. Algumas incertezas filogenéticas e biogeográficas ainda permanecem em *Alouatta*. Os estudos filogenéticos em *Alouatta* mostram resultados parcialmente congruentes entre si. Nós investigamos as relações filogenéticas, tempos de separação e biogeografia dos macacos guariba, usando marcadores moleculares através de análises bayesianas e de máxima verossimilhança. Dois clados foram recuperados dentro de *Alouatta*, um representando os indivíduos da América Trans-Andina, e outro representando indivíduos da América Cis-Andina. Dois grupos dentro do clado Cis-Andino foram recuperados. O primeiro formado por espécies que ocorrem na Mata Atlântica e no leste da Amazônia, que provavelmente se separaram durante a fase inicial do Plioceno, com o surgimento de um ambiente seco. O segundo, composto por *A. caraya* e o complexo de espécies *A. seniculus* formando uma relação de grupo irmão. A maioria dos eventos de diversificação ocorreram durante a época do Plioceno. Os resultados deste estudo apontam que o ancestral comum mais recente de *Alouatta* viveu no início do Plioceno, data coincidente com a formação do norte dos Andes, evento que, poderia ter levado à primeira divisão dentro de *Alouatta*. O oeste da Amazônia foi apontado como uma área chave da origem e diversificação dos principais grupos do gênero. Nossos resultados indicaram que a época do Plioceno foi o período das principais diversificações e formação de grupos dentro de *Alouatta*. Além disso, algumas espécies possuem origens mais recente, que datam do Pleistoceno. Como as espécies *A. discolor* e *A. belzebul*, que possuem uma relação estreita entre si. Assim como *A. macconnelli* e *A. nigerrima*, que ocorrem em lados opostos do Rio Amazonas.

PALAVRAS-CHAVE: Amazônia, Sistemática filogenética, DNA mitocondrial, Macaco guariba, DNA nuclear

ABSTRACT

The genus *Alouatta* Lacépède (Primates Atelidae) has the widest geographic distribution, among the New World monkeys occurring from southern Mexico to northern Argentina. Some phylogenetic and biogeographic uncertainties still remain in *Alouatta*. Phylogenetic studies in *Alouatta* show results that are partially congruent with each other. We investigated the phylogenetic relationships, separation times and biogeography of howler monkeys using molecular markers through Bayesian and maximum likelihood analyses. Two clades were recovered within *Alouatta*, one representing individuals from Trans-Andean America, and another representing individuals from Cis-Andean America. Two groups within the Cis-Andean clade were recovered. The first formed by species that occur in the Atlantic Forest and eastern Amazonia, which probably separated during the early Pliocene phase, with the emergence of a dry environment. The second, composed of *A. caraya* and the *A. seniculus* species complex forming a sister group relationship. Most diversification events occurred during the Pliocene epoch. The results of this study indicate that the most recent common ancestor of *Alouatta* lived in the early Pliocene, a date coinciding with the formation of the northern Andes, an event that could have led to the first division within *Alouatta*. The western Amazon was identified as a key area for the origin and diversification of the main groups of the genus. Our results indicated that the Pliocene epoch was the period of major diversification and group formation within *Alouatta*. In addition, some species have more recent origins, dating back to the Pleistocene. Like the species *A. discolor* and *A. belzebul*, which are closely related to each other. As well as *A. macconnelli* and *A. nigerrima*, which occur on opposite sides of the Amazon River.

KEY WORDS: Amazon, Phylogenetic systematics, Mitochondrial DNA, Howler Monkey, Nuclear DNA

1. INTRODUÇÃO GERAL

As relações evolutivas dos gêneros da Infraordem Platyrrhini (primatas) têm sido extensivamente estudadas usando caracteres morfológicos, comportamentais e cariotípicos (Dutrillaux et al. 1986; Ford, 1986; Rosenberger, 1984; Rosenberger & Strier 1989). Contudo, a partir da década de 90, sequências de DNA passaram a ser usadas na tentativa de resolver as relações filogenéticas nos primatas do Novo Mundo (Porter et al. 1995; Schneider & Rosenberger, 1996; Schneider et al. 1993).

Muitas das discordâncias sobre a sistemática dos primatas do Novo Mundo têm sido mais bem compreendidas justamente com a contribuição da biologia molecular, mais especificamente com dados de sequências de DNA (Schneider & Sampaio 2015). Por exemplo, a família Atelidae, de acordo com Schneider (2000) é constituída por *Lagothrix* Geoffroy 1812, *Brachyteles* Spix 1823, *Ateles* Geoffroy 1806 e *Alouatta* Lacépède 1799. Durante muito tempo, *Ateles* e *Brachyteles* eram considerados grupos irmãos, com base em características morfológicas cranianas e pós-cranianas (Rosenberger & Strier 1989). Outro arranjo proposto considerava o clado *Lagothrix* + *Ateles* como grupo irmão de *Alouatta* + *Brachyteles* com base em caracteres crâneo-dentários (Kay 1990). As relações filogenéticas em primatas do Novo Mundo baseadas em dados de sequenciamento de DNA foram, inicialmente, investigadas por Schneider et al. (1993), onde então foi proposto um relacionamento entre os quatro gêneros da família Atelidae, com *Alouatta* divergindo inicialmente dos outros três gêneros, e *Ateles* apresentando uma relação de grupo irmão com *Lagothrix* + *Brachyteles*. Este arranjo filogenético foi confirmado em vários estudos posteriores (Meireles et al., 1999a; Opazo et al., 2006; Perelman et al., 2011).

O gênero *Alouatta* compreende os macacos guaribas são primatas comedores de folhas, frutos ou flores. De acordo com Rosenberger (2020), o consumo de folhas permite que *Alouatta* tenha flexibilidade ambiental que lhes permite viver em uma ampla gama de habitats, incluindo áreas degradadas ou pequenos fragmentos florestais, onde poucos Platyrrhini grandes e frugívoros podem existir. Dessa forma, os macacos guaribas são pioneiros em paisagens fora da Amazônia, expandindo-se até mesmo por regiões onde existem apenas faixas estreitas de floresta (Rosenberger 2020). Como resultado, eles são um dos gêneros de Platyrrhini mais difundidos, com uma distribuição geográfica que vai do sul do México ao norte da Argentina. Ao longo desta grande extensão, a taxonomia do gênero é incerta (Cortés-Ortiz et. al. 2015; Rosenberger 2020).

Os arranjos taxonômicos sugerem que os *Alouatta* compreendem de 5 a 12 espécies de primatas do novo mundo (Tabela 1). Esse número tem se alterado de acordo com a realização de pesquisas com implicações taxonômicas no gênero. Além disso, esse gênero compreende espécies que estão entre os maiores primatas neotropicais, variando entre 4 e 11 Kg (Di Fiore & Campbell 2007). Algumas propostas taxonômicas do gênero estão resumidas na Tabela 1, que lista as espécies consideradas por diferentes autores. Uma revisão taxonômica realizada para os *Alouatta*, que ocorrem no Brasil, foi realizada por Gregorin (2006). Neste trabalho, o autor propôs uma hipótese filogenética para as espécies de *Alouatta* usando morfologia do osso cranial e hióide (Figura 1). Esse trabalho propõe a elevação ao status de espécie de muitos taxa, considerados subespécies, em arranjos taxonômicos anteriores (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1: Propostas de arranjo taxonômico do gênero *Alouatta* e espécies consideradas em diferentes trabalhos *grupo analisado apenas para os táxons que ocorrem no Brasil.

Hershkovitz, 1949	Hill, 1962	Groves, 2001	Gregorin, 2006 *	Cortes-Ortiz et al. (2015)
<i>A. belzebul</i>	<i>A. belzebul</i>	<i>A. belzebul</i>	<i>A. belzebul</i>	<i>A. belzebul</i>
<i>A. caraya</i>	<i>A. caraya</i>	<i>A. caraya</i>	<i>A. caraya</i>	<i>A. caraya</i>
<i>A. guariba</i>	<i>A. guariba</i>	<i>A. guariba</i>	<i>A. guariba</i>	<i>A. guariba</i>
<i>A. seniculus</i>	<i>A. seniculus</i>	<i>A. seniculus</i>	<i>A. juara</i>	<i>A. seniculus</i>
<i>A. palliata</i>	<i>A. palliata</i>	<i>A. palliata</i>	<i>A. pururensis</i>	<i>A. palliata</i>
		<i>A. coibensis</i>	<i>A. clamitans</i>	<i>A. sara</i>
		<i>A. sara</i>	<i>A. discolor</i>	<i>A. pigra</i>
		<i>A. pigra</i>	<i>A. ululata</i>	<i>A. nigerrima</i>
		<i>A. nigerrima</i>	<i>A. nigerrima</i>	<i>A. macconnelli</i>
		<i>A. macconnelli</i>	<i>A. macconnelli</i>	<i>A. discolor</i>
				<i>A. ululata</i>
				<i>A. arctoidea</i>

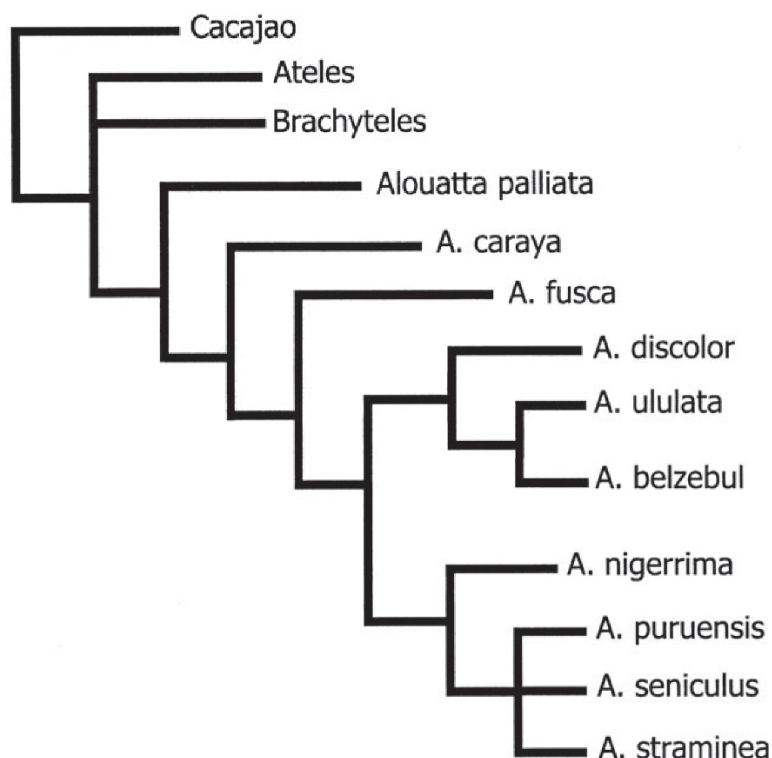


Figura 1: Relações filogenéticas de *Alouatta* usando morfologia por Gregorin (2006)

A filogenia do gênero foi inicialmente investigada por Meireles et al. (1999b), usando dados de sequências do pseudogene γ^1 -globina. Neste trabalho, somente quatro taxa da América do Sul foram utilizados e com base em métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança, foi demonstrado que *A. caraya* constitui o grupo irmão de *A. belzebul* + *A. seniculus* + *A. fusca*, como mostrado na Figura 2.

Bonvicino et al. (2001) também realizaram um estudo em *Alouatta* que ocorrem no Brasil, usando o gene mitocondrial citocromo b. Seus resultados, baseados em agrupamento de vizinhos, recuperaram dois grupos para os *Alouatta* da América do Sul. O primeiro com *A. belzebul* como espécie irmã de *A. fusca*, táxon renomeado por Rylands & Brandon-Jones (1998) para *A. guariba*, nome que será utilizado neste trabalho. E o segundo com *A. caraya* como sendo espécie irmã do complexo de espécies *A. seniculus* (Figura 3). Esse trabalho também implementou o método de máxima parcimônia, que resultou em um arranjo similar ao de Meireles et al. (1999b), com *A. caraya* como espécie irmã dos demais *Alouatta* Sul-americanos (Figura 2). Um estudo de reconstrução das relações filogenéticas usando pintura cromossômica foi realizado por (Oliveira et al. 2002). Seus resultados mostraram que o

gênero *Alouatta* apresenta a maior diversidade cariotópica dentro de Platyrrhini e que pode ser dividido em dois grupos de espécies: o primeiro incluindo *A. caraya* e *A. belzebul* e o segundo *A. s. macconnelli*, *A. sara*, *A. s. arctoidea* e *A. fusca*. A árvore filogenética proposta nesse último trabalho, e baseada em máxima parcimônia, é exibida na Figura 4.

O estudo mais amplo, em relação à taxonomia e a biogeografia, realizado até o momento foi o de Cortés-Ortiz et al. (2003). Considerando que o gênero *Alouatta* apresenta uma vasta distribuição geográfica nas Américas, Cortés-Ortiz et al. (2003) realizaram um estudo de filogenia e biogeografia usando marcadores mitocondriais e nucleares. As regiões de genes nucleares não forneceram resolução filogenética entre as espécies estudadas. As análises com base em dois genes do DNA mitocondrial, citocromo b e ATPase 6/8, por outro lado, resultaram em uma filogenia bem resolvida (Figura 5). Um dos achados mais interessantes encontrados por Cortés-Ortiz et al. (2003) sugere que a primeira divisão dentro do gênero ocorreu há 6,8 milhões de anos, separando os clados da América do Sul e da Mesoamérica (Figura 5). Para os *Alouatta* Sul-americanos, o arranjo filogenético de Cortés-Ortiz et al. (2003) foi similar ao de Bonvicino et al. (2001).

O estudo de filogeografia de Ruiz-García et al. (2017) usou espécies de *Alouatta* que ocorrem na América Central e Norte da América do Sul. Esses autores analisaram a filogeografia da espécie *A. palliata* da América Central, Equador e Colômbia com base em seis genes mitocondriais. Seus resultados indicaram a origem dos *Alouatta* Trans-Andino por volta de 6-6,9 Ma a partir de ancestrais de *Alouatta* Cis-Andino.

O estudo mais recente que aborda o gênero *Alouatta* e suas relações filogenéticas é o de Doyle et al. (2021). Nesse estudo, usando sequências de 14 íntrons nucleares, um arranjo filogenético diferente dos anteriores foi proposta. O arranjo filogenético proposto nesse trabalho, usando inferência bayesiana, recuperou dois grupos dentro de *Alouatta*, os clados Trans-Andino e o Cis-Andino. Entre as espécies Sul-americanas, a espécie *A. guariba* foi recuperada como irmã das demais espécies de *Alouatta* da América do Sul (Figura 6 e 7). Entretanto, as árvores obtidas por diferentes softwares (*BEAST e MrBayes) apresentaram topologias diferentes (Figuras 6 e 7).

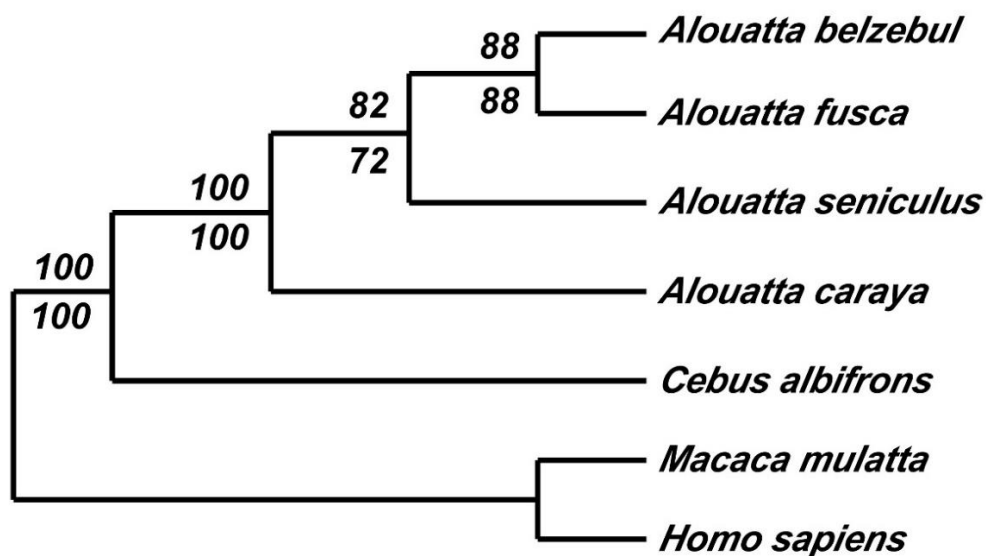


Figura 2: Árvore filogenética baseada em máxima parcimônia e máxima verossimilhança usando sequências do pseudogene γ^l -globina. Números mostrados acima dos nós representam os suportes de bootstrap por máxima verossimilhança, os números mostrados abaixo são bootstrap para máxima parcimônia.

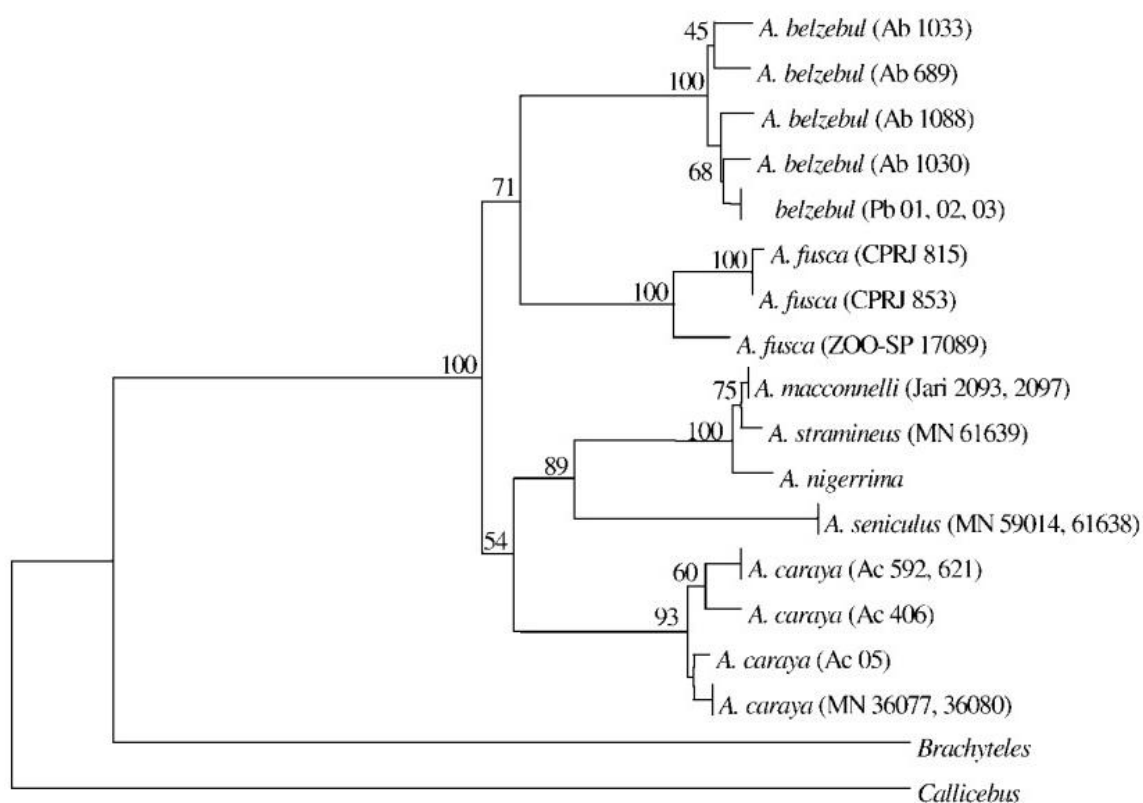


Figura 3: Árvore de agrupamento de vizinhos de Bonvicino et al. (2001), mostrando as relações somente para os taxa ocorrentes no Brasil.

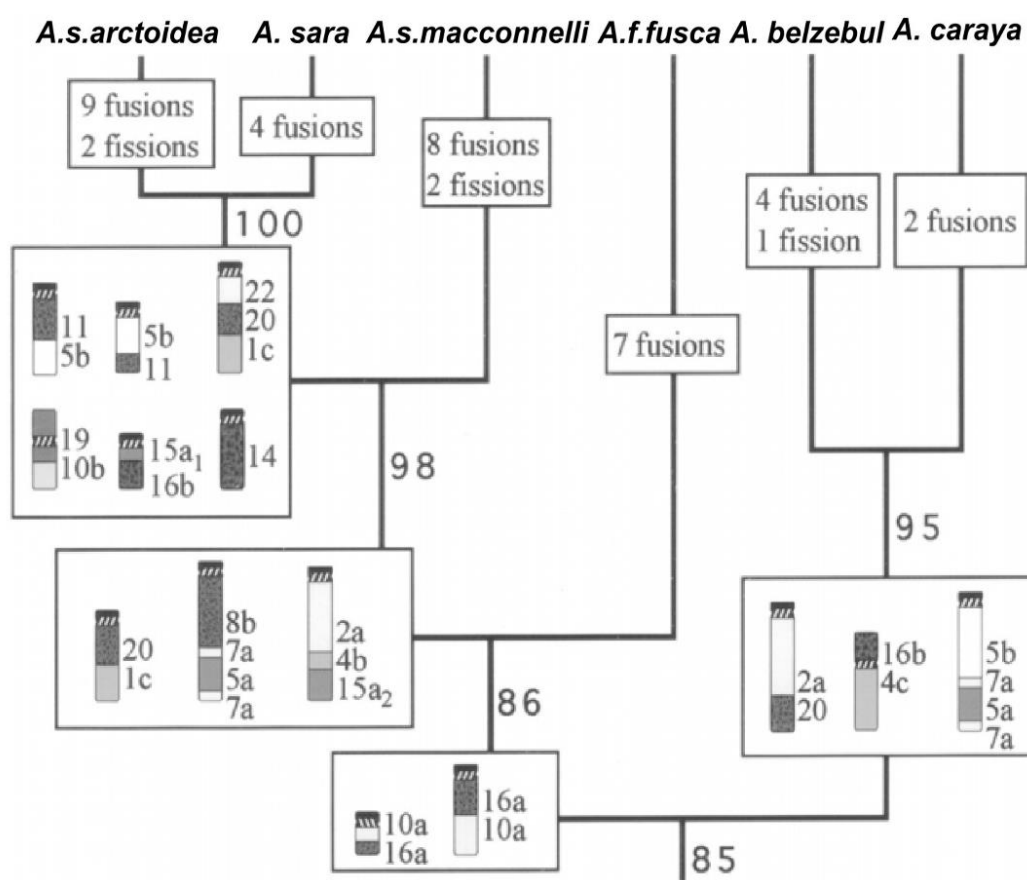


Figura 4: Reconstrução da evolução cromossômica em *Alouatta* na árvore de máxima parcimônia por Oliveira et al. (2002). Os números nos nós indicam valores de *bootstrap*.

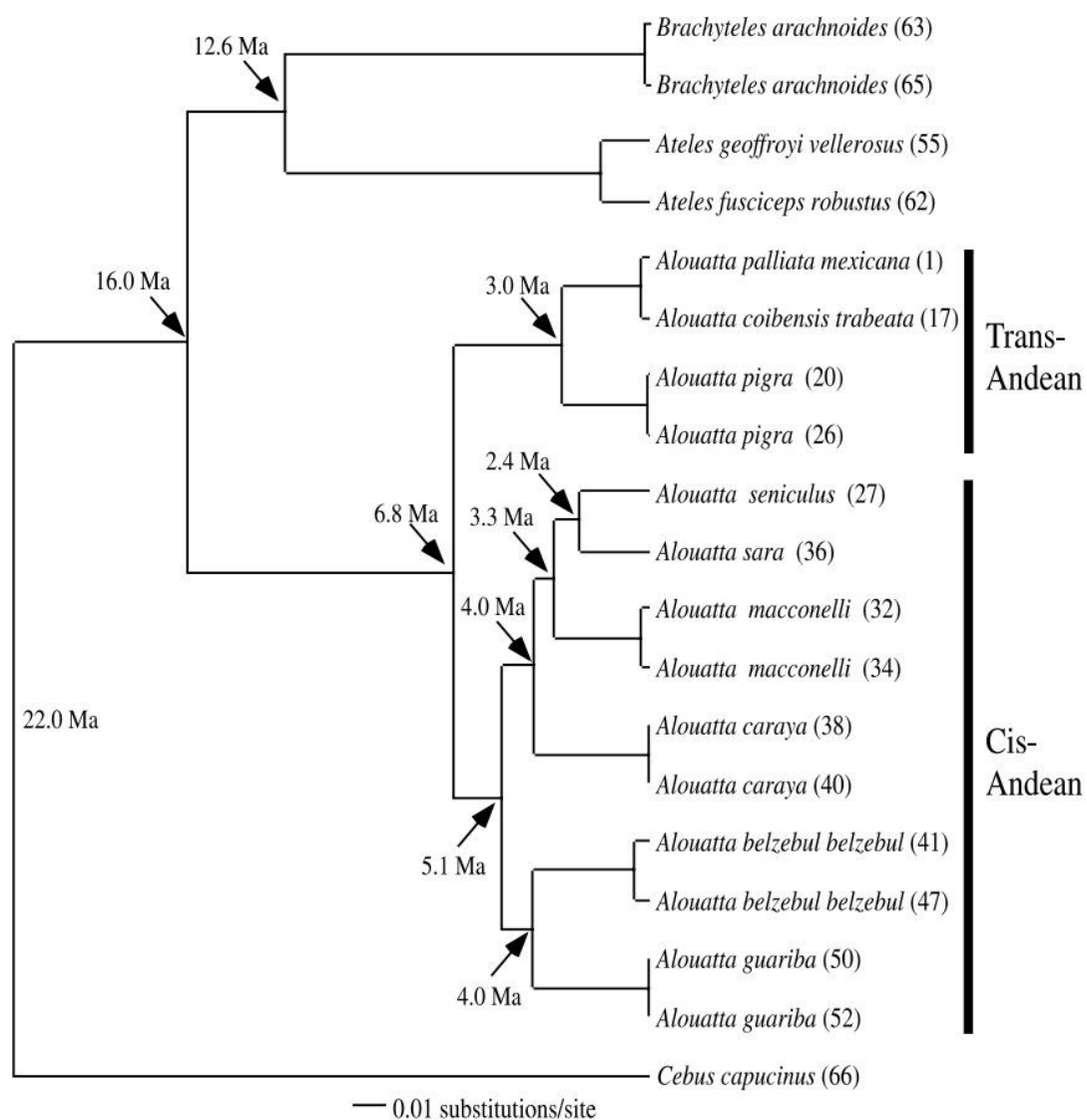


Figura 5: Árvore filogenética de Cortés-Ortiz et al. (2003), baseada em DNA mitocondrial, mostrando as datas de separação entre as espécies e grupos de espécies de *Alouatta* das Américas.

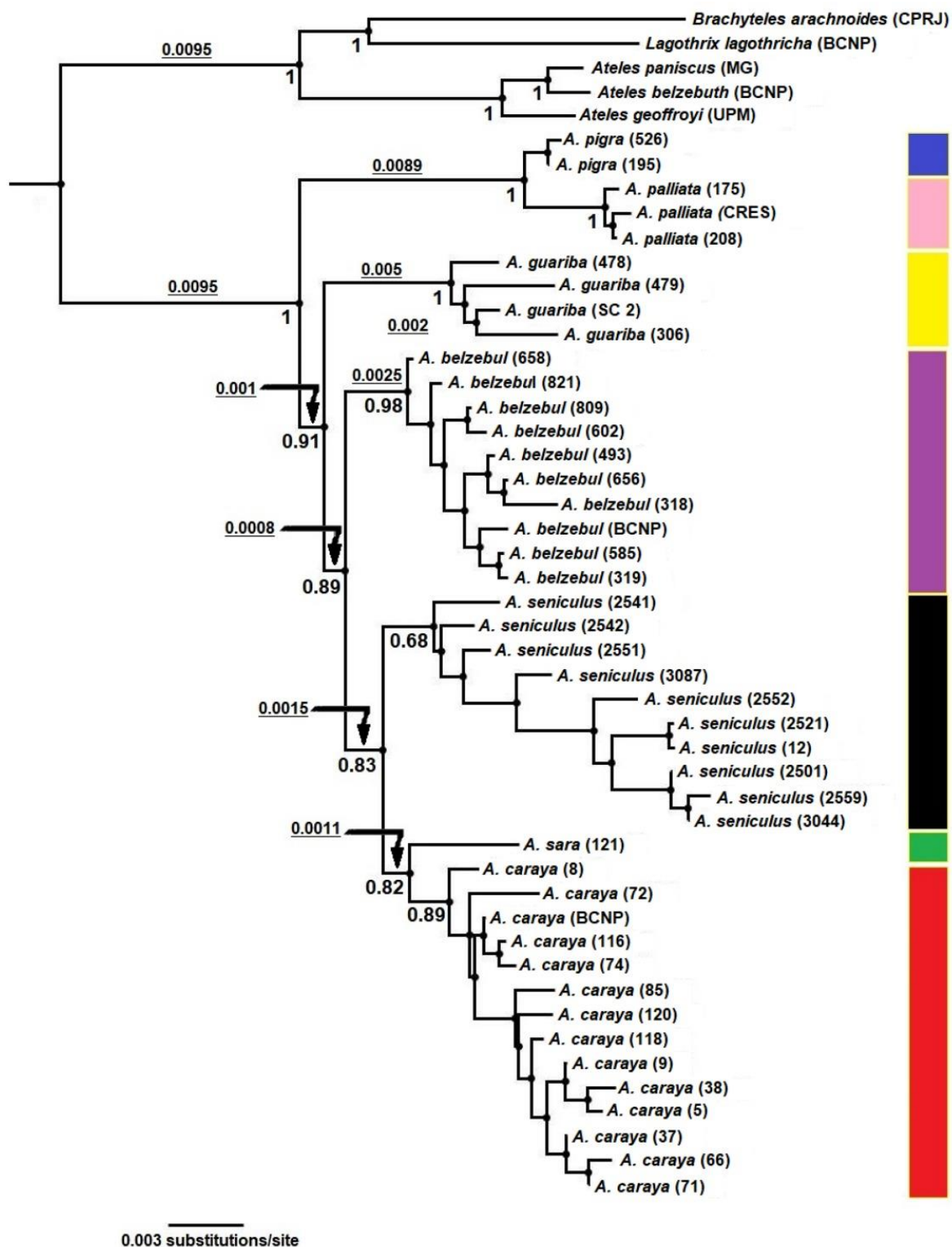


Figura 6: Árvore filogenética de Doyle et al. (2021) com base em inferência bayesiana, do MrBayes, usando 14 íntrons concatenados.

A sistemática e taxonomia do gênero tem sido abordada principalmente através de métodos tradicionais baseados em morfologia (Hershkovitz, 1949; Hill, 1962; Gregorin, 2006). Alguns estudos genéticos mais recentes, que abordam a sistemática ao nível de gênero, têm incluído dados do DNA mitocondrial e citogenéticos (Bonvicino et al., 2001; Cortés-Ortiz et al. 2003; Oliveira et al. 2002). Outros, têm incluído DNA nuclear, mas gerando resultados discordantes da maioria dos trabalhos anteriores com *Alouatta*. Para tentar esclarecer as relações filogenéticas, dentro do gênero *Alouatta*, é importante empregar abordagens genéticas, como dados multilocus, que tenham resolução suficiente para recuperar relações filogenéticas.

Assim, este estudo têm os objetivos de investigar as relações filogenéticas entre as espécies de *Alouatta*, usando sequências de DNA nuclear e mitocondrial, visando contribuir para o conhecimento da sistemática, história natural e evolução deste gênero nas Américas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar as relações filogenéticas e biogeográficas entre as espécies do gênero *Alouatta* visando contribuir para com o conhecimento da sistemática, história natural e evolução deste gênero nas Américas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar as relações filogenéticas entre as espécies de *Alouatta* Sul-americanas e da América Central com base nas sequências de DNA mitocondrial e nuclear;
- ✓ Estimar tempo de divergência entre as espécies dentro de *Alouatta* com base nos dados concatenados;
- ✓ Utilizar marcadores mitocondriais para investigar a história biogeográfica de *Alouatta*.

3. REFERÊNCIAS

- Bonvicino, C. R., Lemos, B., & Seuánez, H. N. (2001). Molecular phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini). *Chromosoma*, 110(3): 241-246.
- Cortés-Ortiz, L., Bermingham, E., Rico, C., Rodriguez-Luna, E., Sampaio, I. & Ruiz-García, M. (2003) Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26(1): 64-81.
- Cortés-Ortiz, L., Rylands, A. B., & Mittermeier, R. A. (2015). The taxonomy of howler monkeys: integrating old and new knowledge from morphological and genetic studies. In *Howler Monkeys Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (pp. 55-84). Springer, New York, NY.
- Doyle, E. D., Prates, I., Sampaio, I., Koiffmann, C., Silva, W. A., Carnaval, A. C., & Harris, E. E. (2021). Molecular phylogenetic inference of the howler monkey radiation (Primates: *Alouatta*). *Primates*, 62(1): 177-188.
- Dutrillaux, B.; Couturier, J. & Viegas-Pequignot, E. (1986) Evolucion cromosomique des Platyrrhiniens. *Mammalia*, 50: 56-81.
- Di Fiore, A., Campbell, C. J. (2007). The atelines: Variation in ecology, behavior, and social organization. In: Campbell CJ, Fuentes A, MacKinnon KC, Panger M, Bearder S (eds) *Primates in perspective*. Oxford University Press, New York: pp 155–185.
- Ford, S. M. (1986) Systematics of the New World monkeys. In: Swindler, D. R. e J., E. (Ed.). *Comparative Primate Biology, Volume I: Systematics, Evolution and Anatomy*. New York: Alan R. Liss. Systematics of the New World monkeys, 73-135.
- Gregorin, R. (2006). Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. *Revista brasileira de Zoologia*, 23: 64-144.
- Groves, C. P. (2001) *Primate Taxonomy*: Whashington Smithsonian Institution Press.
- Hershkovitz, P. (1949) Mammals of northern Colombia. Preliminary report No. 4: monkeys (Primates), with taxonomic revisions of some forms *Proceedings of the United States National Museum*, 98: 323–427.
- Hill, W. C. O. (1962) *Primates Comparative Anatomy and Taxonomy v. 4 - Cebidae, Part A*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Janiak M.C, Silva F.E, Beck R.M.D, de Vries D, Kuderna L.F.K, Torosin N.S, Melin A.D, Marquês-Bonet T, Goodhead I.B, Messias M, da Silva M.N.F, Sampaio I, Farias I.P, Rossi R, de Melo F.R, Valsecchi J, Hrbek T, Boubli J.P. (2022). Two hundred and five newly assembled mitogenomes provide mixed evidence for rivers as drivers of speciation for Amazonian primates. *Molecular Ecology*. 31(14): 3888-3902.
- Kay, R. F. (1990) The Phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthropeidea). *J Human Evol* 19: 175-208.

Meireles, C. M., Czelusniak, J., Schneider, M. P., Muniz, J. A., Brigido, M. C., Ferreira, H. S., & Goodman, M. (1999a) 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*, 12(1): 10-30.

Meireles, C. M., Czelusniak, J., Ferrari, S. F., Schneider, M. P. C., & Goodman, M. (1999b). Phylogenetic relationships among Brazilian howler monkeys, genus *Alouatta* (Platyrrhini, Atelidae), based on γ -globin pseudogene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 22: 337-344.

Oliveira, E.H.C; M. Neusser; W.B. Figueiredo; C. Nagamachi; J.C.Pieczarka; I.J. Sbalqueiro; J. Wienberg & S. Muller. (2002). The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*, Exceter, 10 (8): 669-683.

Opazo, J. C., Wildman, D. E., Prychitko, T., Johnson, R. M., & Goodman, M. (2006). Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular phylogenetics and evolution*, 40(1): 274-280.

Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuanetz, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumppler, Y., Schneider, M. P., Silva, A., O'Brien, S. J., Pecon-Slaterry, J. A., (2011). Molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7: e1001342.

Porter, C. A., Sampaio, I., Schneider, H., Schneider, M. P. C., Czelusniak, J. & Goodman, M. (1995) Evidence on primate phylogeny from epsilon-globin gene sequences and flanking regions. *J Mol Evol*, 40: 30-55.

Rosenberger, A. L. (1984) Fossil New World Monkeys dispute the molecular clock. *Journal of Human Evolution*, 13: 737-742.

Rosenberger, A. L. & Strier, K. B. (1989) Adaptive radiation of the ateline primates. *Journal of Human Evolution*, 18: 717-750.

Rosenberger, A. L. (2020). *New world monkeys: The evolutionary odyssey*. Princeton University Press.

Ruiz-García, M., Cerón, Á., Sánchez-Castillo, S., Rueda-Zozaya, P., Pinedo-Castro, M., Gutierrez-Espeleta, G., & Shostell, J. M. (2017) Phylogeography of the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*; Atelidae, Primates) across its geographical range by means of mitochondrial genetic analyses and new insights about the phylogeny of *Alouatta*. *Folia Primatologica*, 88(5): 421-454.

Schneider, H., Schneider, M. P. C., Sampaio, I., Harada, M. L., Stanhope, M., Czelusniak, J., & Goodman, M. (1993) Molecular Phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2(3): 225-242.

Schneider, H. & Rosenberger, A. L. (1996) Molecules, morphology, and platyrrhine systematics. In: Norconk, M. A., Rosenberger, A. L., et al (Ed.). *Adaptive Radiations of Neotropical Primates*. New York: Plenum Press.

Schneider, H. (2000) The current status of the New World monkey phylogeny. *An Acad Bras Cienc*, 72(2): 165-172.

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

CAPÍTULO I

Relações filogenéticas dos macacos guaribas (*Alouatta*, Atelidae, Primates) inferida através de sequências de DNA nuclear

Danillo Figueiredo da Silva^a & Colaboradores

^a Laboratório de Evolução (LEVO), Instituto de Estudos Costeiros (IECOS), Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, Pará, Brazil

Resumo

Os macacos guariba do gênero *Alouatta* são os Platyrrhini com a maior distribuição geográfica, ocorrendo do sul do México ao norte da Argentina. Diferentes estudos filogenéticos mostram resultados inconsistentes entre si, com algumas incertezas permanecendo. Neste trabalho, nós investigamos as relações filogenéticas entre as espécies de *Alouatta* usando 24 marcadores moleculares, dois de DNA mitocondrial (mtDNA) e 22 de DNA nuclear (nuDNA). Através de análises bayesianas e de máxima verossimilhança, nós inferimos a filogenia e estimamos datas de separação entre as espécies e grupos de espécies do gênero. Dois clados foram recuperados dentro de *Alouatta*, um representando os indivíduos da América Trans-Andina, e outro representando indivíduos Cis-Andinos. A maioria dos eventos de diversificação ocorreram durante a época do Plioceno. Dois grupos dentro do clado Cis-Andino foram recuperados. Um desses grupos é formado por espécies que ocorrem na Mata Atlântica e no leste da Amazônia, que provavelmente se separam durante o Plioceno com o surgimento da diagonal seca. O outro grupo é composto por *A. caraya*, formando uma relação de grupo irmão com o complexo de espécies *A. seniculus*. Além disso, este estudo mostrou uma relação estreita entre *A. discolor* e *A. belzebul*, e entre *A. macconnelli* e *A. nigerrima*, que ocorrem em lados opostos do Rio Amazonas.

1. INTRODUÇÃO

Os macacos guariba são primatas do novo mundo, do gênero *Alouatta*, que possuem a maior distribuição geográfica dentro dos Platyrrhini (Figura 9), ocorrendo desde Vera Cruz, México (Estrada & Coates-Estrada 1984) até Corrientes, Argentina (Cabrera 1939). Esses organismos estão entre os maiores primatas do novo mundo, juntos com os outros gêneros de Atelidae, *Ateles*, *Brachyteles* e *Lagothrix* (Figura 9). Esses macacos, comedores de folhas e frutos, apresentam importância ecológica na sucessão florística e manutenção da biodiversidade de ecossistemas (Bravo 2022). São animais que habitam diferentes tipos de ecossistemas e habitats, desde florestas tropicais, como a Amazônia e Mata Atlântica, até áreas de formações abertas, como a Caatinga e o Cerrado (Gregorin 2006). A Figura 10 mostra a distribuição geográfica de cada espécie, e a extensão geográfica atingida por *Alouatta* nas Américas



Figura 9: Ilustração da espécie *Alouatta discolor*. Esse táxon já foi considerado subespécie de *A. belzebul*. Aqui, consideramos, *A. discolor* como espécie independente dentro do complexo *A. belzebul*, sensu Povill et al. 2022. Imagem produzida por Stephen Nash.

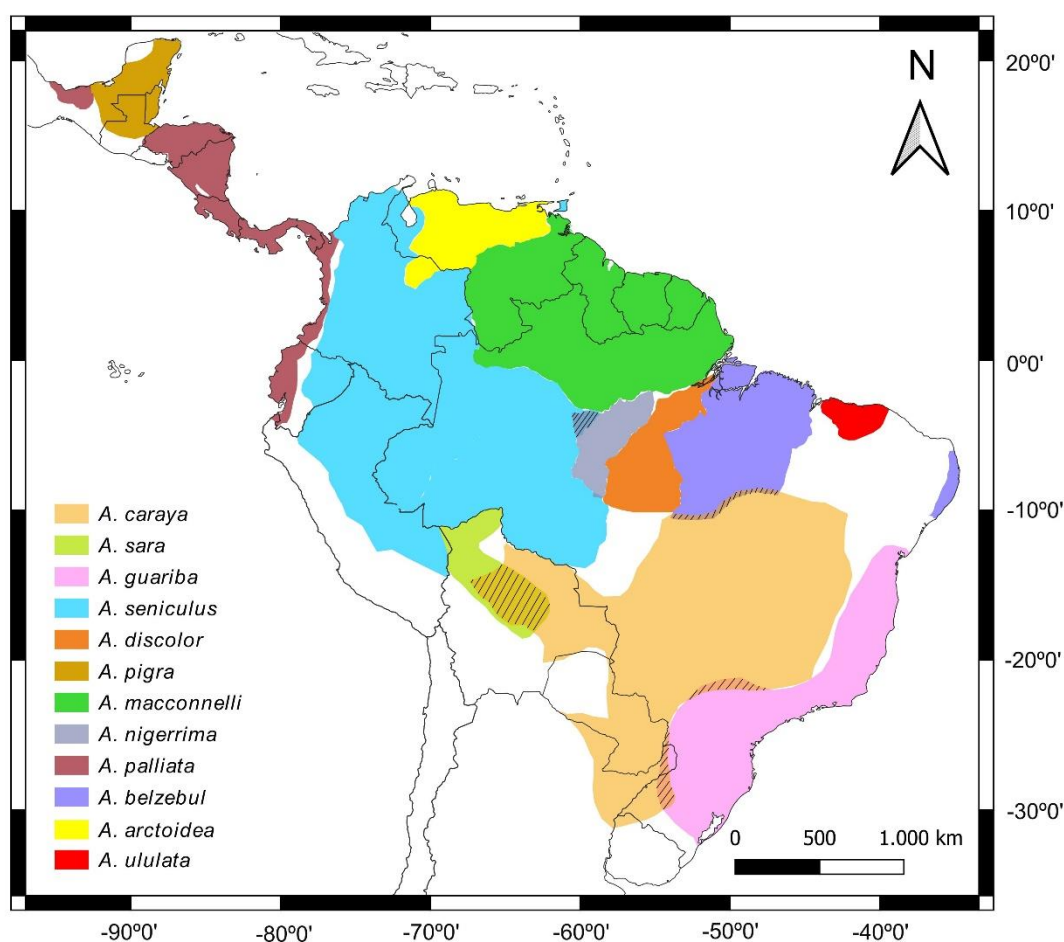


Figura 10: Mapa da distribuição geográfica das espécies reconhecidas do gênero *Alouatta*, segundo Cortés-Ortiz et al. (2015). Informações geográficas estão adaptadas a partir da lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (dados baixados em 28/07/2022).

A história taxonômica do gênero *Alouatta* tem sido longa e complexa envolvendo muitos erros e omissões (Cortés-Ortiz et al 2015). Tais erros têm gerado confusão acerca da validade de muitos taxa dentro do gênero. A primeira revisão sistemática para o gênero *Alouatta* foi conduzida por Hershkovitz (1949) usando caracteres morfológicos. Ele propôs a divisão em três subgrupos, com base na morfologia do osso hioide e sua composição: o grupo *seniculus* (*A. seniculus*, *A. belzebul*, *A. fusca*), o grupo *palliata* (*A. palliata* e *A. pigra*) e finalmente o grupo *caraya* (*A. caraya*). Cabrera (1958) considerou 14 táxons para *Alouatta*, dentro de cinco espécies. Essas cinco espécies também foram reconhecidas por Hill (1962), mas reconheceu 18 taxa. O trabalho de Hill (1962) foi severamente criticado por Hershkovitz (1964), principalmente pela ausência de análise de material na definição de muitos táxons e

pelo inacurado estudo de morfologia comparativa (Gregorin 2006). Rylands (2009) listou 14 espécies de *Alouatta* e 19 táxons. Por fim, o trabalho mais recente sobre taxonomia de *Alouatta* é o de Cortés-Ortiz et al. (2015), que consideraram 12 espécies para o gênero (Tabela 1).

A monofilia de *Alouatta* tem sido reconhecida por diversos autores (e.g., Meireles et al. 1999; Bonvicino et al. 2001; de Oliveira et al. 2002; Cortés-Ortiz et al. 2003; Perelman et al. 2011). Por outro lado, pouco consenso tem sido alcançado sobre as relações filogenéticas dentro de *Alouatta*. Um deles é a divisão do gênero em dois grupos monofiléticos, o clado Sul-americano e o clado mesoamericano (Cortés-Ortiz et al. 2003; Doyle et al. 2021).

Diferentes tipos de dados moleculares e abordagens metodológicas têm sido empregadas para reconstruir a história evolutiva dos guaribas. Um dos primeiros trabalhos a tentar elucidar as relações filogenéticas entre as espécies de *Alouatta* foi o de Meireles et al. (1999), que usou apenas indivíduos de *Alouatta* da América do Sul. Baseado em sequências do pseudogene γ^1 globina, esse estudo apoiou o clado formado por *A. belzebul* e *A. guariba* como espécies irmãs. Esse mesmo arranjo filogenético foi recuperado por Bonvicino et al. (2001), utilizando espécimes da América do Sul, com sequências de citocromo b. Entretanto, observa-se a formação de dois clados principais para a os *Alouatta* da América do Sul. Estudos posteriores, usando diferentes tipos de dados, tais como citogenéticos, morfológicos e de sequências de DNA, têm resultado em hipóteses filogenéticas discordantes para o gênero (de Oliveira et al. 2002; Cortés-Ortiz et al. 2003; Gregorin 2006). Além disso, a maioria dos estudos realizados para *Alouatta* têm incluído uma amostragem taxonômica baixa.

Até o momento, o estudo que utilizou uma amostragem taxonômica mais completa foi o de Cortés-Ortiz et al. (2003). Esse trabalho incluiu as espécies naturais da América Central e a maior parte dos taxa da região Sul-americana. Dois grupos monofiléticos dentro de *Alouatta* foram suportados por esse estudo: o clado Trans-Andino, composto por indivíduos da América Central, e o clado Cis-Andino, composto de indivíduos Sul-americanos. Além disso, dois clados dentro do grupo Sul-americano foram recuperados. Um deles, representa a relação das espécies irmãs, *A. belzebul* e *A. guariba*. Apesar de parcialmente discordantes entre si, os resultados de Meireles et al. (1999), Bonvicino et al.

(2001) e Cortés-Ortiz et al. (2003) mostraram as espécies *A. belzebul* e *A. guariba* como sendo espécies irmãs com suportes moderados a elevados para o clado.

Outro grupo recuperado, por Cortés-Ortiz et al. (2003), para o clado Cis-Andino é o formado por *A. caraya* e o complexo *A. seniculus*, formado por *A. seniculus*, *A. macconnelli* e *A. sara*. A relação *A. caraya/A. seniculus* foi encontrada também por Bonvicino et al. (2001). Outros trabalhos que abordaram a filogenia de *Alouatta* apresentam resultados discordantes com os estudos baseados em sequências de DNA. Mais recentemente, o estudo de Doyle et al. (2021), com sequências de DNA de 14 íntrons nucleares, apresentou um arranjo filogenético diferente dos já propostos para o gênero, com *A. guariba* sendo grupo irmão do resto das espécies Cis-Andina e *A. sara* como espécie irmã de *A. caraya*, mas com a divisão de *Alouatta* em dois grupos Cis e Trans-Andinos, como encontrado por Cortés-Ortiz et al. (2003). O último trabalho, que apresenta uma grande abrangência taxonômica para *Alouatta*, foi o de Janiak et al. (2022), que foi baseado em sequências de DNA do genoma mitocondrial completo. Este último estudo corroborou os resultados obtidos por Cortés-Ortiz et al. (2003).

Os grupos descritos acima não foram recuperados em estudos baseados em citogenética (Oliveira et al. 2002), morfologia (Gregorin 2006) ou sequências de DNA nuclear (Doyle et al. 2021). Dessa forma, o presente estudo tem os objetivos de esclarecer as relações filogenéticas entre as espécies atuais do gênero *Alouatta*, através do uso de sequências de DNA nuclear e mitocondrial, visando contribuir para o conhecimento da sistemática, história natural e evolução deste gênero nas Américas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem, extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Amostras de sangue ou tecido muscular foram obtidas a partir de 37 indivíduos do gênero *Alouatta* provenientes da região Sul-Americana. No total, foram utilizadas nove espécies diferentes de macacos guaribas (*A. belzebul*, *A. caraya*, *A. discolor*, *A. guariba*, *A. macconnelli*, *A. nigerrima*, *A. palliata*, *A. pigra* e *A. sara*). As amostras sequenciadas a partir deste trabalho são descritas a seguir, para espécies, seus códigos e origens geográficas na Tabela 2. Amostras da espécie *A. seniculus* e de duas espécies presumidas, *A. arctoidea* e *A. ululata* (Cortés-Ortiz et al. 2015) não compõem o banco de dados do presente estudo.

Sequências de DNA das espécies *A. sara*, *A. pigra* e *A. palliata* foram retiradas do GenBank (Tabela S1). Para o grupo externo, utilizamos sequências de quatro espécies da família Atelidae, *Ateles paniscus*, *Ateles geoffroyi*, *Lagothrix lagothricha* e *Brachyteles arachnoides* (Tabela S1).

Tabela 2: Espécies sequenciadas neste trabalho, códigos e origem geográfica.

Espécie	Código	Origem geográfica
<i>A. belzebul</i>	AbBrag	Bragança – Pará, Brasil
<i>A. belzebul</i>	AbCAX	Floresta Caxiuanã – Pará, Brasil
<i>A. belzebul</i>	AbANP	Anapu – Pará, Brasil
<i>A. belzebul</i>	Ab297, Ab516, Ab1252, Ab1509	Tucuruí – Pará, Brasil
<i>A. belzebul</i>	Ab38	Xingu, Leste – Pará, Brasil
<i>A. macconnelli</i>	Am2230, Am2502, Am2532, Am2538	Balbina, Leste – Amazonas, Brasil
<i>A. macconnelli</i>	Am2524,	Balbina, Direita – Amazonas, Brasil
<i>A. macconnelli</i>	Am2090	Jari, Leste – Amapá, Brasil
<i>A. macconnelli</i>	Am2094, Am2096, Am2100	Jari, Oeste – Pará, Brasil
<i>A. macconnelli</i>	Am3087	Cachoeira Porteira – Pará, Brasil
<i>A. discolor</i>	Ad	Marajó – Pará, Brasil
<i>A. nigerrima</i>	An65, An84	Itaituba – Pará, Brasil
<i>A. nigerrima</i>	An10	Desconhecido
<i>A. caraya</i>	Aca01, Aca02, Aca03, Aca04	Serra da Mesa – Goiás, Brasil
<i>A. caraya</i>	Aca38, Aca55, Aca58, Aca68, Aca73, Aca80	Centro Argentino de Primatas (CAPRIM)
<i>A. guariba</i>	Ag35, Ag43, Ag44, Ag45, Ag46	Santa Catarina, Brasil
<i>A. paniscus</i>	Atpan	Desconhecido
<i>L. lagothricha</i>	Lla	Desconhecido

O DNA total das amostras de sangue e tecido muscular foi extraído usando o Kit Wizard Genomic (Promega Corporation, Madison, WI, USA) de acordo com as orientações dos fabricantes. Um total de 24 marcadores moleculares de DNA foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR). Cada reação ocorreu em um volume de 15 µL contendo 1 µL de DNA genômico; 2,4 µL de dNTPs (1,25 mM); 1,5 µL de buffer 10x; 0,6 µL de MgCl₂ (25 mM); 0,6 µL de cada primer (50 ng/µL); 0,8 µL de DNA e 0,1 µL de Taq DNA

Polimerase. O protocolo das PCRs foi realizado da seguinte forma: 3 minutos de desnaturação inicial, seguido de 35 passos, cada um com 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 45 segundos de temperatura de hibridização a temperatura variável dependendo do primer (Tabela S2) e 1 minuto a 72 °C de extensão. Por último, usamos uma extensão final de 4 minutos a 72°C, decorrido os 35 passos anteriores. A Tabela S2 apresenta os protocolos de PCR e padrões usados nos programas de cada um dos marcadores moleculares.

As PCR positivas foram purificadas usando o protocolo com PEG (polietilenoglicol) e álcool etílico (Paithankar & Prasad 1991). O sequenciamento de DNA desses marcadores moleculares foi implementado através do método de sequenciamento de Sanger (1977) em um sequenciador automático ABI3500.

2.2 Alinhamento de sequências, modelos evolutivos e descrição de banco de dados

As sequências foram alinhadas no ClustalW (Thompson et al. 1994), após inspeção visual da qualidade dos eletroferogramas dos fragmentos de DNA de cada indivíduo, no programa BioEdit (Hall, 1999). Os modelos evolutivos dos marcadores moleculares foram escolhidos pelo programa Kakusan4 (Tanabe, 2011). A descrição dos níveis de variação de cada marcador foi realizada no programa MEGA11 (Tamura et al. 2021), onde foram calculados os números de sítios variáveis e informativos para parcimônia (Tabela S3). Além disso, foram calculadas, separadamente, as distâncias genéticas médias entre as espécies de *Alouatta* usando dados concatenados (Tabela 3), dados mitocondriais (Tabela S4) e dados nucleares (Tabela S5). As distâncias genéticas foram calculadas usando o modelo K2P (Kimura, 1980).

2.3 Análises filogenéticas e estimativa de tempos de divergência

As análises filogenéticas foram realizadas com base na matriz de sequências concatenadas. As relações filogenéticas foram estimadas através dos métodos de máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB). As análises de máxima verossimilhança foram feitas usando o programa RAxML v.8.2.12 (Stamatakis, 2014) com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. A inferência bayesiana foi realizada no programa MrBayes v.3.2.7 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) com duas Cadeias Markoviana de Monte Carlo (MCMC) independentes. Foram usadas 10 milhões de gerações, com amostragem a cada

1000 e um burn-in de 20%. As análises, tanto do RAxML quanto, do MrBayes, foram feitas na plataforma CIPRES (Miller et al. 2010).

Também foram realizadas análises de inferência filogenética e estimativas de tempos de divergência usando o programa BEAST v.1.8.4 (Drummond et al. 2012). Para estimar a árvore filogenética usamos os modelos escolhidos pelo Kakusan4, ou o que melhor se aproxima (Tabela S3), o relógio molecular estrito e 20 milhões de gerações de MCMC. A qualidade da corrida foi avaliada no Tracer v.1.7 (Rambaut et al. 2018), onde aferimos os valores de ESS>200, indicando convergência da cadeia. O arquivo de árvores foi sumarizado usando o TreeAnnotator v.1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2012).

Para a análise de tempo de divergência empregamos uma corrida com relógio molecular relaxado não correlacionado sob o modelo log-normal. Foi usado o processo de especiação Yule como o prior da árvore, e o melhor modelo escolhido pelo Kakusan4 para o MrBayes, ou o que melhor se aproxima do escolhido (Tabela S3). Para calcular os tempos de divergência foram usados quatro pontos de calibração: (A) a separação entre *Ateles paniscus* e *Ateles geoffroyi* estimada em cerca de 3,7 milhões de anos (Kiesling et al. 2015; Morales-Jimenez et al. 2015); (B) a separação entre *Ateles* e *Lagothrix* + *Brachyteles* estimada em 10.7 milhões de anos (Kiesling et al. 2015); (C) a separação entre *Lagothrix* e *Brachyteles* estimada em cerca de 9,5 milhões de anos (Perelman et al. 2011; Kiesling et al. 2015) e (D) o fóssil *Stirtonia tatacoensis*, que data de 12,6-13,7 milhões de anos (Rosenberger 2015), como ponto de calibração do nó que agrupa *Alouatta*, e seu grupo irmão (*Lagothrix*, *Brachyteles* e *Ateles*). Para os pontos de calibração A, B e C, foram usados uma distribuição normal com desvio padrão de 0.5. Nós utilizamos o fóssil *S. tatacoensis* para calibrar o ancestral comum mais recente de Atelidae sob uma distribuição lognormal com média = 13 e sigma = 0.5. Foram realizadas quatro corridas independentes de 20 milhões de gerações cada. A convergência das corridas foi avaliada no Tracer v.1.7 (Rambaut et al. 2018), onde valores de ESS acima de 200 foram considerados satisfatórios. Os arquivos de log e de árvores foram combinados no LogCombiner v1.8.4 (Drummond et al. 2012). E por fim, o arquivo das árvores foi sumarizado usando o TreeAnnotator v.1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2012).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização dos dados e distâncias genéticas

Os dados concatenados forneceram uma matriz de dados com um total de 16.093 pb, 14.481 do DNA nuclear e 1.612 do DNA mitocondrial. No geral, cerca de 9% dessa matriz são dados faltantes, por não estarem disponíveis no GenBank ou por problemas de amplificação. A Tabela S3 mostra os modelos de substituição de nucleotídeos escolhidos pelo Kakusan4, para cada marcador molecular, bem como número de sítios variáveis e informativos para parcimônia. Os marcadores mitocondriais mostraram maiores números de sítios variáveis e informativos para parcimônia do que os marcadores nucleares. A distância genética, considerando os dados concatenados, entre os guaribas e os gêneros *Ateles*, *Brachyteles* e *Lagothrix* foi de, aproximadamente, 4,8%. A distância genética teve uma média de aproximadamente 1,7 % entre as espécies de *Alouatta*, variando de 0,28% (*A. discolor* x *A. belzebul*) a 4,81% (*A. sara* x *A. pigra*) (Tabela 3). A distância genética com o DNA mitocondrial foi cerca de 7 vezes maior que a distância para o DNA nuclear. Dentro de *Alouatta*, a distância genética, para o DNA mitocondrial, teve uma média de 5,7%, variando de 0,64% entre *A. nigerrima*/*A. macconnelli* e 8,04% entre *A. palliatta*/*A. sara* (Tabela S4). O DNA nuclear apresentou uma média bem menor, de 0,75% entre as espécies do gênero. A menor distância foi de 0.04% entre *A. belzebul*/*A. discolor*, a maior distância foi de 1.34%, que se deu entre *A. pigra*/*A. discolor* (Tabela S5).

Tabela 3: Distância genética média, em porcentagem, estimada entre as espécies de *Alouatta* e outros gêneros da família Atelidae usando o modelo K2P, a partir dos marcadores concatenados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 - <i>A. belzebul</i>											
2 - <i>A. discolor</i>	0.28										
3 - <i>A. guariba</i>	1.13	1.57									
4 - <i>A. nigerrima</i>	1.12	1.68	1.16								
5 - <i>A. macconnelli</i>	1.15	1.70	1.21	0.14							
6 - <i>A. caraya</i>	1.22	1.76	1.31	1.06	1.11						
7 - <i>A. palliata</i>	1.71	2.34	1.72	1.70	1.71	1.80					
8 - <i>A. sara</i>	1.30	2.71	1.63	0.89	0.86	1.23	2.26				
9 - <i>A. pigra</i>	2.00	2.94	2.21	2.40	2.34	2.38	1.56	4.81			
10 - <i>Lagothrix</i>	4.36	5.36	4.60	4.43	4.52	4.57	4.73	6.32	6.83		
11 - <i>Ateles</i>	4.32	5.56	4.42	4.34	4.37	4.37	4.63	5.01	5.21	3.51	
12 - <i>Brachyteles</i>	4.73	6.03	4.77	4.58	4.72	4.72	5.08	5.14	5.92	3.52	3.62

3.2 Análise filogenética

Os resultados das análises filogenéticas (máxima verossimilhança e inferência bayesiana) foram congruentes entre si em topologia de árvore. Considerando as análises bayesianas realizadas no MrBayes e de máxima verossimilhança, feitas no RAxML, sete das nove espécies, consideradas neste estudo, apresentaram valores máximos de suporte de PP e bootstrap (Figura 11). O único táxon que não foi recuperado com um valor alto de suporte foi a espécie *A. belzebul*, que é estreitamente relacionada com a espécie *A. discolor*. A espécie *A. belzebul* foi recuperada com um suporte de 0.84 de PP, com o MrBayes e com suporte de 65% com o RAxML.

pigra. Cada uma dessas espécies e sua relação entre si foram recuperadas com suportes máximos de PP e *bootstrap*. As árvores filogenéticas inferidas através do BEAST foram idênticas, em topologia, às árvores de IB e MV. Os resultados do BEAST forneceram suporte máximo para cada uma das espécies deste trabalho (Figura 12).

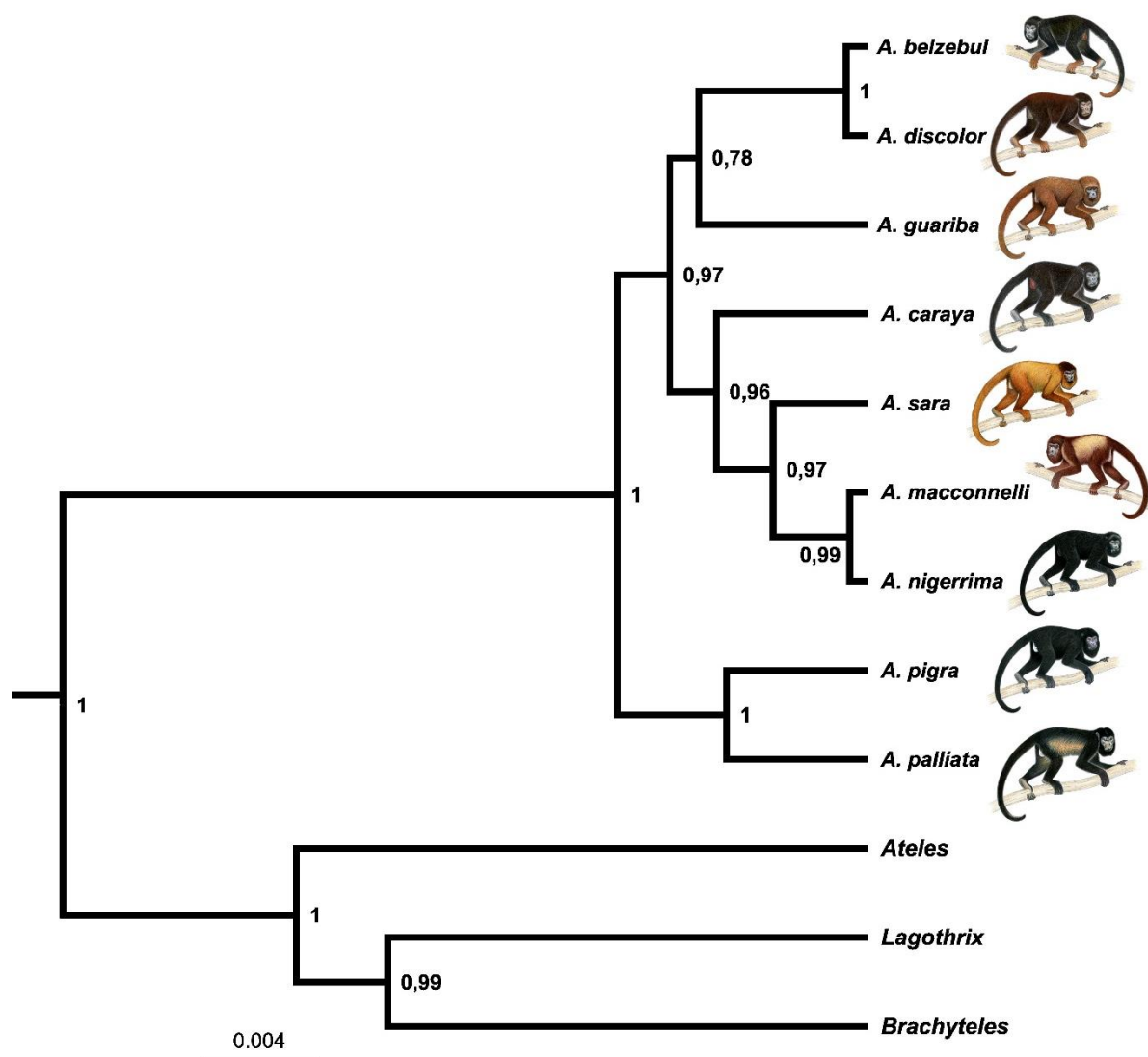


Figura 12: Árvore filogenética do gênero *Alouatta*, baseada em inferência bayesiana, no BEAST com loci mitocondriais e nucleares. Números em cada nó indicam as probabilidades posteriori. Ilustrações: Stephen Nash

3.3 Tempos de divergência

As análises de tempo de divergência usando relógio relaxado indicaram uma data de início da diversificação de *Alouatta* há 5,60 Ma, com um “*Highest Posterior Density*”

95% (HPD 95%) variando de 3,99 a 6,83 Ma (Figura 13). Após a separação inicial do gênero houve a divisão em dois clados, dentro dos *Alouatta* Sul-americanos, há 4,47 Ma [HPD 95%, 3,68–5,34 Ma]. Os dois grupos de *Alouatta* da América do Sul formados nessa data se diversificaram em datas próximas, o complexo *A. belzebul* se separou de *A. guariba* há 3,82 [HPD 95%, 2,50–4,91 Ma], enquanto *A. caraya* separou-se do complexo *A. seniculus* há 3,62 Ma [HPD 95%, 2,57–4,85 Ma]. A maioria dos eventos de especiação ocorreram durante o Plioceno. As especiações mais recentes, as separações *A. nigerrima*/*A. macconnelli* e *A. discolor*/*A. belzebul*, foram indicadas como tendo ocorrido há ~1,5 Ma (Tabela 4).

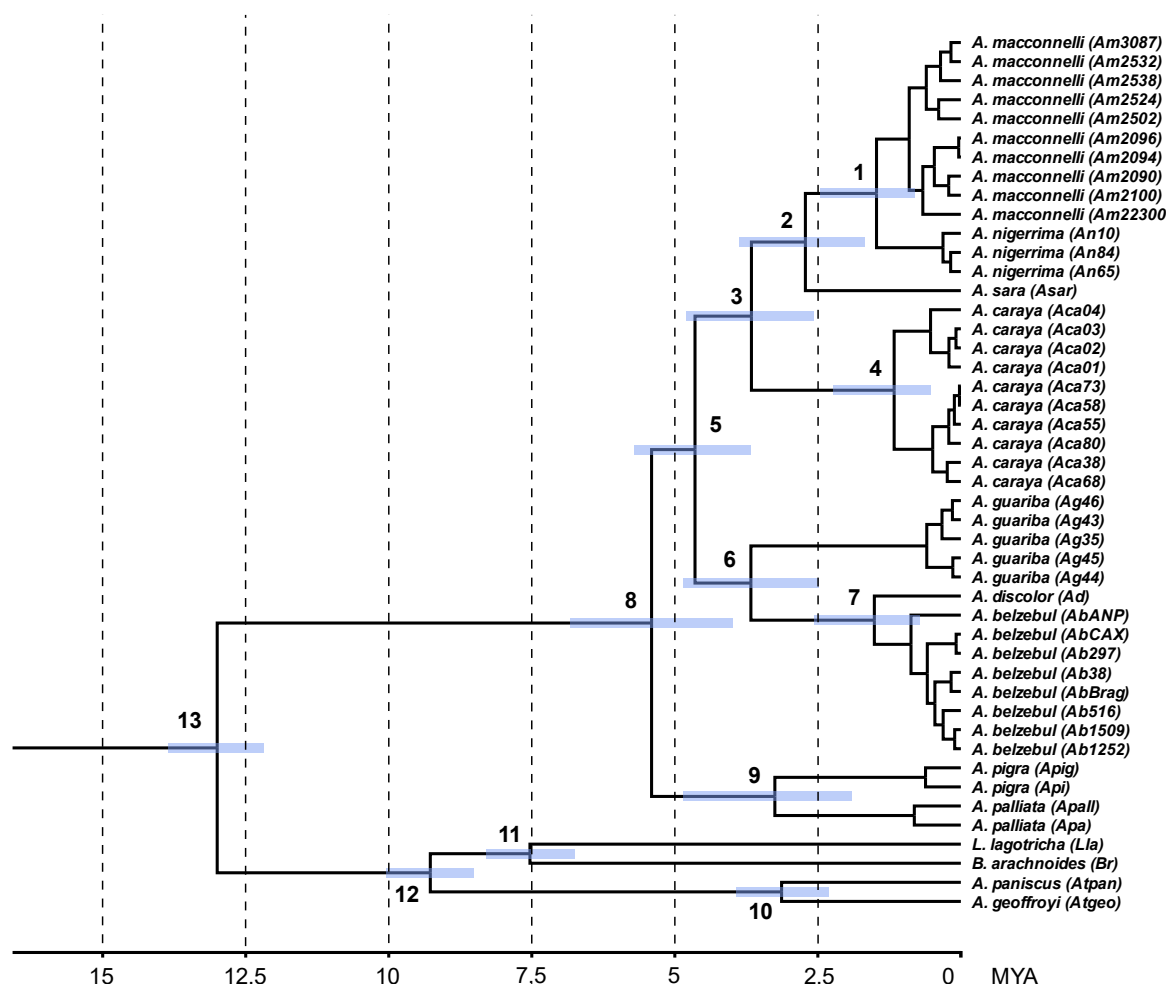


Figura 13: Tempos de divergência estimados para *Alouatta*, através do BEAST, usando 24 marcadores moleculares, de DNA mitocondrial e DNA nuclear. Os números em cada nó estão referenciados na tabela 4

Tabela 4: Medianas de datas dos nós e intervalos HPD 95%, em milhões de anos (Ma), estimadas usando todos os marcadores concatenados, com análises usando relógio molecular relaxado não correlacionado sob distribuição Lognormal.

Nó na Fig. 3	Idade (Ma)	95% HPD (Ma)
1	1,51	0,79 – 2,48
2	2,69	1,51 – 3,19
3	3,62	2,57 – 4,85
4	1,21	0,34 – 2,46
5	4,47	3,68 – 5,34
6	3,82	2,50 – 4,91
7	1,48	0,52 – 2,51
8	5,60	3,99 – 6,83
9	3,21	1,89 – 4,89
10	3,07	2,39 – 3,68
11	7,50	6,83 – 8,16
12	9,25	8,24 – 10,01
13	12,95	12,19 – 13,76

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho tirou proveito de uma matriz de sequências de DNA de 16.903 pb para fazer inferências filogenéticas dos macacos guariba. Estudos filogenéticos anteriores com *Alouatta* têm mostrado discordâncias, provavelmente devido a limitação de amostragem taxonômica e o uso de diferentes marcadores genéticos, como sequências de DNA, citogenética e morfologia. A nossa hipótese filogenética apresentada aqui é concordante com os resultados de estudos prévios baseados em DNA mitocondrial (Bonvicino et al. 2001; Cortés-Ortiz et al 2003).

Este trabalho apresentou, pela primeira vez, inferências baseadas em sequências de DNA nuclear dos taxa *A. nigerrima* e *A. discolor* provenientes de locais conhecidos. Essas duas espécies são proximamente relacionadas às espécies *A. macconnelli* e *A. belzebul*, respectivamente. Alguns autores mais recentes consideram *A. discolor* como uma espécie válida (Gregorin 2006; Cortés-Ortiz et al. 2015), ao passo que outros são mais conservadores e mantêm *A. discolor* no status de subespécie, ou até como sinônimo de *A. belzebul* (e.g Rylands et al. 2000; Groves 2001, 2005). Baseado em nossos resultados, suportamos a espécie *A. discolor*, pertencente ao grupo *A. belzebul* como válida. Da mesma forma, *A. nigerrima* também pode ser considerada espécie válida, proximamente relacionada à *A. macconnelli*, resultado que vai contra arranjos taxonômicos mais antigos (Hershkovitz 1949; Cabrera 1958; Hill 1962).

O complexo *A. seniculus*, da Amazônia, é um grupo que apresenta alta diversidade em *Alouatta*, e devido dificuldades de obter uma amostragem taxonômica e geográfica ampla, muitos estudos apresentam esse tipo de limitação em seus resultados. Uma limitação do presente estudo é a ausência de *A. seniculus*, que é considerado mais próximo de *A. sara*, ao invés de *A. macconnelli* (Cortés-Ortiz et al. 2003; Ruiz-Garcia et al. 2017).

O gênero *Alouatta* está separado em dois grupos bem suportados: o clado Trans-Andino e o clado Cis-Andino. A formação desses dois principais grupos na filogenia de *Alouatta* é congruente com a hipótese de sua diversificação ter se iniciado pela vicariância andina (Cortés-Ortiz et al. 2003). As análises de datação usando relógio molecular relaxado e estrito resultaram em uma estimativa de tempo da diversificação entre os grupos Sul-americano e Mesoamericano que coincide com o período de formação do norte dos Andes (Lundberg et al. 1998). Além disso, a data estimada para o ancestral comum mais recente do

grupo Trans-Andino é mais recente que o tempo de especiação entre os dois principais grupos do clado Sul-americano (Figura 13).

Os macacos guaribas da América Central estudados aqui são classificados em duas espécies, ambas bem apoiadas em nossa filogenia. Esse resultado corrobora estudos prévios da sistemática de *Alouatta*, que suporta uma relação de espécies irmãs entre *A. palliata* e *A. pigra* (Cortés-Ortiz et al. 2003; Doyle et al. 2021 Ruiz-García et al. 2017). Hipotiza-se que a origem evolutiva dos macacos guariba da Mesoamérica pode ser explicada através da invasão de um ancestral comum a partir da América do Sul (Ellsworth et al. 2006; Smith 1970). A data estimada para a diversificação entre *A. palliata* e *A. pigra* coincide com o período de formação da ponte de terra que conecta a América Central e América do Sul, há cerca de 3,5 milhões de anos (Hoorn et al. 2010). Além disso, há diferentes hipóteses para explicar a origem dessas duas espécies irmãs: uma envolve dispersão única para a América Central e subsequente especiação das duas espécies da Mesoamérica; a segunda é a de invasão dupla da América Central por ancestrais da região Trans-Andina da América do Sul (Smith 1970). Assim, com esse cenário evolutivo complexo, as causas subjacentes à separação de *A. palliata* e *A. pigra* ainda permanecem incertas. Apesar disso, análises genéticas mostraram que os gêneros *Ateles* e *Alouatta* da Mesoamérica compartilham seus ancestrais comuns que datam de um período logo após o fechamento do Istmo do Panamá (Cortés-Ortiz et al. 2003; Morales-Jimenez et al. 2015).

Os principais eventos de especiação que deram origem às espécies ou grupos de espécies de *Alouatta* ocorreram durante a época do Plioceno (2 a 5 milhões de anos). Datas de separação similares também são vistas no gênero *Ateles* e outros gêneros de primatas do novo mundo (Morales-Jimenez et al. 2015; Janiak et al. 2022; Kiesling et al. 2015; Springer et al. 2012). Além disso, alguns pares de espécies de macacos guariba mostraram datas de diversificação mais recentes, compreendidos dentro do Pleistoceno. Esses eventos recentes de especiação são observados, por exemplo, nos pares *A. macconnelli*–*A. nigerrima* e *A. belzebul*–*A. discolor*, que compreendem as espécies com origem mais recente em *Alouatta*.

A primeira diversificação dentro do grupo Sul-americano ocorreu por volta de 5 Ma (Figura 13). Esse evento cladogenético deu origem ao ancestral comum do complexo *A. belzebul* e *A. guariba* (taxa que ocupam a floresta amazônica e Mata Atlântica, respectivamente) e ao ancestral do grupo irmão, *A. caraya* e complexo *A. seniculus*. Essa data coincide com a formação do Rio Amazonas transcontinental, durante o Mioceno tardio

e Plioceno (Albert et al. 2018). Assim, dada a distribuição geográfica atual de espécies de macacos guariba ao sul e ao norte do Rio Amazonas, o cenário biogeográfico está de acordo com a hipótese de rios como barreiras (Wallace 1852) para explicar essa diversificação inicial do grupo Sul-americano de *Alouatta*. A hipótese de Wallace também foi empregada por Cortés-Ortiz et al. (2003) para explicar esse evento de cladogênese entre os *Alouatta* sul-americanos.

Na América do Sul os macacos guariba formam um clado bem suportado que, por sua vez, é dividido em outros dois clados. Um formado pelo par *A. caraya* / complexo *A. seniculus*, outro formado pelo grupo irmão, *A. guariba* / complexo *A. belzebul*. A origem do grupo formado pelo complexo *A. belzebul* e *A. guariba* pode ter se dado devido à mudanças climáticas, que resultou em um clima seco, redução de florestas e expansão de savanas, dando origem à separação da Amazônia e Mata Atlântica (Hoorn et al 2010; Machado et al. 2021). A distribuição de *A. guariba* está restrita à Mata Atlântica, enquanto que o complexo *A. belzebul* pode ocorrer no leste da Amazônia, na Caatinga e na Mata atlântica do nordeste brasileiro (Cortés-Ortiz et al. 2015). A ocorrência de linhagens de *A. belzebul*, praticamente, ao longo da principal rota de conexão passada entre Mata Atlântica e Amazônia (Machado et al. 2021) é uma evidência fraca de conexões mais antigas, que foi rompida pelo desenvolvimento da diagonal seca.

Um outro grupo, de *Alouatta*, formado dentro do continente Sul-americano é composto por *A. caraya* e o complexo *A. seniculus*. A divisão entre esses dois grupos se deu há 3,62 Ma [HPD 95%, 2,57–4,85 Ma]. A distribuição de *A. caraya* não coincide com nenhuma barreira geográfica clara (Cortés-Ortiz et al. 2003). Além disso, essa espécie pode ser encontrada em diferentes partes do continente Sul-americano, incluindo o Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia e áreas de savanas secas ou úmidas (Bicca-Marques et al. 2008). *A. caraya* pode ocorrer em simpatria com *A. guariba*, na Mata Atlântica, chegando a formar híbridos (Bicca-Marques et al. 2008). Essa espécie também pode ocorrer em simpatria com *A. sara*, mas não registros de formação de híbridos essas duas espécies. A espécie *A. sara* está filogeneticamente inserida dentro do complexo *A. seniculus*, e observa-se que não é grupo irmão de *A. caraya*, como sugerido por Doyle et al. (2021).

Esse trabalho analisou parcialmente o complexo de espécies *A. seniculus*. Deste grupo, incluímos, em nossas análises, as espécies *A. macconnelli*, *A. nigerrima* e *A. sara*. Esse complexo de espécies apresenta índices elevados de variação morfológica, citogenética

e de aloenzimas (Hill 1962; Gregorin 2006; Vassart et al. 1996; Minezawa et al. 1985; Pope 1992; Stanyon et al. 1995; Sampaio et al. 1996). Nossos resultados confirmam o status taxonômico de taxa elevados, recentemente, ao nível de espécie, e.g. *A. sara* e *A. macconnelli*, tratadas, anteriormente, como subespécies de *A. seniculus* (Hill 1962), e consideradas posteriormente como espécies válidas (Minezawa et al. 1985; Cortés-Ortiz et al. 2003). A espécie *A. caraya* é irmã desse complexo de espécies, formando o clado 3 na figura 13. Esse grupo também foi recuperado com valores de suporte máximos para IB e de 93% para MV (Figura 11). Outros trabalhos de filogenia realizados em *Alouatta*, ou mostram suporte baixo a moderado para o clado 3 (Bonvicino et al. 2001; Cortés-Ortiz et al. 2003, Ruiz-García et al. 2017), ou resultaram em topologias discordantes da apresentada aqui (Oliveira et al. 2002; Villalobos et al. 2004; Doyle et al. 2021). Assim, a formação de dois grupos dentro do clado Sul-americano de *Alouatta* não é consenso. Provavelmente, esses resultados discordantes se dão em virtude da elevada proporção de dados faltantes na matriz de dados, baixa amostragem taxonômica, ou até equívocos feitos durante preparo das análises, como a inclusão do fóssil *Stirtonia tatacoensis* como ancestral comum mais recente de todos os *Alouatta* amostrados e o uso de sequências outliers.

Com exceção do trabalho de Cortés-Ortiz et al. (2003), que usaram genes nucleares que não mostraram sinal filogenético, o único estudo multilocus é o de Doyle et al. (2021). Nesse trabalho, os autores não tiveram acesso a todos os taxa do complexo *A. seniculus*, como a própria espécie *A. seniculus* e o táxon venezuelano *A. arctoidea*, considerado uma espécie independente por Stanyon et al. (1995). A confirmação desta hipótese deve ser baseada em uma amostragem taxonômica, e genômica, mais completa de *Alouatta*, especialmente incluindo taxa da vivente no oeste da Amazônia.

5. CONCLUSÕES

O gênero *Alouatta* está dividido em dois grupos: Mesoamericano e Sul-americano. As espécies Sul-americanas do gênero *Alouatta* podem ser divididas em dois grupos monofiléticos, um que relaciona como irmãos o complexo *A. belzebul* e *A. guariba* e outro grupo formado por *A. caraya* e pelo complexo de espécies amazônicas *A. seniculus*. As principais diversificações dentro dos grupos Sul-americano e Mesoamericano ocorreram durante a época do Plioceno. O complexo *A. belzebul* e *A. guariba* são grupos irmãos, sugerindo uma conexão histórica entre a Amazônia e a Mata Atlântica, que data do Plioceno. As espécies *Alouatta nigerrima* e *Alouatta discolor* podem ser consideradas linhagens distintas, com histórias evolutivas independentes. A origem dessas duas espécies ocorreu durante o Pleistoceno, e estão entre as espécies com origem e diversificação mais recente dentro do gênero.

6. REFERÊNCIAS

- Albert, J. S., Val, P., & Hoorn, C. (2018). The changing course of the Amazon River in the Neogene: center stage for Neotropical diversification. *Neotropical Ichthyology*, 16(3): e180033
- Bicca-Marques, J. C., Prates, H. M., de Aguiar, F. R. C., & Jones, C. B. (2008). Survey of *Alouatta caraya*, the black-and-gold howler monkey, and *Alouatta guariba clamitans*, the brown howler monkey, in a contact zone, State of Rio Grande do Sul, Brazil: evidence for hybridization. *Primates*, 49(4): 246-252.
- Bonvicino, C. R., Lemos, B., & Seuánez, H. N. (2001). Molecular phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini). *Chromosoma*, 110(3): 241-246.
- Bravo, S. P. (2022). The role of howler monkeys (*Alouatta caraya*) in the primary succession of the Paraná flooded forest (Argentina). *Biotropica*, 54(1): 71-77.
- Cabrera A (1939). Los monos de Argentina. *Physis* (16): 3–29
- Cabrera, A. (1958). Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*, Ciencia Zoologica, Buenos Aires, 4(1): 1-307.
- Cortés-Ortiz, L., Bermingham, E., Rico, C., Rodríguez-Luna, E., Sampaio, I., & Ruiz-García, M. (2003). Molecular systematics and biogeography of the neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26(1): 64-81.
- Cortés-Ortiz, L., Rylands, A. B., & Mittermeier, R. A. (2015). The taxonomy of howler monkeys: integrating old and new knowledge from morphological and genetic studies.

In *Howler Monkeys Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (pp. 55-84). Springer, New York, NY.

Doyle, E. D., Prates, I., Sampaio, I., Koiffmann, C., Silva, W. A., Carnaval, A. C., & Harris, E. E. (2021). Molecular phylogenetic inference of the howler monkey radiation (Primates: *Alouatta*). *Primates*, 62(1): 177-188.

Drummond, A. J. Suchard, M. A. Xie, D. & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8): 1969–1973

Ellsworth, J. A., & Hoelzer, G. A. (2006). Genetic evidence on the historical biogeography of Central American howler monkeys. In *Primate biogeography* (pp. 81-103). Springer, Boston, MA.

Estrada A, Coates-Estrada R (1984). Some observations on the present distribution and conservation of *Alouatta* and *Ateles* in southern Mexico. *American Journal of Primatology*, 7: 133–137.

Gregorin, R. (2006). Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. *Revista brasileira de Zoologia*, 23: 64-144.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95-98.

Hershkovitz, P. (1949). Mammals of Northern Colombia, preliminary report no. 4: monkeys (Primates), with taxonomic revisions of some forms. *Proceedings of the United States National Museum*. 98: 232–427.

Hershkovitz, P. 1964. Review: Primates, comparative anatomy and taxonomy. V. Cebidae, part B. A monography, by W. C. Osman Hill. A critical review with a summary of the volumes on New World primates. *American Journal Physical Anthropology* 21(3): 391-398 (1963).

Hill, W. C. O. (1962). *Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy. Cebidae (part B): a Monograph*. University Press. Edinburgh.

Hoorn, C., Wesselingh, F. P., ter Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C. L., Figueiredo, J. P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F. R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T. & Antonelli, A. (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330: 927–931.

Kiesling, N. M. J., Soojin, V. Y., Xu, K., Sperone, F. G., & Wildman, D. E. (2015). The tempo and mode of New World monkey evolution and biogeography in the context of phylogenomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82: 386-399.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.

Janiak M.C, Silva F.E, Beck R.M.D, de Vries D, Kuderna L.F.K, Torosin N.S, Melin A.D, Marquês-Bonet T, Goodhead I.B, Messias M, da Silva M.N.F, Sampaio I, Farias I.P, Rossi R, de Melo F.R, Valsecchi J, Hrbek T, Boubli J.P. (2022). Two hundred and five newly

assembled mitogenomes provide mixed evidence for rivers as drivers of speciation for Amazonian primates. *Molecular Ecology*. 31(14): 3888-3902.

Johnson, J., Muren, E., Swofford, R., Turner-Maier, J., Marinescue, V. D., Genereux, D. P., Lindblad-Toh, K. (2018). The 200 mammals project: sequencing genomes by a novel cost-effective method, yielding a high-resolution annotation of the human genome. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PVIB000000000.1/>

Lundberg, J. G., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M. C. S. L., & Wesselingh, F. (1998). The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, 27: 13-48.

Machado, A. F., Ritter, C. D., Miranda, C. L., Bredin, Y. K., Ramos Pereira, M. J., & Duarte, L. (2021). Potential mammalian species for investigating the past connections between Amazonia and the Atlantic Forest. *PLoS one*, 16(4), e0250016.

Meireles, C. M., Czelusniak, J., Ferrari, S. F., Schneider, M. P. C., & Goodman, M. (1999). Phylogenetic relationships among Brazilian howler monkeys, genus *Alouatta* (Platyrrhini, Atelidae), based on g1-globin pseudogene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 22: 337-344.

Miller M. A., Pfeiffer W. & Schwartz T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA: 1-8.

Minezawa, M., Harada, M., Otto, C. J. C., & C Jaime, V. B. (1986). Cytogenetics of Bolivian endemic red howler monkeys (*Alouatta seniculus sara*): accessory chromosomes and Y-autosome translocation related numerical variations. *Kyoto University overseas research reports of new world monkeys*, (5): 7-16.

Morales-Jimenez, A. L., Disotell, T., & Di Fiore, A. (2015). Revisiting the phylogenetic relationships, biogeography, and taxonomy of spider monkeys (genus *Ateles*) in light of new molecular data. *Molecular phylogenetics and evolution*, 82: 467-483.

Oliveira, E.H.C; M. Neusser; W.B. Figueiredo; C. Nagamachi; J.C.Pieczarka; I.J. Sbalqueiro; J. Wienberg & S. Muller. (2002). The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*, Exceter, 10 (8): 669-683.

Paithankar, K. R. Prasad, K. S. (1991). Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*, 19(6): 1346.

Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuanez, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumpler, Y., Schneider, M. P., Silva, A., O'Brien, S. J., Pecon-Slaterry, J. A., (2011). Molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7: e1001342.

Pope, T. R. (1992). The influence of dispersal patterns and mating system on genetic differentiation within and between populations of the red howler monkey (*Alouatta seniculus*). *Evolution*, 46(4): 1112-1128.

- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5): 901-904.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572-1574.
- Rosenberger, A. L., Cooke, S. B., Halenar, L. B., Tejedor, M. F., Hartwig, W. C., Novo, N. M., & Muñoz-Saba, Y. (2015). Fossil alouattines and the origins of *Alouatta*: craniodental diversity and interrelationships. In *Howler Monkeys Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (pp. 21-54). Springer, New York, NY.
- Ruiz-García, M., Cerón, Á., Sánchez-Castillo, S., Rueda-Zozaya, P., Pinedo-Castro, M., Gutierrez-Espeleta, G., & Shostell, J. M. (2017). Phylogeography of the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*; Atelidae, Primates) across its geographical range by means of mitochondrial genetic analyses and new insights about the phylogeny of *Alouatta*. *Folia Primatologica*, 88(5): 421-454.
- Rylands, A. B., & Mittermeier, R. A. (2009). The diversity of the New World primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy. In *South American Primates* (pp. 23-54). Springer, New York, NY.
- Sampaio, I., Schneider, M. P. C., & Schneider, H. (1996). Taxonomy of the *Alouatta seniculus* group: Biochemical and chromosome data. *Primates*, 37(1): 65-73.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12): 5463-5467.
- Smith, J. D. (1970). The systematic status of the black howler monkey, *Alouatta pigra* Lawrence. *Journal of mammalogy*, 51(2): 358-369.
- Springer, M. S., Meredith, R. W., Gatesy, J., Emerling, C. A., Park, J., Rabosky, D. L., Stadler, T., Steiner, C., Ryder, O. A., Janecka, J. E., Fisher, C. A. & Murphy, W. J. (2012). Macroevo-lutionary dynamics and historical biogeography of primate diversification inferred from a species supermatrix. *PloS one*, 7(11): e49521.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312-1313.
- Stanyon, R., Tofanelli, S., Morescalchi, M. A., Agoramoorthy, G., Ryder, O. A., & Wienberg, J. (1995). Cytogenetic analysis shows extensive genomic rearrangements between red howler (*Alouatta seniculus*, Linnaeus) subspecies. *American Journal of Primatology*, 35(3): 171-183.
- Tanabe, A. S. (2011). Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources*, 11(5): 914-921.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22): 4673-4680.

- Vassart, M., Guedant, A., Vlé, J. C., Keravec, J., Seguela, A., & Volobouev, V. T. (1996). Chromosomes of *Alouatta seniculus* (Platyrrhini, Primates) From French Guina. *Journal of Heredity*, 87(4): 331-334.
- Villalobos, F., Valerio, A. A., & Retana, A. P. (2004). A phylogeny of howler monkeys (Cebidae: *Alouatta*) based on mitochondrial, chromosomal and morphological data. *Revista de Biología Tropical*, 52(3): 665-677.
- Wallace, A. R. (1854). On the monkeys of the Amazon. *Annals and Magazine of Natural History*, 14(84): 451-454.

ANEXO I

Tabela S1: Relação das espécies, marcadores moleculares, origem geográfica, código de acesso GenBank/ENA e referências.

Marcador	Espécie	Origem geográfica	Acesso GenBank/ENA	Referência
m003	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m003	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC760246	Kiesling et al. (2015)
m003	<i>Alouatta pigra</i>	México	MT903797	Doyle et al. (2021)
m003	<i>Alouatta pigra</i>	México	MT903803	Doyle et al. (2021)
m003	<i>Alouatta sara</i>	No Location	MT903815	Doyle et al. (2021)
m003	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m003	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC760250	Kiesling et al. (2015)
m254	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m254	<i>Alouatta palliata</i>	Mexico	MT903877	Doyle et al. (2021)
m254	<i>Alouatta pigra</i>	Mexico	MT903878	Doyle et al. (2021)
m254	<i>Alouatta pigra</i>	Mexico	MT903879	Doyle et al. (2021)
m254	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m254	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761590	Kiesling et al. (2015)
m011	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m011	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC760370	Kiesling et al. (2015)
m011	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m011	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC760374	Kiesling et al. (2015)
LRPPRC_169	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
LRPPRC_169	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	HM761141	Perelman et al. (2011)
LRPPRC_169	<i>Alouatta sara</i>	San-Diego, CA, US	HM761142	Perelman et al. (2011)
LRPPRC_169	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m271	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m271	<i>Alouatta palliata</i>	Mexico	MT903772	Doyle et al. (2021)
m271	<i>Alouatta pigra</i>	Mexico	MT903774	Doyle et al. (2021)
m271	<i>Alouatta pigra</i>	Mexico	MT903773	Doyle et al. (2021)
m271	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m271	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761772	Kiesling et al. (2015)
TTR	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
TTR	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	HM757718	Perelman et al. (2011)
TTR	<i>Alouatta sara</i>	San-Diego, CA, US	HM757719	Perelman et al. (2011)
TTR	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
TTR	<i>Brachyteles arachnoides</i>	INCA	HM757704	Perelman et al. (2011)
GHR	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
GHR	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	HM761468	Perelman et al. (2011)
GHR	<i>Alouatta sara</i>	San-Diego, CA, US	HM761464	Perelman et al. (2011)
GHR	<i>Lagothrix lagotricha</i>	CCR	HM761491	Perelman et al. (2011)
GHR	<i>Ateles paniscus</i>	FRZB	HM761490	Perelman et al. (2011)
GHR	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
AXIN1	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
AXIN1	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	HM764315	Perelman et al. (2011)
AXIN1	<i>Alouatta sara</i>	San-Diego, CA, US	HM764316	Perelman et al. (2011)
AXIN1	<i>Lagothrix lagotricha</i>	CCR	HM764300	Perelman et al. (2011)
AXIN1	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
AXIN1	<i>Brachyteles arachnoides</i>	INCA	HM764298	Perelman et al. (2011)

m194	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m194	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC761127	Kiesling et al. (2015)
m194	<i>Alouatta sara</i>	No Location	MT903847	Doyle et al. (2021)
m194	<i>Alouatta pigra</i>	Mexico	MT903846	Doyle et al. (2021)
m194	<i>Ateles paniscus</i>	MGTC	KC761130	Kiesling et al. (2015)
m194	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m194	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761131	Kiesling et al. (2015)
m043_044	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m043_044	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC760664	Kiesling et al. (2015)
m043_044	<i>Ateles paniscus</i>	MGTC	KC760667	Kiesling et al. (2015)
m043_044	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m043_044	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC760668	Kiesling et al. (2015)
BRCA2	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
BRCA2	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	HM763720	Perelman et al. (2011)
BRCA2	<i>Alouatta sara</i>	San-Diego, CA, US	HM763721	Perelman et al. (2011)
BRCA2	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
BRCA2	<i>Brachyteles arachnoides</i>	INCA	HM763704	Perelman et al. (2011)
mC17_01	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
mC17_01	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC762030	Kiesling et al. (2015)
mC17_01	<i>Lagothrix lagotricha</i>	BCNP	KC762033	Kiesling et al. (2011)
mC17_01	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m266	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m266	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC761711	Kiesling et al. (2015)
m266	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m266	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761715	Kiesling et al. (2011)
m263	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m263	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC761647	Kiesling et al. (2015)
m263	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m263	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761651	Kiesling et al. (2015)
m265	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m265	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC761678	Kiesling et al. (2015)
m265	<i>Alouatta sara</i>	No Location	MT903780	Doyle et al. (2021)
m265	<i>Lagothrix lagotricha</i>	BCNP	KC761683	Kiesling et al. (2015)
m265	<i>Ateles paniscus</i>	MGTC	KC761681	Kiesling et al. (2015)
m265	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m265	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761682	Kiesling et al. (2015)
m258	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m258	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC761616	Kiesling et al. (2015)
m258	<i>Alouatta sara</i>	No Location	MT903790	Doyle et al. (2021)
m258	<i>Alouatta pigra</i>	Mexico	MT903787	Doyle et al. (2021)
m258	<i>Alouatta pigra</i>	Mexico	MT903789	Doyle et al. (2021)
m258	<i>Ateles paniscus</i>	MGCT	KC761619	Kiesling et al. (2015)
m258	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m258	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761620	Kiesling et al. (2015)
m220	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
m220	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC761388	Kiesling et al. (2015)
m220	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
m220	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC761392	Kiesling et al. (2015)
mC18	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
mC18	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC762089	Kiesling et al. (2015)
mC18	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
DENND5A	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)

DENND5A	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	HM759271	Perelman et al. (2011)
DENND5A	<i>Alouatta sara</i>	San-Diego, CA, US	HM759272	Perelman et al. (2011)
DENND5A	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
DENND5A	<i>Brachyteles arachnoides</i>	INCA	HM759251	Perelman et al. (2011)
ADORA3	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
ADORA3	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	HM765173	Perelman et al. (2011)
ADORA3	<i>Alouatta sara</i>	San-Diego, CA, US	HM765174	Perelman et al. (2011)
ADORA3	<i>Brachyteles arachnoides</i>	INCA	HM765156	Perelman et al. (2011)
mC21_01	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
mC21_01	<i>Alouatta palliata</i>	CRES	KC762089	Kiesling et al. (2015)
mC21_01	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)
mC21_01	<i>Brachyteles arachnoides</i>	CPRJ	KC762147	Kiesling et al. (2015)
mC13_04	<i>Alouatta palliata</i>	San Diego Zoo	GCA_004027835	Johnson et al. (2018)
mC13_04	<i>Alouatta palliata</i>	San-Diego, CA, US	KC761936	Perelman et al. (2011)
mC13_04	<i>Ateles geoffroyi</i>	San Diego Zoo	GCA_004024785	Johnson et al. (2018)

CRES - The Center for Reproduction of Endangered species at the San Diego zoo; INCA – Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; MGCT - Morris Godman Tissue Collection; CPRJ - Centro de Primatologia de Rio de Janeiro; BCNP - Brasil Centro Nacional de Primatas; CCR - Coriell Cell Repositories, NJ, US; FRZB - Fundação RioZoo, Brasil

Tabela S2: Marcadores moleculares, sequências de primers utilizados nas PCRs, temperaturas de anelamento e suas respectivas referências bibliográficas

Marcador Molecular	Sequência primer direto	Sequência primer reverso	Anelamento	Referência
ADORA3	ACCCCATGTTTGGCTGGAA	GATAGGGTTCATCATGGAGTT	54 °C	Horvath et al. (2008)
AXIN1	CTCTGCCTTCGCTGTACCGTCTAC	GACCCACCTTTCTAATCCTTGTC	54 °C	Horvath et al. (2008)
BRCA2	AGCTCTTTTGGGACAATTCTGAGGA	CTGTAATTTCTGCCTTTTGRCTAGG	53 °C	Perelman et al. (2011)
DENND5A	CCAGAGTTATCATGGCCAATC	GTACCAAGCAAGAAGCTGGG	55 °C	Perelman et al. (2011)
GHR	CCAGTTCCAGTTCCAAAGAT	TGATTCTTCTGGTCAAGGCA	59 °C	Venta et al. (1996)
LRPPRC-169	CTGGAGACAGCTTTTGTGTTATCC	ACCTTAGAGGCTGAAAGTGACTG	57 °C	Horvath et al. (2008)
TTR	TGCCTCGCTGGACTGGTATT	GACAGCATCTAGAAGTTTGACCAT	58 °C	Flynn & Nedbal (1998)
003	GCCTAAGATCTAATCAGCACATTG	CTGTATCTGCCTTTGTAAGAGGT	59 °C	Kiesling et al. (2015)
011	CAATGGATGGATGAGAG	GCAGAACACTCAGTGAGGTAC	57 °C	Kiesling et al. (2015)
043_044	AAGGAACCACCACTAGGAG	GTGCAACATTTATCATGACTTC	58 °C	Kiesling et al. (2015)
220	CTCTGTGCTGGGAGACAAGG	TGTGGCAACAGAGTCAGGATTC	58 °C	Kiesling et al. (2015)
254	ACATATGACTCAGGCCAAATC	GCATTGCAGTAGCTAGCAC	59 °C	Kiesling et al. (2015)
258	CCAAGGCATAGTGTCTTAACA	AACCTGTCCCTGTATCTAAAAC	59 °C	Kiesling et al. (2015)
263	ACAAGTTAGCATCTGATTCATTTAC	CAACTTTCCTGGTAGCTTTGA	56 °C	Kiesling et al. (2015)
265	TCCATAGTACACCAAGGGACC	CCAATAGTATGCACTGTGAGCATG	53 °C	Kiesling et al. (2015)
266	CCACTAAGGAATTCTGATGCTT	GCATCACCCATGTATGATACATC	58 °C	Kiesling et al. (2015)
194	ATTCTATTCCCTGTGATGAWAGCAGA	TCTTTTCACTCAACATATGCCTGGA	59 °C	Kiesling et al. (2015)

271	CTTGAACAACACATATTTCCAACC	GAAAGATGGCATCTACTGGTGA	55 ° C	Kiesling et al. (2015)
mC13_04	CAGCCCAGAGTGCTTAGTTC	GAAGCAGATAGGCAGCCAC	58 °C	Kiesling et al. (2015)
mC17_01	GTCCTGGATTTCCTATCACC	GGAGCTGTCTTCCTCTGTAA	59° C	Kiesling et al. (2015)
mC18_03	GCATACATGCTTGCATCCAA	GCATAGTAGGGGTGCACAG	58 °C	Kiesling et al. (2015)
mC21_01	GTCCAGTTGCTTATTAAGAGCAC	GATGACTAATTGATGTCAACAGGT	58 °C	Kiesling et al. (2015)
Citocromo Oxidase I	TTTGTTGGAGTARTATGTWACRAT	ATGTTCATAARYCGCTGAYTATT	55 °C	Presente estudo
Citocromo Oxidase b	ATCCAACATYTCCGCTGTGATGA	GAAGGGGTATTCTACTGGTTGG	55 °C	Presente estudo

Tabela S3: Marcadores moleculares, números de sítios variáveis e de sítios informativos para parcimônia, tamanho dos fragmentos (em pb), e seus respectivos modelos evolutivos. Sítios variáveis e sítios informativos para parcimônia considerando apenas o gênero *Alouatta* estão indicados entre parênteses.

Marcador Molecular	Sítios Variáveis	Sítios Informativos para parcimônia	Comprimento (pb)	Modelo evolutivo
m003	28 (12)	17 (10)	480	HKY
m011	34 (12)	28 (10)	423	HKY + G
m194	27 (11)	18 (9)	426	HKY + G
m220	46 (15)	32 (15)	516	K80
m254	37 (14)	24 (13)	436	HKY
m258	49 (24)	33 (22)	702	HKY
m263	33 (12)	19 (8)	485	HKY + G
m265	72 (24)	51 (22)	707	HKY + G
m266	59 (21)	46 (19)	757	HKY + G
m271	62 (28)	42 (22)	661	HKY + G
m043_044	78 (35)	53 (32)	801	HKY + G
ADORA3	21 (11)	16 (9)	387	K80 + G
AXIN1	30 (14)	23 (12)	892	K80 + G
BRCA2	57 (14)	35 (11)	969	HKY
COI	177 (91)	139 (82)	712	HKY + G
Cytb	289 (162)	204 (145)	899	HKY + G
mC17_01	46 (20)	33 (17)	571	K80 + G
mC18_03	46 (26)	29 (16)	619	HKY
mC21_01	44 (9)	31 (8)	785	HKY
mC13_04	41 (12)	31 (12)	699	HKY
DENND5A	40 (9)	21 (8)	673	K80
GHR	55 (14)	30 (13)	731	HKY + G
LRPPRC_169	41 (16)	33 (15)	837	HKY + G
TTR	57 (18)	37 (14)	925	HKY + G
Combinados	1462 (616)	10540 (544)	16.093	-

Tabela S4: Distância genética média entre espécies de *Alouatta*, e os gêneros de Atelidae, com base em DNA mitocondrial, usando o modelo K2P.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 - <i>A. belzebul</i>											
2 - <i>A. discolor</i>	1,31										
3 - <i>A. guariba</i>	4,36	5,17									
4 - <i>A. nigerrima</i>	5,48	5,92	5,05								
5 - <i>A. macconnelli</i>	5,16	5,64	4,92	0,64							
6 - <i>A. caraya</i>	5,55	5,76	5,28	4,91	4,73						
7 - <i>A. palliata</i>	7,51	8,12	7,10	7,87	7,70	8,04					
8 - <i>A. sara</i>	4,9	5,48	5,62	3,24	3,02	4,79	8,16				
9 - <i>A. pigra</i>	6,43	6,77	7,11	7,45	7,20	7,06	5,12	6,93			
10 - <i>Lagothrix</i>	15,3	16,0	16,1	16,4	16,1	16,2	16,9	17,3	17,1		
11 - <i>Ateles</i>	14,5	14,9	14,7	14,9	14,8	14,8	15,9	15,2	13,4	13,7	
12 - <i>Brachyteles</i>	15,4	15,4	14,7	14,2	14,7	14,8	16,7	13,9	15,7	14,6	14,3

Tabela S5: Distância genética média estimada entre as espécies de *Alouatta* e os gêneros da família Atelidae, usando marcadores nucleares e o modelo K2P.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 - <i>A. belzebul</i>											
2 - <i>A. discolor</i>	0.04										
3 - <i>A. guariba</i>	0.79	0.71									
4 - <i>A. nigerrima</i>	0.64	0.67	0.72								
5 - <i>A. macconnelli</i>	0.73	0.76	0.81	0.09							
6 - <i>A. caraya</i>	0.77	0.81	0,89	0.62	0.73						
7 - <i>A. palliata</i>	1.13	1.01	1.17	1.03	1.09	1.17					
8 - <i>A. sara</i>	0.43	0.41	0.67	0.44	0.33	0.37	0.11				
9 - <i>A. pigra</i>	0.95	1.34	0.94	1.08	1.06	1.17	0.67	0.7			
10 - <i>Lagothrix</i>	3.19	2.90	3.37	3.07	3.27	3.32	3.45	3.22	3.13		
11 - <i>Ateles</i>	3.29	3.30	3.37	3.20	3.29	3.29	3.50	2.70	3.09	2.38	
12 - <i>Brachyteles</i>	3.33	3.23	3.40	3.24	3.29	3.34	3.54	2.84	3.46	1.88	2.14

CAPÍTULO II

Filogenia e biogeografia dos macacos guaribas (*Alouatta*, Atelidae) inferida usando DNA mitocondrial

Danillo Figueiredo da Silva^a & Colaboradores

^a Laboratório de Evolução (LEVO), Instituto de Estudos Costeiros (IECOS), Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, Pará, Brazil

Resumo

Os macacos guariba, gênero *Alouatta* Lacépède (Primates Atelidae), compõem o gênero mais difundido, geograficamente, entre os macacos do novo mundo. Ao longo de uma distribuição que vai do Sul do México ao norte da Argentina, no que diz respeito às espécies, algumas incertezas filogenéticas e biogeográficas ainda permanecem dentro de *Alouatta*. No presente estudo, nós utilizamos sequências de DNA de dois genes mitocondriais, disponíveis publicamente para 13 taxa de macacos guaribas, e conduzimos uma análise de inferência bayesiana, para estimar relações filogenéticas e tempos de divergência entre as espécies de *Alouatta*. Os resultados deste estudo apontam que o ancestral comum mais recente de *Alouatta* viveu há cerca de 6 milhões de anos, data coincidente com a formação do norte dos Andes, evento que provavelmente, levou à primeira separação em *Alouatta*. O oeste da Amazônia foi apontado como uma área chave da origem e diversificação dos principais grupos do gênero, além da formação da diagonal seca do continente Sul-americano. Nossos resultados indicaram que a época do Plioceno foi o período das principais diversificações e formação de grupos dentro de *Alouatta*. Entretanto, algumas espécies possuem origem mais recente, que datam do Pleistoceno. O táxon *A. puruensis* forma um grupo polifilético, agrupando-se com *A. sara* e/ou com *A. seniculus*. Logo, a validade desse táxon não se sustenta sob os dados filogenéticos.

Palavras-chave: Amazônia, América do Sul, Biogeografia, Primatas do novo mundo

1. INTRODUÇÃO

Os macacos guariba, gênero *Alouatta*, compreendem a espécie de macacos do novo mundo que apresentam a distribuição geográfica mais ampla dentro dos Platyrrhini. Uma vez que ocorrem em praticamente quase todas as áreas biogeográficas propostas para a Amazônia e América do Sul (Morrone et al. 2022; Silva & Garda 2010), *Alouatta* pode ser um táxon interessante para investigar a evolução biogeográfica de primatas nas Américas.

Tendo a capacidade de sobreviver com alimentos ubíquos e nutricionalmente pobres, os bugios são pioneiros, na sucessão ecológica, em paisagens fora da Amazônia, expandindo-se até mesmo por regiões onde existem apenas faixas estreitas de floresta ao longo de cursos d'água (Rosenberger 2020). De acordo com esse autor, essas características têm como resultado, que os macacos guaribas são um dos gêneros de Platyrrhini mais difundidos, com uma distribuição geográfica que vai do sul do México ao norte da Argentina (Figura 14). Ao longo desta grande extensão, a taxonomia do gênero é incerta (Rosenberger 2020). Um dos arranjos taxonômicos mais recentes é o de Cortés-Ortiz et al. (2015), que reconheceram 12 espécies para o gênero, incluindo as duas espécies endêmicas da Mesoamérica.

Para muitos vertebrados neotropicais, incluindo aves e primatas, o soerguimento dos Andes e outras mudanças geológicas são associados aos eventos de diversificação que levaram formação de grupos intragenéricos (Bessa-Silva et al. 2020; Cortés-Ortiz et al. 2003). Para *Alouatta*, esse evento de vicariância andina é associado à separação de dois grandes grupos: o Cis-Andino, com indivíduos basicamente ocupando a América do Sul e o Trans-Andino, com populações de macacos guaribas vivente na América Central (Cortés-Ortiz et al. 2003; Doyle et al. 2021).

O DNA mitocondrial é um marcador clássico para estudos de diversidade genética e filogeográficos (Avice 2009; Galtier et al 2009). E continua ocupando um papel basilar em muitas áreas de pesquisas, incluindo diversificação de espécies e filogenia, especialmente em espécies cujas amostras não podem ser obtidas facilmente (Janiak et al. 2022). Considerando o gênero *Alouatta*, o citocromo b tem sido usado durante muito tempo para fazer inferências filogenéticas e populacionais (Bonvicino et al 2001; Cortés-Ortiz et al. 2003; Harris et al. 2005; Nascimento et al 2005; Nascimento et al 2008; Viana et al. 2015; Solorzano-Garcia et al. 2021; Povill et al 2022). Assim, a quantidade de sequências disponíveis de citocromo b, ou outros genes mitocondriais, tem crescido vertiginosamente

nos bancos de dados biológicos, como o GenBank. Isso facilita a possibilidade de gerar uma filogenia com uma amostragem taxonômica e geográfica mais ampla para *Alouatta*.

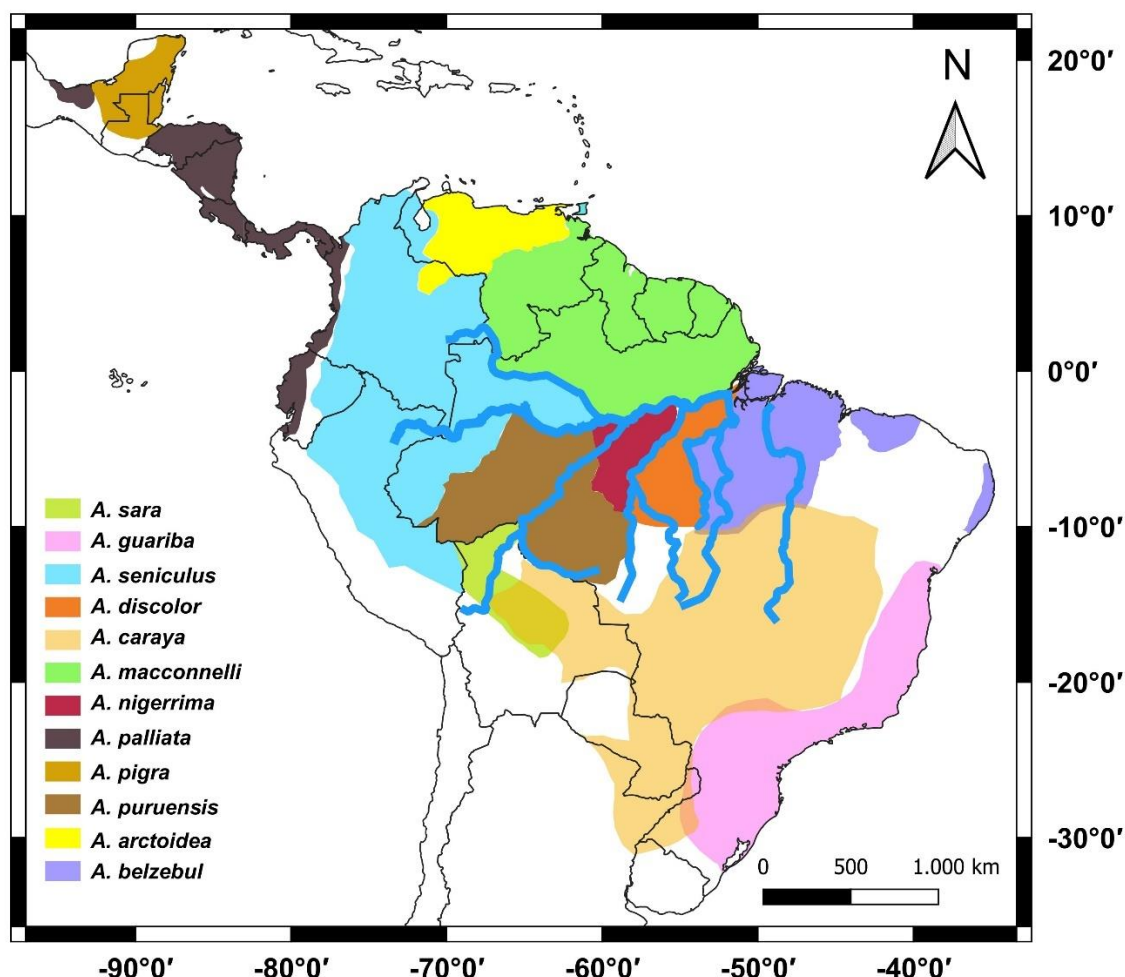


Figura 14: Representação da área de distribuição geográfica de *Alouatta* nas Américas. Mapa construído com base em dados adaptados a partir da lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (dados baixados em 28/07/2022).

Investigações biogeográficas baseadas em filogenia são escassas para o gênero. O único trabalho que aborda relações biogeográficas em *Alouatta*, com pressuposições feitas a partir de uma filogenia, é o de Cortés-Ortiz et al. (2003). Alguns táxons não foram disponíveis neste trabalho, como as espécies *A. nigerrima* e *A. discolor*, que possuem distribuição geográfica entre os Rios Madeira e Tapajós e entre Rios Xingu-Iriri e Tapajós, respectivamente (Gregorim 2006; Povill et al. 2022). É importante dispor de uma filogenia

estimada corretamente e bem calibrada temporalmente para fazer inferências acerca de processos biogeográficos (Donoghue & Moore 2003; Silva & Garda 2011). Nesse sentido, este trabalho pretende gerar uma hipótese das relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Alouatta* fazendo uso de sequências de DNA dos genes mitocondriais citocromo b e ATPase 6/8, disponíveis no GenBank e, a partir da filogenia gerada, analisar a história biogeográfica e dos principais grupos dentro dos macacos guariba, com base em métodos probabilísticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Construção da matriz de dados

Para a nossa matriz de dados para inferência filogenética, foram utilizadas sequências, disponíveis no GenBank, dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase b (Cyt b) e ATP sintase subunidades 6 e 8 (ATPase 6/8) de 39 indivíduos de *Alouatta*, e cinco para compor o grupo externo. O único táxon, reconhecido como espécie por Cortés-Ortiz et al. (2015), que não tivemos acesso, foi *A. arctoidea*, endêmica da Venezuela, que, tradicionalmente, compõe o complexo *A. seniculus*. A Figura 15, a seguir, apresenta um mapa com os pontos de origem geográfica de cada sequência de citocromo b. Para cada espécie de *Alouatta*, as coordenadas geográficas de cada sequência (quando disponível) e sua região de origem, junto com código de acesso ao GenBank e referências são mostradas na Tabela S6, para citocromo b e na Tabela S7, para ATPase 6/8.

2.2 Alinhamento e modelos evolutivos

As sequências foram alinhadas no ClustalW (Thompson et al. 1994), implementado no BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), onde as sequências foram editadas para a construção do final da matriz de dados. Para a escolha do modelo evolutivo foi utilizado o programa Kakusan4 (Tanabe 2011) com o critério de informação bayesiana (BIC). O modelo evolutivo HKY + G foi escolhido para os dois marcadores mitocondriais.

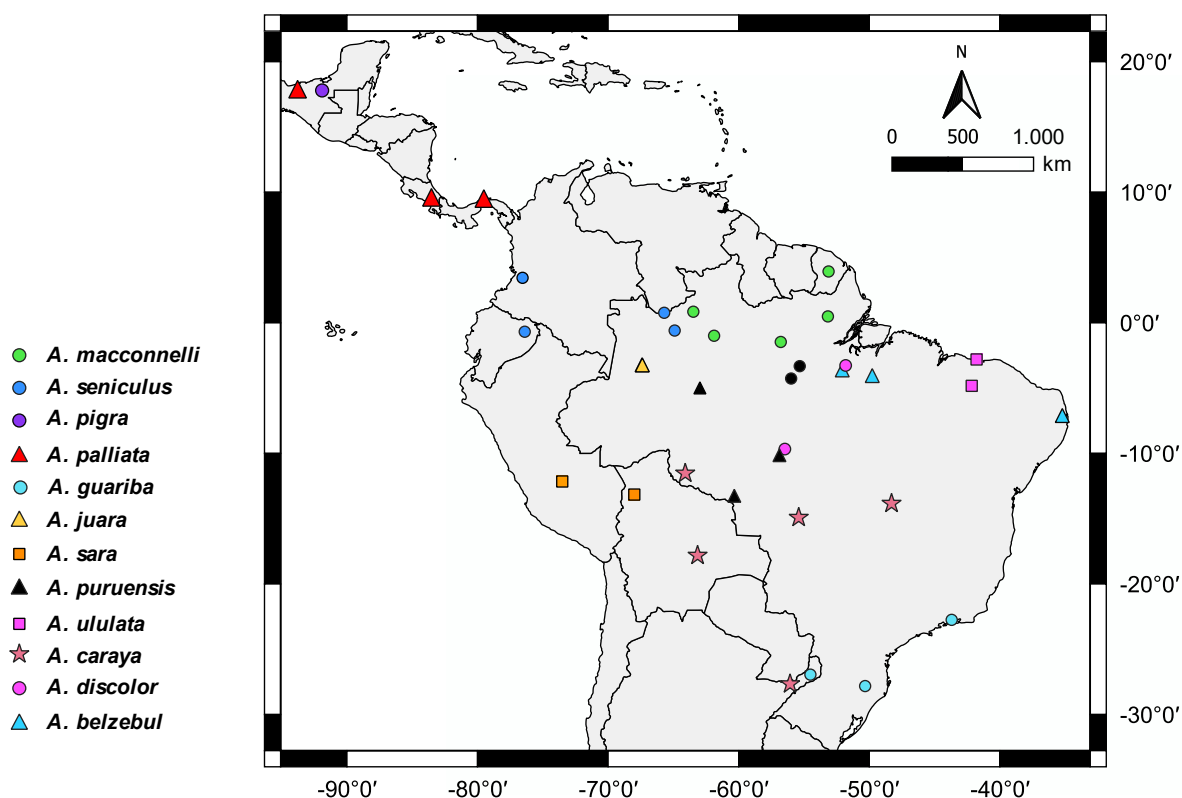


Figura 15: Mapa com pontos de amostragem das espécies de *Alouatta*.

2.3 Análise filogenética e tempo de divergência

Realizamos uma análise filogenética usando inferência bayesiana no programa BEAST v.1.10.4 (Drummond & Rambaut, 2007). Os parâmetros da análise incluem, o modelo de substituição HKY + G para cada marcador, relógio molecular estrito e processo de Yule de especiação para o prior da árvore. Realizamos uma corrida independente de 20 milhões de gerações com um burnin de 20 %. A convergência da corrida foi aferida usando o programa Tracer v.1.7 (Rambaut et al. 2018), onde todos os ESS foram maiores que 200. As árvores calculadas foram sumarizadas no programa TreeAnnotator v.1.10.4 (Drummond & Rambaut, 2007).

Tempos de divergência foram estimados no BEAST v.1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007) usando três pontos de calibração: (1) separação entre *Lagothrix* e *Brachyteles*, estimada em ~9,1 milhões de anos (Perelman et al. 2011; Kiesling et al. 2015), (2) a separação entre *Ateles*, *Brachyteles* e *Lagothrix*, estimada em ~11 milhões de anos

(Perelman et al. 2011; Kiesling et al. 2015) e (3) o fóssil *Stirtonia tatacoensis*, que data de 12,6-13,7 milhões de anos (Rosenberger 2015). Essa data foi usada para calibrar o nó que agrupa *Alouatta*, e seu grupo irmão (*Lagothrix*, *Brachyteles* e *Ateles*).

Os priors foram usados com uma distribuição normal e desvio padrão de 0.5. Nessa análise, foram utilizados o modelo de substituição HKY + G, um modelo de relógio molecular relaxado não correlacionado e o modelo de especiação Yule, como prior da árvore. A análise de tempo de divergência consistiu em 20 milhões de gerações de MCMC. Após o término da corrida, os arquivos de log foram analisados no programa Tracer v.1.7 (Rambaut et al. 2018, onde a convergência da cadeia foi averiguada por valores de ESS acima de 200. Por fim, os arquivos de árvore e de log foram combinados no programa LogCombiner v1.8.4 (Drummond & Rambaut 2007) e essas árvores foram sumarizados no programa TreeAnnotator v.1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007).

2.4 Análises Biogeográficas

As análises biogeográficas foram realizadas no pacote do R “BioGeoBEARS” (Matzke, 2013). Seis modelos foram testados (DEC, DECj, DIVA, DIVAj, BayArea, BayAreaj) nessa análise, com o objetivo de reconstruir áreas ancestrais e a história biogeográfica de *Alouatta*. A árvore de entrada foi construída em uma corrida do BEAST v.1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007), em que foram usadas apenas 16 sequências, representando as principais linhagens de *Alouatta*. Os mesmos parâmetros do BEAST usados na análise de tempo de divergência foram usados para construir a árvore de entrada do BioGeoBEARS. Utilizamos as datas dos cinco primeiros nós na filogenia de *Alouatta*, fornecidas pela análise de tempo de divergência, como pontos de calibração para calcular as datas na árvore de entrada do BioGeoBEARS. Foram definidas nove áreas biogeográficas, baseadas nos trabalhos de Alfaro et al. (2015) e Byrne et al. (2018) com algumas modificações. A Tabela 5 exhibe os códigos para cada área, as espécies ocorrentes e a respectiva área biogeográfica.

Tabela 5: Regiões biogeográficas consideradas na reconstrução da história biogeográfica de *Alouatta* com o BioGeoBEARS, suas respectivas espécies viventes e principais referências de cada área.

Código da Área	Região	Taxa ocorrentes	Referência
A	Xingu, leste	<i>A. belzebul</i>	Lynch Alfaro et al. (2015)
B	Xingu, oeste	<i>A. discolor</i>	Lynch Alfaro et al. (2015)
C	Guiana	<i>A. macconnelli</i>	Lynch Alfaro et al. (2015)
D	Amazônia, oeste	<i>A. seniculus</i> , <i>A. juara</i> , <i>A. sara</i> , <i>A. caraya</i> , <i>A. puruensis</i>	Lynch Alfaro et al. (2015)
E	Savana úmida	<i>A. caraya</i>	Byrne et al. (2018)
F	Caatinga	<i>A. ululata</i>	Byrne et al. (2018)
G	Mata Atlântica	<i>A. guariba</i> , <i>A. belzebul</i>	
H	Trans-Andina	<i>A. pigra</i> , <i>A. palliata</i>	Lynch Alfaro et al. (2012)
I	Rondônia	<i>A. nigerrima</i>	Byrne et al. (2018)

3. RESULTADOS

3.1 Filogenia e datação molecular

A filogenia de *Alouatta*, estimada usando IB no BEAST, resultou em suportes elevados (todos acima de 0.95) para todos os nós da árvore (Figura 16). A topologia da árvore mostra a formação de dois clados dentro de *Alouatta*, apoiados com suportes máximos: o clado Cis-Andino e o clado Trans-Andino. Dentro do clado Cis-Andino, houve a formação de dois outros clados, o primeiro é formado pelo complexo *A. belzebul* e *A. guariba*, apoiadas com suporte de 0.99 de PP e, o segundo clado, suportado com PP máxima, é composto pela espécie *A. caraya* e o complexo de espécies *A. seniculus*, em uma relação de monofilia recíproca.

Dentro do grupo *A. seniculus*, nossos resultados recuperaram *A. nigerrima* como sendo espécie irmã de *A. macconnelli*, com PP máxima. A espécie *A. sara* se agrupou com dois indivíduos nomeados *A. puruensis*, provenientes dos estados do Mato Grosso e Rondônia, ambos na Amazônia. A espécie *A. puruensis* também se agrupou dentro de *A. seniculus*, junto com dois indivíduos de *A. juara*. Todos os valores de suportes para os

resultados, envolvendo o agrupamento *A. puruensis*–*A. sara*, bem como, *A. puruensis* e *A. juara*, dentro de *A. seniculus* foram máximos.

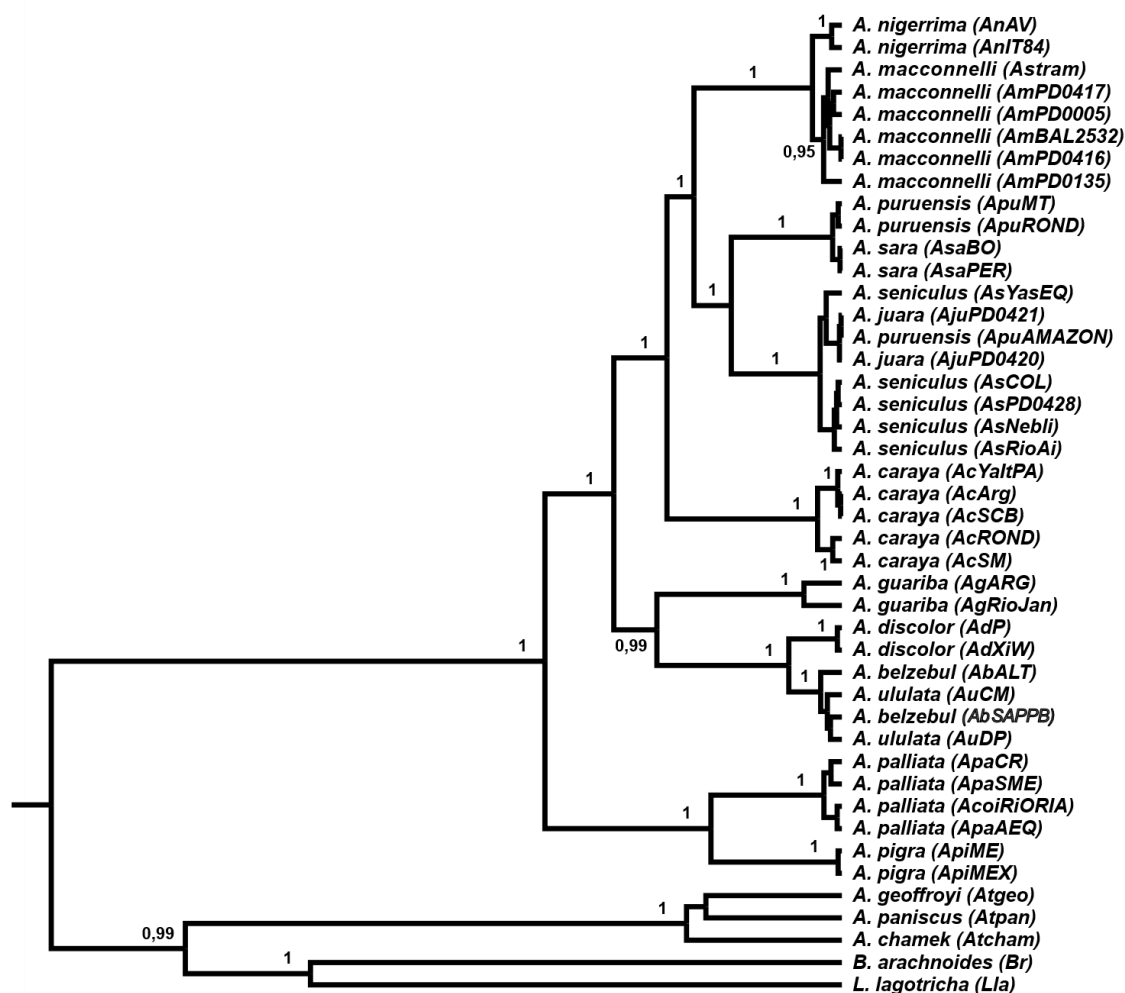


Figura 16: Árvore filogenética mostrando as relações entre as espécies de *Alouatta*, baseada em inferência bayesiana, construída no BEAST usando os genes ATPase 6/8 e Cyt b.

A maioria das datas de divergência entre as espécies de *Alouatta* ocorreram durante a época do Plioceno. Uma primeira diversificação dentro do gênero ocorreu há ~6 Ma, entre o clado Cis-Andino e o Trans-Andino. As espécies da região Trans-Andina, *A. palliata* e *A. pigra* se separaram há 2,81 Ma. Entre os *Alouatta* Sul-americanos, a primeira diversificação se deu há 5,28 Ma, dando origem aos ancestrais do: (1) complexo *A. belzebul* e *A. guariba*; e do (2) complexo *A. seniculus* e *A. caraya*. Esse primeiro grupo se dividiu há 4,34 Ma. Dentro do segundo grupo, *A. caraya* se separou do complexo *A. seniculus* há 4,35 Ma. O complexo *A. seniculus* teve sua primeira separação há 3,43 Ma. *A. sara* se separou de *A.*

seniculus há 2,4 Ma e, por fim, *A. nigerrima* se separou de *A. macconnelli* há 0,88 Ma (Figura 17).

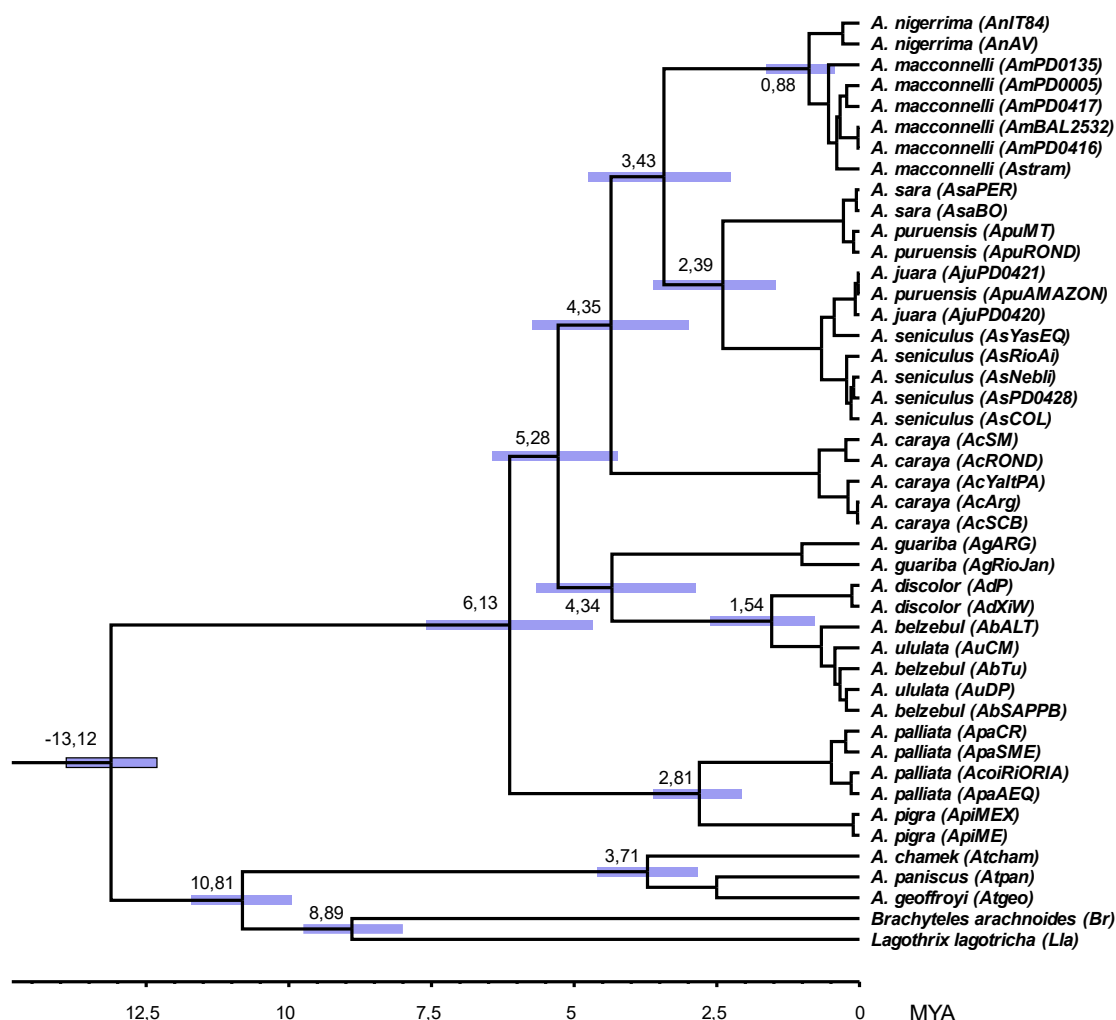


Figura 17: Datas de divergência estimadas através do BEAST para as espécies de *Alouatta* com base em genes mitocondriais.

3.2 História biogeográfica

Os resultados do BioGeoBEARS apontaram para o modelo DIVALIKE+J como o que melhor explica a história biogeográfica dos macacos guariba (Tabela 6). Esse modelo explica a distribuição das linhagens com base em dispersão-vicariância e com base em eventos de dispersão por saltos (jump). O ancestral comum mais recente do gênero *Alouatta*

teve sua diversificação inicial dentro do continente Sul-americano, há cerca de 5,9 Ma. Nossas análises mostraram que o ancestral dos *Alouatta* Sul-americano tinha uma distribuição ampla no continente, ocupando não apenas áreas à oeste e sudeste da Amazônia, mas também a Mata Atlântica (fig biogeo). A primeira separação dentro do grupo dos *Alouatta* da América do Sul ocorreu há cerca de 4,7 milhões de anos (Figura 18), evento que deu origem aos clados (*A. guariba* + complexo *A. belzebul*) e (*A. caraya* + grupo *A. seniculus*).

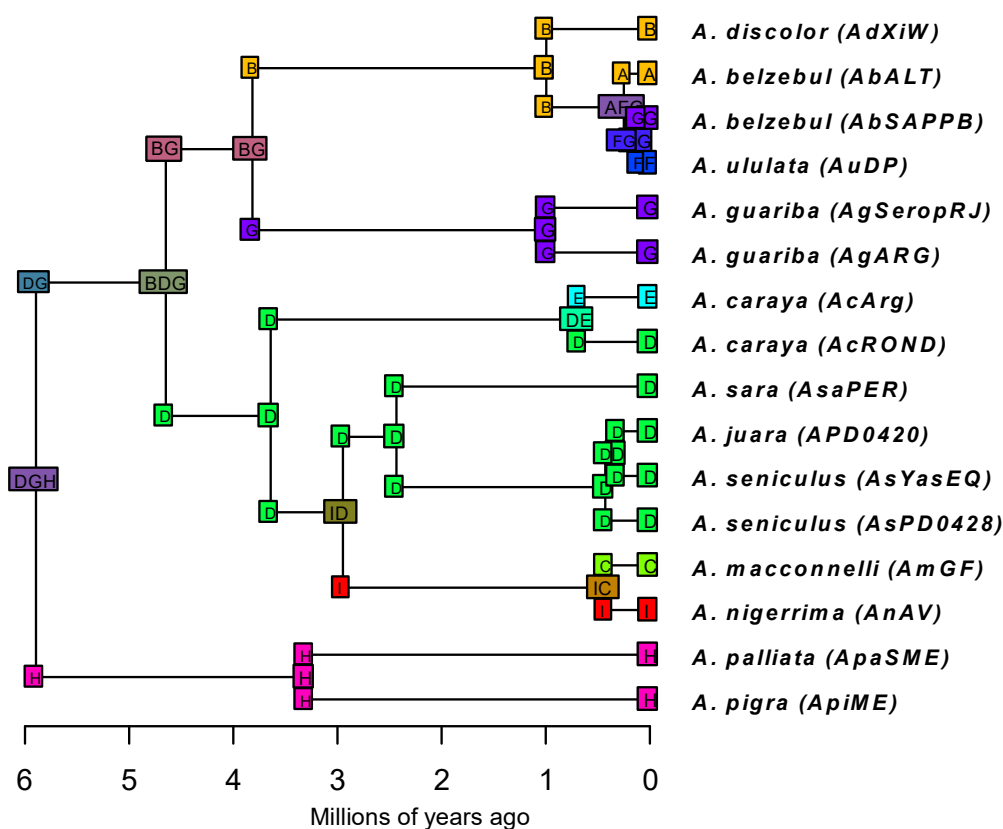


Figura 18: Árvore mostrando as áreas ancestrais (letras de A a I na tabela 5) estimadas para o gênero *Alouatta* usando o BioGeoBEARS com o modelo DIVALIKE+J.

O complexo de espécies *A. seniculus* e a espécie *A. caraya* possuem origem no oeste da Amazônia, onde ocorreu a divergência entre esses dois grupos. A população ancestral que deu origem a espécie atual *A. caraya* se separou do grupo *A. seniculus* há 3,6 Ma, na parte oeste da Amazônia. A separação inicial do grupo *A. seniculus* também ocorreu no oeste da Amazônia e na área de Rondônia há cerca de 3 Ma. Esse evento, levou à

separação inicial entre a espécies *A. macconnelli* + *A. nigerrima* e *A. sara* + *A. seniculus*. A espécie *A. sara* se separou de *A. seniculus* há 2,4 Ma. E finalmente, *A. nigerrima*, uma das espécies mais recente do gênero *Alouatta*, divergiu de sua espécie irmã, *A. macconnelli* há cerca de 0,5 Ma.

Tabela 6: Comparação de valores Log-verossimilhança, dispersão (D), extinção (E), efeito fundador (J), critérios de informação Akaike (AIC e AIC weight) entre os modelos calculados no BioGeoBEARS.

Modelo	LnL	n° par.	D	E	J	AIC	AIC weight
DEC	-32,90	2	1,4 e-02	1,0 e-12	0	69,81	1,9 e-04
DEC+J	-24,86	3	1,0 e-12	9,9 e-13	0,06	55,73	2,2 e-01
DIVALIKE	-30,41	2	2,0 e-02	1,0 e-12	0	64,82	2,3 e-03
DIVALIKE+J	-23,65	3	1,0 e-12	1,0 e-12	0,06	53,30	7,5 e-01
BAYAREALIKE	-50,14	2	3,3 e-02	4,1 e-01	0	104,28	6,4 e-12
BAYAREALIKE+J	-27,26	3	1,0 e-07	1.0 e-07	0,08	60,53	2,0 e-02

4. DISCUSSÃO

Este é o trabalho mais abrangente, taxonomicamente e geograficamente, sobre relações filogenéticas e biogeografia do gênero *Alouatta*. Apesar das limitações do número de loci empregados no presente estudo, os valores de suporte estatístico que sustentam o arranjo filogenético mostrado aqui são todos elevados, acima de 0.95 de PP. *Alouatta* é dividido em dois grandes clados, o Cis-Andino, composto pelas espécies que vivem na América do Sul, e o clado Trans-Andino, formado pelas espécies que vivem na América Central ou norte dos Andes. A primeira diversificação dentro de *Alouatta* é aproximadamente coincidente com os eventos de vicariância andina que levaram à formação das cordilheiras do norte dos Andes (Lundberg et al. 1998; Gregory-Wodzicki 2000).

A área ancestral de *Alouatta* foi apontada, pelo BioGeoBEARS, como sendo o oeste da Amazônia, incluindo as regiões Trans-Andino e Cis-Andino. Além disso, a Mata Atlântica também foi indicada como parte da área de origem de diversificação de *Alouatta* (Figura 18). A hipótese do oeste da Amazônia como sendo um centro de origem e diversificação já foi apontado em diversos trabalhos com primatas do novo mundo, como *Ateles* (Collins &

Dubach, 2000; Morales-Jimenez et al. 2015), *Aotus* (Martins-Junior et al. 2022), *Saimiri* (Lavergne et al. 2010) e *Alouatta* (Cortés-Ortiz et al. 2003). A data da primeira separação dentro do clado Cis-Andino coincide com a formação da configuração geológica atual do Rio Amazonas (Albert et al. 2018). O BioGeoBEARS indicou uma área vasta, compreendendo a Amazônia e a Mata Atlântica como sendo as regiões em que viveram os ancestrais dos *Alouatta* Cis-Andino.

Os macacos guariba que ocorrem na América Central formam um grupo monofilético. Tem sido hipotetizado que a origem desse grupo ocorreu por dispersão, a partir do continente Sul-americano (Cortés-Ortiz et al. 2003; Ellsworth & Hoelzer 2006). Em outros grupos de primatas, uma origem por dispersão também tem sido sugerida para explicar sua ocorrência na América Central, como por exemplo, os gêneros *Ateles*, *Cebus* e *Saimiri* (Lavergne et al. 2010; Martins-Junior et al. 2018; Collins & Dubach 2000). É importante mencionar que essas dispersões ocorreram após o fechamento final do Istmo do Panamá, evento que permitiu uma troca faunística, incluindo os continentes da América do Sul e América Central (Flynn et al. 2005).

A época do Plioceno foi uma época de frequentes eventos de especiação em *Alouatta*, como evidenciado em outros trabalhos (Cortés-Ortiz et al. 2003; Ruiz-García et al. 2017). Vale ressaltar o trabalho de Doyle et al. (2021), usando 14 marcadores moleculares, que mostra datas superiores para as diversificações entre os macacos guaribas. Provavelmente, isso ocorreu devido ao uso incorreto do fóssil *Stirtonia tatacoensis* (12,6-13,7 Ma), que é grupo irmão de *Alouatta* (Kay 2015), como ponto de calibração para *Alouatta* ao invés de Atelidae. Dois principais eventos biogeográficos explicam as principais diversificações dentro do gênero: primeiro da formação do Rio Amazonas e, segundo o desenvolvimento da diagonal seca da América do Sul.

O clado Sul-americano é formado por dois clados. O primeiro agrupa o complexo *A. belzebul* e *A. guariba*, espécies que ocupam regiões distintas, geograficamente distantes e separadas por um ecossistema de clima árido. As análises do BioGeoBEARS indicaram que o ancestral do complexo *A. belzebul* e *A. guariba* viveu tanto na Mata Atlântica quanto no leste da Amazônia (Figura 18). Assim, esse primeiro clado pode ter se formado com o desenvolvimento do ecossistema seco da Caatinga no nordeste brasileiro. A data de separação entre o complexo *A. belzebul* e *A. guariba* (~4 Ma) é coincidente com o período de expansão de um ecossistema árido e formação da diagonal seca na América do Sul

(Machado et al. 2021). Apesar desse ambiente xérico ser inóspito para macacos (Cortés-Ortiz et al. 2003), é importante notar que, existem espécies de macacos do mundo que habitam o ambiente da Caatinga, como o *Callicebus barbarabrownae* (endêmica da Caatinga), *Sapajus xanthosternos*, *Callicebus coimbrai* e *Alouatta ululata*. O complexo *A. belzebul* é composto por diferentes populações ou linhagens ou espécies ocorrendo em áreas como o leste da Amazônia, algumas partes do Cerrado e Caatinga, além da Mata Atlântica do nordeste brasileiro (Gregorin 2006; Viana et al. 2015). É possível que essa distribuição, seja resquício de rotas de conexões passadas entre Amazônia e Mata Atlântica. A rota do nordeste foi a mais frequente, entre as três rotas usadas pela fauna de mamíferos entre a Amazônia e a Mata Atlântica (Machado et al. 2021).

O segundo clado é formado por *A. caraya* e o complexo *A. seniculus*. Os resultados do BioGeoBEARS mostraram que o ancestral comum desse clado viveu na região oeste da Amazônia, como indicado na figura 18. Nossas análises de tempo de divergência indicaram que esse clado se separou há ~4 Ma, em *A. caraya* e o complexo *A. seniculus*. Após a separação entre o ancestral de *A. caraya* e o ancestral das espécies do complexo *A. seniculus*, os ancestrais de *A. caraya*, provavelmente foram ocupando habitats mais ao sul. Atualmente, a espécie *A. caraya* está presente em vários ecossistemas da América do Sul, ocorrendo no Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, e no sul da Amazônia, onde pode ocorrer em simpatria com outras espécies de *Alouatta*. Além disso, a distribuição atual de *A. caraya* não coincide com nenhuma barreira geográfica clara (Cortés-Ortiz et al. 2003).

No presente trabalho, o complexo de espécies *A. seniculus* foi composto por *A. seniculus*, *A. macconnelli*, *A. nigerrima* e *A. sara*. A primeira separação, dentro desse grupo, foi entre (*A. macconnelli*, *A. nigerrima*) e o ancestral de (*A. seniculus*, *A. sara*) há ~3 Ma. Tradicionalmente, considera-se que a distribuição de *A. macconnelli* está restrita à região das guianas, limitada ao sul pelo Rio Amazonas e à Oeste pelo Rio Negro (Cortés-Ortiz et al. 2015). Essa distribuição é similar à de outras espécies de primatas com datas diferentes de formação, como *Ateles paniscus* (3,5 Ma) e *Saimiri sciureus* (2,3 Ma) (Morales-Jimenez et al. 2015; Lavergne et al. 2010). A área ancestral de *A. seniculus*, *A. macconnelli*, *A. nigerrima* e *A. sara* foi apontada, pelo BioGeoBEARS, como sendo o oeste da Amazônia e Rondônia (Figura 18). De acordo com nossos resultados, esse ancestral não habitava a região das Guianas, assim não podemos indicar as causas subjacentes à formação de *A. macconnelli*, que, provavelmente, migrou para o planalto das Guianas a partir de Rondônia.

O que reafirma a visão de que embora as distribuições geográficas de algumas espécies de *Alouatta* sejam limitadas atualmente por rios, não podemos explicar as origens dessas espécies simplesmente por vicariância através dessas barreiras (Cortés-Ortiz et al. 2003). Além disso, surpreendentemente, a espécie *A. nigerrima* é irmã de *A. macconnelli*, resultado obtido também por Bonvicino et al. (2001) e Janiak et al. (2022). Essas duas espécies irmãs ocorrem nos lados Sul e Norte do Rio Amazonas, mas possuem divergência recente, 0,8 Ma no presente estudo. Assim, o Rio Amazonas não é uma barreira de isolamento para essas espécies de *Alouatta*. De forma similar, para a espécie *Sapajus apella*, o Rio Amazonas não constitui barreira geográfica, pois *S. apella* ocorre em ambas as margens do Rio Amazonas (Martins-Junior et al. 2018). Por fim, vale mencionar que há exceções, *A. macconnelli* ocorre sempre na margem norte do Rio Amazonas, mas um indivíduo já foi coletado na margem sul, próximo ao Lago Batista, Amazonas (Gregorin 2006).

A segunda separação dentro desse complexo se deu entre *A. seniculus* e *A. sara*. A espécie *A. sara* foi elevada ao status de espécie, a partir dos estudos de citogenética de Minezawa et al. (1985). Considera-se que a distribuição dessa espécie está limitada à Bolívia e algumas regiões do sul do Peru (Cortés-Ortiz et al. 2015; Ruiz-García et al. 2016). Apesar disso, em nossas análises filogenéticas, alguns indivíduos do táxon *A. puruensis* provenientes dos estados do Mato Grosso e Rondônia, agruparam-se com *A. sara*. Logo, a distribuição de *A. sara* deve ser mais ampla do que se acredita hoje. Mais estudos sobre a delimitação e distribuição geográfica são necessários para se entender a evolução e origem de *A. sara*. A espécie *A. puruensis* também se agrupou dentro de *A. seniculus*, junto com *A. juara*. Assim, *A. puruensis* não é um grupo monofilético, mas sim polifilético, pois forma um táxon não natural, se agrupando com duas espécies distintas. Da mesma forma, *A. juara* não pode ser sustentada como espécie independente pois, na nossa árvore, ela ficou inserida dentro de *A. seniculus*.

5. CONCLUSÕES

Este estudo fez a primeira análise biogeográfica dos macacos guaribas usando métodos probabilísticos e realizou a mais ampla análise filogenética do gênero *Alouatta*, reunindo um banco de dados com dois genes mitocondriais para 13 taxa de macacos guariba. Os

resultados deste estudo apontam que a primeira separação em *Alouatta* ocorreu há cerca de 6 milhões de anos, data que coincide, aproximadamente, com a formação do norte dos Andes, que presumivelmente, teria levado a esse evento. O oeste da Amazônia foi uma área importante na radiação de espécies dentro do gênero. É possível que a formação do Rio Amazonas transcontinental possa ter levado à primeira separação dentro do clado Sul-americano de *Alouatta*. Além disso, os principais eventos de diversificação em *Alouatta* aconteceram durante o Plioceno. Embora algumas espécies possuam origem mais recente, no pleistoceno. *A. puruensis* não se sustenta como um táxon válido, não devendo ser mais usado nos arranjos taxonômicos. O oeste da Amazônia foi apontado como uma área chave da origem e diversificação dos principais grupos do gênero, além da formação da diagonal seca do continente Sul-americano.

6. REFERÊNCIAS

- Albert, J. S., Val, P., & Hoorn, C. (2018). The changing course of the Amazon River in the Neogene: center stage for Neotropical diversification. *Neotropical Ichthyology*, 16(3): e180033
- Ascunce, M. S., Hasson, E., Mulligan, C. J., & Mudry, M. D. (2007). Mitochondrial sequence diversity of the southernmost extant New World monkey, *Alouatta caraya*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(1): 202-215.
- Avice, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1): 3-15.
- Bessa-Silva, A., Vallinoto, M., Sampaio, I., Flores-Villela, O. A., Smith, E. N., & Sequeira, F. (2020). The roles of vicariance and dispersal in the differentiation of two species of the *Rhinella marina* species complex. *Molecular phylogenetics and evolution*, 145: 106723.
- Bonvicino, C. R., Lemos, B., & Seuánez, H. N. (2001). Molecular phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini). *Chromosoma*, 110(3): 241-246.
- Byrne, H., Lynch Alfaro, J. W., Sampaio, I., Farias, I., Schneider, H., Hrbek, T., & Boubli, J. P. (2018). Titi monkey biogeography: Parallel Pleistocene spread by *Plecturocebus* and *Cheracebus* into a post-Pebas Western Amazon. *Zoologica Scripta*, 47(5): 499-517.
- Collins, A. C., & Dubach, J. M. (2000). Biogeographic and ecological forces responsible for speciation in *Ateles*. *International Journal of Primatology*, 21(3): 421-444.
- Cortés-Ortiz, L., Bermingham, E., Rico, C., Rodríguez-Luna, E., Sampaio, I., & Ruiz-García, M. (2003). Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26(1): 64-81.

- Cortés-Ortiz, L., Agostini, I., Aguiar, L. M., Kelaita, M., Silva, F. E., & Bicca-Marques, J. C. (2015). Hybridization in howler monkeys: Current understanding and future directions. In *Howler monkeys: adaptive radiation, systematics, and morphology* (pp. 107-131). Springer, New York, NY.
- Doyle, E. D., Prates, I., Sampaio, I., Koiffmann, C., Silva, W. A., Carnaval, A. C., & Harris, E. E. (2021). Molecular phylogenetic inference of the howler monkey radiation (Primates: *Alouatta*). *Primates*, 62(1): 177-188.
- Donoghue, M. J., & Moore, B. R. (2003). Toward an integrative historical biogeography. *Integrative and Comparative Biology*, 43(2): 261-270.
- Doyle, E. D., Prates, I., Sampaio, I., Koiffmann, C., Silva, W. A., Carnaval, A. C., & Harris, E. E. (2021). Molecular phylogenetic inference of the howler monkey radiation (Primates: *Alouatta*). *Primates*, 62(1): 177-188.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1): 1-8.
- Ellsworth, J. A., & Hoelzer, G. A. (2006). Genetic evidence on the historical biogeography of Central American howler monkeys. In *Primate biogeography* (pp. 81-103). Springer, Boston, MA.
- Flynn, J. J., Kowallis, B. J., Nuñez, C., Carranza-Castañeda, Ó., Miller, W. E., Swisher III, C. C., & Lindsay, E. (2005). Geochronology of Hemphillian-Blancan aged strata, Guanajuato, Mexico, and implications for timing of the Great American Biotic Interchange. *The Journal of Geology*, 113(3): 287-307.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22): 4541-4550.
- Gherzi, B.M.; Jia, H.; Aiweusakun, P.; Katzourakis, A.; Mendoza, P.; Bausch, D.G.; Kasper, M.R.; Montgomery, J.M.; Switzer, W.M. (2015) Wide distribution and ancient evolutionary history of simian foamy viruses in new world primates. *Retrovirology*, 12(1): 1-19.
- Gregorin, R. (2006). Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. *Revista brasileira de Zoologia*, 23: 64-144.
- Gregory-Wodzicki, K. M. (2000). Uplift history of the Central and Northern Andes: a review. *Geological society of America bulletin*, 112(7): 1091-1105.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95-98.
- Harris, E. E., Gifalli-Iughetti, C., Braga, Z. H., & Koiffmann, C. P. (2005). Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler monkey (*Alouatta guariba*) from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil. *Neotropical Primates*, 13(2): 16-21.
- Janiak M.C, Silva F.E, Beck R.M.D, de Vries D, Kuderna L.F.K, Torosin N.S, Melin A.D, Marquès-Bonet T, Goodhead I.B, Messias M, da Silva M.N.F, Sampaio I, Farias I.P, Rossi R, de Melo F.R, Valsecchi J, Hrbek T, Boubli J.P. (2022). Two hundred and five newly assembled mitogenomes provide mixed evidence for rivers as drivers of speciation for Amazonian primates. *Molecular Ecology*. 31(14): 3888-3902.

- Kay, R. F. (2015). Biogeography in deep time—What do phylogenetics, geology, and paleoclimate tell us about early platyrrhine evolution?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82: 358-374.
- Kiesling, N. M. J., Soojin, V. Y., Xu, K., Sperone, F. G., & Wildman, D. E. (2015). The tempo and mode of New World monkey evolution and biogeography in the context of phylogenomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82: 386-399.
- Lavergne, A., Ruiz-García, M., Catzeflis, F., Lacote, S., Contamin, H., Mercereau-Puijalon, O., Lacoste, V. & de Thoisy, B. (2010) Phylogeny and phylogeography of squirrel monkeys (genus *Saimiri*) based on cytochrome b genetic analysis. *American Journal of Primatology*, 72: 242–253
- Lundberg, J. G., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M. C. S. L., & Wesselingh, F. (1998). The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, 27: 13-48.
- Lynch Alfaro, J. W., Silva Jr, J. D. S. E., & Rylands, A. B. (2012). How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. *American Journal of Primatology*, 74(4): 273-286.
- Lynch Alfaro, J. W., Boubli, J. P., Paim, F. P., Ribas, C. C., da Silva, M. N. F., Messias, M. R., Rohe, F., Mercês, M. P., Silva Junior J. S., Silva, C.R., Pinho, G.M., Koshkarian, G., Nguyen, M.T.T., Harada, M.L., Rabelo, R.M., Queiroz, H.L., Alfaro, M.E., & Farias, I.P. (2015). Biogeography of squirrel monkeys (genus *Saimiri*): South-central Amazon origin and rapid pan-Amazonian diversification of a lowland primate. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82: 436-454.
- Machado, A. F., Ritter, C. D., Miranda, C. L., Bredin, Y. K., Ramos Pereira, M. J., & Duarte, L. (2021). Potential mammalian species for investigating the past connections between Amazonia and the Atlantic Forest. *PloS one*, 16(4), e0250016.
- Martins-Junior, A. M. G., Carneiro, J., Sampaio, I., Ferrari, S. F., & Schneider, H. (2018). Phylogenetic relationships among Capuchin (Cebidae, Platyrrhini) lineages: An old event of sympatry explains the current distribution of *Cebus* and *Sapajus*. *Genetics and molecular biology*, 41: 699-712.
- Martins-Junior, A.M.G.; Sampaio, I.; Silva, A.; Boubli, J.; Hrbek, T.; Farias, I.; Ruiz-García, M.; Schneider, H. (2022). Out of the shadows: Multilocus systematics and biogeography of night monkeys suggest a Central Amazonian origin and a very recent widespread southeastward expansion in South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 170: 107426.
- Matzke, N. J. (2013). BioGeoBEARS: BioGeography with Bayesian (and likelihood) evolutionary analysis in R Scripts. *R package, version 0.2, 1*, 2013.
- Minezawa, M., Harada, M., Otto, C. J. C., & C Jaime, V. B. (1986). Cytogenetics of Bolivian endemic red howler monkeys (*Alouatta seniculus sara*): accessory chromosomes and Y-autosome translocation related numerical variations. *Kyoto University overseas research reports of new world monkeys*, (5), 7-16.

- Morales-Jimenez, A. L., Disotell, T., & Di Fiore, A. (2015). Revisiting the phylogenetic relationships, biogeography, and taxonomy of spider monkeys (genus *Ateles*) in light of new molecular data. *Molecular phylogenetics and evolution*, 82: 467-483.
- Morrone, J. J., Escalante, T., Rodríguez-Tapia, G., Carmona, A., Arana, M., & Mercado-Gómez, J. D. (2022). Biogeographic regionalization of the Neotropical region: New map and shapefile. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94.
- Nascimento, F. D., Bonvicino, C. R., Da Silva, F. C. D., Schneider, M. P. C., & Seuánez, H. N. (2005). Cytochrome b polymorphisms and population structure of two species of *Alouatta* (Primates). *Cytogenetic and Genome Research*, 108(1-3): 106-111.
- Nascimento, F. F., Bonvicino, C. R., De Oliveira, M. M., Schneider, M. P. C., & Seuánez, H. N. (2008). Population genetic studies of *Alouatta belzebul* from the Amazonian and Atlantic Forests. *American Journal of Primatology*, 70(5): 423-431.
- Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuanez, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumpler, Y., Schneider, M. P., Silva, A., O'Brien, S. J., Pecon-Slattery, J. A., (2011). Molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7: e1001342.
- Povill, C., de Assis Passos Oliveira, M., de Melo, F. R., & Bonvicino, C. R. (2022). Phylogenetic relationships, population demography, and species delimitation of the *Alouatta belzebul* species complex (Atelidae: Alouattinae). *Primates*, 63(1): 65-78.
- Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G. & Suchard M. A. (2018) Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5): 901-904.
- Rosenberger, A. L., Cooke, S. B., Halenar, L. B., Tejedor, M. F., Hartwig, W. C., Novo, N. M., & Muñoz-Saba, Y. (2015). Fossil alouattines and the origins of *Alouatta*: craniodental diversity and interrelationships. In *Howler Monkeys Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (pp. 21-54). Springer, New York, NY.
- Rosenberger, A. L. (2020). *New world monkeys: The evolutionary odyssey*. Princeton University Press.
- Ruiz-García, M., Cerón, A., Pinedo-Castro, M., Gutierrez-Espeleta, G., & Shostell, J. M. (2016). Which howler monkey (*Alouatta*, Atelidae, Primates) taxon is living in the Peruvian Madre de Dios River Basin (southern Peru)? Results from mitochondrial gene analyses and some insights in the phylogeny of *Alouatta*. In *Phylogeny, Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Conservation of the Neotropical Primates* (pp 395-434). Nova Science, New York.
- Ruiz-García, M., Cerón, Á., Sánchez-Castillo, S., Rueda-Zozaya, P., Pinedo-Castro, M., Gutierrez-Espeleta, G., & Shostell, J. M. (2017). Phylogeography of the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*; Atelidae, Primates) across its geographical range by means of mitochondrial genetic analyses and new insights about the phylogeny of *Alouatta*. *Folia Primatologica*, 88(5): 421-454.
- Schrager, C. G., Menezes, A. N., Moreira, M. A., Pissinatti, A., & Seuanez, H. N. (2012). Chronology of deep nodes in the neotropical primate phylogeny: insights from mitochondrial genomes. *PloS one*, 7(12): e51699.

Silva, J. M. C., & Garda, A. A. (2010). Padrões e processos biogeográficos na Amazônia. *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. Roca.

Solórzano-García, B., Zubillaga, D., Piñero, D., & Vázquez-Domínguez, E. (2021). Conservation implications of living in forest remnants: inbreeding and genetic structure of the northernmost mantled howler monkeys. *Biotropica*, 53(4): 1163-1177.

Swofford, D.L., 2000. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), version 4.0b4a. Sinauer, Sunderland, MA.

Tanabe, A. S. (2011). Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources*, 11(5): 914-921.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22): 4673-4680.

Viana, M. C., Bonvicino, C. R., Ferreira, J. G., Jerusalinsky, L., Langguth, A., & Seuánez, H. (2015). Understanding the relationship between *Alouatta ululata* and *Alouatta belzebul* (Primates: Atelidae) based on cytogenetics and molecular phylogeny. *Oecologia Australis*, 19: 173-182.

ANEXO II

Tabela S6: Espécies, origem geográfica, código de acesso e referências bibliográficas para as sequências de citocromo b usadas no presente estudo.

Species	ID	Coordenadas Geográficas	Origin	GenBank Accession	Reference
<i>Alouatta guariba</i>	AgRioJan	-	Rio de Janeiro, Brazil	DQ679771	Harris et al. (2005)
<i>Alouatta guariba</i>	AgARG	-26.94, -54.51	Misiones, Argentina	OM328862	Janiak et al. (2022)
<i>A. belzebul</i>	AbTu	-	Tucuruí, Pará, Brazil	AY374348	Nascimento et al. (2005)
<i>A. belzebul</i>	AbSAPPB	-	Sapé, Paraíba, Brazil	DQ398007	Nascimento et al. (2008)
<i>A. belzebul</i>	AbALT	-3.39, -52	Pará, Brazil	OM328949	Janiak et al. (2022)
<i>A. ululata</i>	AuCM	-	Campo Maior, Piauí, Brazil	MW958296	Povill et al. (2022)
<i>A. ululata</i>	AuDP	-	Delta do Parnaíba, Brazil	MW958297	Povill et al. (2022)
<i>A. discolor</i>	AdXiW	-	Oeste do Xingu, Pará, Brazil	MW958281	Povill et al. (2022)
<i>A. discolor</i>	AdP	-3.37, -51.97	Pará, Brazil	OM328950	Janiak et al. (2022)
<i>A. caraya</i>	AcSM	-	Serra da Mesa, Goiás, Brazil	DQ350636	Nascimento et al. (2007)
<i>A. caraya</i>	AcSCB	-	Santa Cruz, Bolívia	AY065891	Cortés-Ortiz et al (2003)
<i>A. caraya</i>	AcArg	-27.65, -56.07	Corrientes, Argentina	OM328861	Janiak et al. (2022)
<i>A. caraya</i>	AcROND	-12.3, -63.32	Rondônia, Brazil	OM328891	Janiak et al. (2022)
<i>A. caraya</i>	AcYaItPA	-	Yaciretá, Itapua, Paraguay	DQ924863	Ascunce et al. (2007)
<i>A. macconnelli</i>	AmBAL2532	-	Balbina, Amazonas, Brasil	Este estudo	Este estudo
<i>A. macconnelli</i>	AmPD0417	-0.38 -64.79	Amazonas, Brazil	OM329044	Janiak et al. (2022)
<i>A. macconnelli</i>	AmPD0135	-0.98, -61.89	Roraima, Brazil	OM328915	Janiak et al. (2022)
<i>A. macconnelli</i>	AmPD0416	-1.46, -56.78	Pará, Brazil	OM329045	Janiak et al. (2022)
<i>A. macconnelli</i>	AmPD0005	0.85, -63.48	Amazonas, Brazil	OM328867	Janiak et al. (2022)
<i>A. macconnelli</i>	Astram	-	Barcelos, Amazonas, Brazil	AF289983	Bonvicino et al. (2001)
<i>A. nigerrima</i>	AnAV	-3.31, -55.33	Pará, Brazil	OM328951	Janiak et al. (2022)
<i>A. nigerrima</i>	AnIT84	-	Itaituba, Pará, Brasil	Este estudo	Este estudo
<i>A. sara</i>	AsaBO	-	Bolivia	AY065887	Cortés-Ortiz et al. (2003)

<i>A. sara</i>	AsaPER	-	Peru	KR902386	Gherzi et al. (2015)
<i>A. puruensis</i>	ApuMT	-9.95, -56.06	Mato Grosso, Brazil	OM328888	Janiak et al. (2022)
<i>A. puruensis</i>	ApuROND	-13.24, -60.34	Rondônia, Brazil	OM329055	Janiak et al. (2022)
<i>A. puruensis</i>	ApuAMAZON	-4.98, -62.97	Amazonas, Brazil	OM329047	Janiak et al. (2022)
<i>A. juara</i>	AjuPD0421	-3.22, -67.38	Amazonas, Brazil	OM329049	Janiak et al. (2022)
<i>A. juara</i>	AjuPD0420	-3.21, -67.40	Amazonas, Brazil	OM329048	Janiak et al. (2022)
<i>A. seniculus</i>	AsPD0428	-0.47 -64.58	Amazonas, Brazil	OM329056	Janiak et al.(2022)
<i>A. seniculus</i>	AsNebli	0.77, -65.71	Neblina, Brazil	OM328914	Janiak et al. (2022)
<i>A. seniculus</i>	AsRioAi	-0.59, -64.91	Rio Aiuana, Brazil	OM329046	Janiak et al. (2022)
<i>A. seniculus</i>	AsCOL	-	Colombia	AY065886	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. seniculus</i>	AsYasEQ	-	Equador	KJ452773	Morales-Jimenez et al. (2015)
<i>A. palliata</i>	ApaSME	-	Sudeste do México	MW452913	Solorzano-Garcia et al. (2021)
<i>A. palliata</i>	ApaCR	-	Costa Rica	OM328926	Janiak et al. (2022)
<i>A. palliata</i>	ApaAEQ	-	Barro colorado, Panamá	AY065883	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. palliata</i>	AcoiRiORIA	-	Rio Oria, Panamá	AY065882	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. pigra</i>	ApiME	-	México	AY065885	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. pigra</i>	ApiMEX	-	México	AY065884	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>Ateles paniscus</i>	Atpan	-1.42, -56.72	Pará, Brazil	OM328893	Janiak et al. (2022)
<i>Ateles chamek</i>	Atcham	-9.97, -56.08	Mato Grosso, Brazil	OM328892	Janiak et al. (2022)
<i>Ateles geoffroyi</i>	Atgeo	-	Costa Rica	OM328927	Janiak et al. (2022)
<i>Lagothrix lagotricha</i>	Lla	-6.94, -69.72	Amazonas, Brazil	OM328878	Janiak et al. (2022)
<i>Brachyteles arachnoides</i>	Br	-	CPRJ	JX262672	Schrage et al. (2012)

Tabela S7: Espécies, origem geográfica, código de acesso e referências bibliográficas para as sequências do gene ATP 6/8 usadas no presente trabalho.

Species	ID	Coordenadas Geográficas	Origin	GenBank Accession	Reference
<i>A. guariba</i>	AgARG	-26.94, -54.51	Misiones, Argentina	OM328862	Janiak et al. (2022)
<i>A. guariba</i>	AgRioJan	-	Rio de Janeiro, Brasil	AY065861	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. belzebul</i>	AbTu	-	Tucuruí, Pará, Brazil	AY374348	Nascimento et al. (2005)
<i>A. belzebul</i>	AbALT	-3.39, -52	Pará, Brazil	OM328949	Janiak et al. (2022)
<i>A. discolor</i>	AdXiW	-	Oeste do Xingu, Brazil	MW958281	Povill et al. (2022)
<i>A. discolor</i>	AdP	-3.37, -51.97	Pará, Brazil	OM328950	Janiak et al. (2022)
<i>A. caraya</i>	AcSCB	-	Santa Cruz, Bolívia	AY065859	Cortés-Ortiz et al (2003)
<i>A. caraya</i>	AcArg	-27.65, -56.07	Corrientes, Argentina	OM328861	Janiak et al. (2022)
<i>A. caraya</i>	AcROND	-12.3, -63.32	Rondônia, Brazil	OM328891	Janiak et al. (2022)
<i>A. juara</i>	AjuPD0420	-3.21, -67.40	Amazonas, Brazil	OM329048	Janiak et al. (2022)
<i>A. juara</i>	AjuPD0421	-3.22, -67.38	Amazonas, Brazil	OM329049	Janiak et al. (2022)
<i>A. puruensis</i>	ApuAMAZON	-4.98, -62.97	Amazonas, Brazil	OM329047	Janiak et al. (2022)
<i>A. sara</i>	AsaBO	-	Bolivia	AY065856	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. puruensis</i>	ApuMT	-9.95, -56.06	Mato Grosso, Brazil	OM328888	Janiak et al. (2022)
<i>A. puruensis</i>	ApuROND	-13.24, -60.34	Rondônia, Brazil	OM329055	Janiak et al. (2022)
<i>A. seniculus</i>	AsNebli	0.77, -65.71	Neblina, Brazil	OM328914	Janiak et al. (2022)
<i>A. seniculus</i>	AsRioAi	-0.59, -64.91	Rio Aiuana, Brazil	OM329046	Janiak et al. (2022)
<i>A. seniculus</i>	AsCOL	-	Colômbia	AY065855	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. seniculus</i>	AsPD0428	-0.47 -64.58	Amazonas, Brazil	OM329056	Janiak et al. (2022)
<i>A. macconnelli</i>	AmBAL2532	-	Balbina, Amazonas, Brasil	Este estudo	Este estudo
<i>A. macconnelli</i>	AmPD0417	-0.38 -64.79	Amazonas, Brazil	OM329044	Janiak et al. (2022)
<i>A. macconnelli</i>	AmPD0135	-0.98, -61.89	Roraima, Brazil	OM328915	Janiak et al. (2022)

<i>A. macconnelli</i>	AmPD0416	-1.46, -56.78	Pará, Brazil	OM329045	Janiak et al. (2022)
<i>A. macconnelli</i>	AmPD0005	0.85, -63.48	Amazonas, Brazil	OM328867	Janiak et al. (2022)
<i>A. nigerrima</i>	AnAV	-3.31, -55.33	Pará, Brazil	OM328951	Janiak et al. (2022)
<i>A. nigerrima</i>	AnIT84	-	Itaituba, Pará, Brasil	Este estudo	Este estudo
<i>A. palliata</i>	ApaSME	-	Vera Cruz, Mexico	AY065845	Cortés-Ortiz et. (2003)
<i>A. palliata</i>	ApaCR	-	Costa Rica	OM328926	Janiak et al. (2022)
<i>A. palliata</i>	ApaAEQ	-	Barro colorado, Panamá	AY065852	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. palliata</i>	AcoiRiORIA	-	Rio Oria, Panamá	AY065851	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. pigra</i>	ApiME	-	Tabasco, Mexico	AY065853	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>A. pigra</i>	ApiMEX	-	Tabasco, Mexico	AY065854	Cortés-Ortiz et al. (2003)
<i>Ateles paniscus</i>	Atpan	-1.42, -56.72	Pará, Brazil	OM328893	Janiak et al. (2022)
<i>Ateles chamek</i>	Atcham	-9.97, -56.08	Mato Grosso, Brazil	OM328892	Janiak et al. (2022)
<i>Ateles geoffroyi</i>	Atgeo	-	Costa Rica	OM328927	Janiak et al. (2022)
<i>Lagothrix lagotricha</i>	Lla	-6.94, -69.72	Amazonas, Brazil	OM328878	Janiak et al. (2022)
<i>Brachyteles arachnoides</i>	Br	-	CPRJ	JX262672	Schrago et al. (2012)

CONCLUSÃO GERAL

O gênero *Alouatta* é composto por dois clados: O Mesoamericano e o Sul-americano. O gênero pode ser dividido em dois grupos monofiléticos, com relação às espécies Sul-americanas. O primeiro juntando o complexo *A. belzebul* e com a espécie *A. guariba*, e o segundo grupo formado por *A. caraya* e pelo complexo de espécies amazônicas *A. seniculus*. A época do Plioceno foi um período em que ocorreram os principais eventos de separação dentro dos grupos Sul-americano e Mesoamericano. O complexo *A. belzebul* e *A. guariba* são grupos irmãos, sugerindo uma conexão histórica entre a Amazônia e Mata Atlântica, que foi rompida durante o Plioceno. As espécies *A. nigerrima* e *A. discolor* podem ser consideradas linhagens distintas, com histórias evolutivas independentes. A origem dessas duas espécies ocorreu durante o Pleistoceno, e estão entre as espécies com origem e diversificação mais recente dentro do gênero.

O gênero *Alouatta* apresenta uma ampla distribuição geográfica. Ao longo de sua distribuição nas Américas, são poucos os estudos que integraram amostras de diferentes pontos geográficos em um contexto filogenético ou biogeográfico. O estudo dessa tese incluiu a primeira análise biogeográfica dos macacos guaribas usando métodos probabilísticos e realizou uma análise filogenética do gênero *Alouatta*, reunindo um banco de dados com dois genes mitocondriais para 13 taxa de macacos guariba. Os resultados deste estudo apontam que a primeira separação em *Alouatta* ocorreu há cerca de 6 milhões de anos, data que coincide, aproximadamente, com a formação do norte dos Andes, que presumivelmente, teria levado a esse evento. O oeste da Amazônia foi uma área importante na radiação de espécies dentro do gênero. É possível que a formação do Rio Amazonas transcontinental possa ter levado à primeira separação dentro do clado Sulamericano de *Alouatta*. O Plioceno foi uma época de alta frequência de eventos de diversificação em *Alouatta*. Embora algumas espécies possuam origem mais recente, no pleistoceno. O táxon *A. puruensis* não se sustenta como uma espécie válida, não devendo ser mais usado nos arranjos taxonômicos, uma vez que esse táxon se agrupa dentro de um clado com *A. seniculus*, mas também dentro de outro clado com *A. sara*, formando assim um grupo polifilético. Além disso, presumivelmente, *A. sara* apresenta uma distribuição geográfica mais ampla do que a referida na literatura. O oeste da Amazônia foi apontado como uma área chave da origem e diversificação dos principais grupos do gênero, além da formação da diagonal seca do continente Sul-americano.