

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

LUANA PORTELA FARIA E ÁVILA

**Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs)
identificadas dentro do gênero *Alouatta* Lacèpède, 1799
(Atelidae, Primates) por abordagens de delimitação de
espécies *single-gene* (mtDNA)**

SÃO CARLOS

2022

LUANA PORTELA FARIA E ÁVILA

**Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs)
identificadas dentro do gênero *Alouatta* Lacèpède, 1799
(Atelidae, Primates) por abordagens de delimitação de
espécies *single-gene* (mtDNA)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Domingues de Freitas.




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Luana Portela Faria e Ávila, realizada em 23/09/2022.

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA DOMINGUES DE FREITAS
Data: 04/10/2022 10:08:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas (UFSCar)

Prof. Dr. Manolo Fernandez Perez (UFSCar)

Profa. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino (INCA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre foi e sempre será o meu maior apoio. Mãe, obrigada por dizer “Estou com você!” de várias formas durante todo esse período. Pai, obrigada por todo o apoio financeiro para seguir os meus planos profissionais, mas também pelas lições valiosas sobre a vida, sempre aceitando a mulher que estou me tornando e as minhas decisões. Agradeço aos meus irmãos, Lucas e Guilherme que sempre me apoiaram.

Agradeço a todos os colegas de laboratório (Carmen Diaba, Rô, Karenzita, Ak, Carolzéty, Marinex Abacaxizinho, Brunão e Carlinha) que me ensinaram muito mais do que conduzir experimentos de laboratório, me mostraram a importância de cooperar, de admitir os próprios erros (alô GelRed!) e aprender a lidar com as consequências. Agradeço especialmente a minha colega, amiga e irmã, Nayra, por ter me ajudado tanto de diferentes formas durante todo esse período.

Agradeço a todos os queridos amigos pelas cervejas, risadas, brisas e passeios de bicicleta que foram tão importantes para deixar esse período mais leve!

Agradeço ao meu amigo-irmão e professor de yoga, Jhow, que me ensinou sobre o poder da meditação e a convocar a guerreira que há dentro de mim.

Agradeço a minha professora de inglês e amiga, Adele, que me preparou profissionalmente e me acolheu como uma mãe em sua casa.

Agradeço à minha orientadora, Patrícia, minha mãe científica, que quase enlouqueceu (foi ela quem disse, hein!), mas abraçou todas as minhas ideias loucas! Obrigada por abrir as portas do laboratório, por me orientar, me ensinar tanto sobre escrita científica e por todas as vezes que chamou a minha atenção.

Agradeço ao Renato Gregorin, meu pai científico, que me ensinou tanto sobre taxonomia e filogenia dos primatas neotropicais, especialmente, dos bugios. Agradeço, Renatin, por você sempre acreditar no meu potencial como pesquisadora e me incentivar a ir além.

Agradeço aos pesquisadores Dr. Sérgio L. Mendes (UFES), Dr. Fabiano R. de Melo (UFV), Dr. Fernando Perini (UFMG), Dr. Victor Y. Guimarães (UNESP), Dr^a Lilian Catenacci (UFPI), Ms. Cauê Monticelli (CECFAU), Fernanda D. Abra (Projeto Reconecta) e às instituições, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSM), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB), Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros e ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros (CPB) que colaboraram com as amostras biológicas que resultaram nesta dissertação de mestrado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pela oportunidade de cursar o mestrado e ao Governo Federal Brasileiro que me concedeu uma bolsa de estudo CAPES.

Agradeço às mulheres que abriram os caminhos para tornar a ciência acessível a todas nós!

RESUMO

Os bugios ou guaribas são primatas pertencentes ao gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 (Atelidae, Primates) que possuem uma ampla distribuição geográfica, com espécies ocorrendo na Mesoamérica e América do Sul. Revisões taxonômicas apontam a existência de cinco a 12 espécies no gênero e as relações filogenéticas entre estas ainda não estão totalmente resolvidas. O DNA *barcoding* e as abordagens de delimitação de espécie *single-gene* associadas a este método têm permitido acessar a diversidade genética interespecífica e intraespecífica e fornecer dados para delimitação de Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs). O presente trabalho teve como objetivo avaliar se as MOTUs recuperadas dentro do gênero *Alouatta* são condizentes com as propostas taxonômicas para os bugios que ocorrem no Brasil. Este estudo incluiu representantes de diversas localidades dos seguintes táxons: *A. pigra*, *A. palliata* (*A. p. mexicana*, *A. p. coibensis*, *A. p. trabeata*, *A. p. aequatorialis*), *A. belzebul* (*A. b. discolor*, *A. b. ululata*); *A. caraya*; *A. guariba* (*A. g. clamitans*); *A. seniculus* (*A. s. juara*, *A. s. puruensis*, *A. sara*); *A. macconnelli* e *A. nigerrima*. Foram analisadas duas regiões do genoma mitocondrial, Citocromo Oxidase B (*Cyt b*) e Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Para o *Cyt b* foram analisadas 339 sequências, sendo 138 delas produzidas neste trabalho e 201 provenientes do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A região intrônica do gene nuclear *NPAS3.2* também foi analisada, mas se mostrou monomórfica. Para o COI, analisamos um total de 98 sequências, dentre as quais 82 foram geradas neste estudo e 16 obtidas do GenBank. Para delimitar as MOTUs, analisamos os dados de *Cyt b* e COI, independentemente, adotando (1) abordagens de delimitação baseadas em distância genética (jMOTU e ASAP), utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) e calculando o *threshold* ótimo (OT); e (2) abordagens baseadas em coalescência-filogenética (PTP, bPTP, GMYC). A abordagem de distância apontou um OT entre a variação intra-interespecífica de 1,34% e 1,11% para o COI e *Cyt b*, respectivamente. Nossos resultados delimitaram um total de 12 MOTUs para o gênero *Alouatta*, sendo 11 MOTUs consenso, as quais correspondem potencialmente às entidades taxonômicas, conforme descrito a seguir: MOTU-pigra (*A. pigra*); MOTU-palliata (*A. palliata* e subespécies); MOTU-caraya (*A. caraya*); MOTU-seniculus 1 (*A. sara* e *A. s. puruensis*); MOTU-seniculus 2 (*A. seniculus* e *A. s. juara*); MOTU-macconnelli (*A. macconnelli*); MOTU-nigerrima (*A. nigerrima*); MOTU-belzebul 1 (*A. discolor*); MOTU-belzebul 2 (*A. belzebul* e *A. b. ululata*); e as três MOTUs para os bugios da Mata Atlântica sul-sudeste (*A. guariba*) que distinguiu os espécimes da Mata Atlântica do RJ como MOTU-guariba 1 (*A. clamitans*), do ES, MG e BA como MOTU-guariba 2 (*A. guariba*) e de SC como MOTU-guariba 3 (*A. clamitans*). Espécimes provenientes de SP apresentaram um arranjo parafilético nestas três MOTUs, fato que pode indicar presença de polimorfismo ancestral, hibridação, ou ser interpretado como uma possível zona de contato ou de migração que recebeu animais provenientes de linhagens distintas. Nossos dados identificaram pelo menos duas linhagens evolutivas independentes para os complexos *A. guariba*, *A. seniculus* e *A. belzebul* sugerindo incongruências taxonômicas. Em relação à *A. nigerrima*, embora as análises com o *Cyt b* tenham recuperado esta espécie na MOTU-macconnelli, as análises de coalescência-filogenética a separaram em clado distinto e exclusivo, com alto valor de suporte (PP>0.9). Além disso, essa espécie possui distribuição geográfica alopátrica e é reconhecida como válida pela taxonomia clássica, por isso nós a consideramos como uma MOTU distinta da MOTU-macconnelli, com divergência recente, mas ressaltamos a importância de ampliar a amostragem desse táxon e realizar análises complementares, incluindo outras regiões do genoma.

Palavras-chave: primatas neotropicais, delimitação de espécies, Métodos de filogenética-coalescência, DNA barcoding.

ABSTRACT

The howler monkeys or guaribas are Neotropical primates belonging to the genus *Alouatta* Lacépède, 1799 (Atelidae, Primates) that have a wide distribution in the Americas, occurring in the Mesoamerica and South America. Taxonomic reviews point to the existence of five to 14 species in the genus and phylogenetic relationships among them are not yet fully resolved. DNA barcoding, and the associated single-gene species delimitation approaches, have allowed the study of inter and intraspecific genetic diversity and provided data for delimiting Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs). The present study aimed to assess whether the MOTUs recovered within the genus *Alouatta* are consistent with current taxonomic proposals for howler monkeys in Brazil. Our study included samples from several localities in Brazil of the following taxa: *A. pigra*, *A. palliata* (*A. p. mexicana*, *A. p. coibensis*, *A. p. trabeata*, *A. p. aequatorialis*), *A. belzebul* (*A. b. discolor*, *A. b. ululata*); *A. caraya*; *A. guariba* (*A. g. clamitans*); *A. seniculus* (*A. s. juara*, *A. s. puruensis*, *A. sara*); *A. macconnelli* e *A. nigerrima*. We analyzed two regions of the mitochondrial genome, Cytochrome Oxidase B (*Cyt b*) and Cytochrome Oxidase subunit I (COI). We analyzed 339 sequences for *Cyt b* with 138 of them produced in this study and 201 obtained from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). For COI, we analyzed a total of 98 sequences, among which 82 were generated in this study and 16 were obtained from GenBank. To delimit MOTUs, we analyzed *Cyt b* and COI data independently by adopting (1) genetic distance-based delimitation approaches (jMOTU and ASAP) using the Kimura 2-parameter model (K2P) and calculating the optimal threshold (OT); and (2) approaches based on coalescence and phylogeny (PTP, bPTP, GMYC). The distance approach pointed to 1.34% and 1.11% as optimal thresholds between intraspecific variation for COI and *Cyt b* regions, respectively. Our results delimited 12 MOTUs within the genus *Alouatta* that correspond to taxonomic entities proposed by different systematic reviews, as follows: MOTU-pigra (*A. pigra*), MOTU-palliata (*A. palliata*, including all subspecies), MOTU-caraya (*A. caraya*), MOTU-seniculus 1 (*A. sara* and *A. s. puruensis*), MOTU-seniculus 2 (*A. seniculus* and *A. s. juara*), MOTU-macconnelli (*A. macconnelli*), MOTU-nigerrima (*A. nigerrima*), MOTU-belzebul 1 (*A. discolor*), MOTU-belzebul 2 (*A. belzebul* and *A. b. ululata*), MOTU-guariba 1, MOTU-guariba 2, MOTU-guariba 3. The three MOTUs for the southern-southeastern Atlantic Forest howler monkeys (*A. guariba*) distinguish those from RJ and MG as MOTU-guariba 1 (*A. clamitans* 1), those from ES, MG and BA as MOTU-guariba 2 (*A. guariba*) and those from SC as MOTU-guariba 3 (*A. clamitans* 2). Specimens from SP showed a paraphyletic arrangement in the three MOTUs, which may indicate the presence of ancestral polymorphism, hybridization, or be interpreted as a possible contact or migration zone that received animals from distinct lineages. Our data identified at least two independent evolutionary lineages for the *A. guariba*, *A. seniculus* and *A. belzebul* complexes, suggesting taxonomic inconsistencies. However, for *A. nigerrima* the *Cyt b* analyses recovered this species inside MOTU-macconnelli, the coalescence phylogenetic analyses show a unique and exclusive group with a high support value (PP>0.9). On the other hand, this species has an allopatric distribution, and their traditional taxonomic classification is recognized as valid. Thus, we consider it a distinct MOTU from MOTU-macconnelli, with recent divergence, but emphasize the importance of extending the sampling of this taxon, and performing complementary analyses, including other regions of the genome.

Keywords: neotropical primates, species delimitation, phylogenetics-coalescent methods, DNA barcoding.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica das espécies de *Alouatta* fornecida pela IUCN da lista de espécies ameaçadas. 16
- Figura 2.** Ilustração exemplificando os caracteres morfológicos utilizados por diferentes taxonomistas para delimitar o número de espécies que constituem o gênero *Alouatta*. **2a.** Diferentes padrões de coloração da pelagem de espécimes de museu de *A. clamitans*; **2b.** Aparato ósseo hioide com variação em tamanho e formato em machos de (39) *A. belzebul*, (30) *A. discolor*, (36) *A. ululata*. Imagens adaptadas de Gregorin (2006). 18
- Figura 3.** Mapa do mitogenoma (mtDNA) do mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) representando a posição dos genes mitocondriais no genoma de Primatas com destaque para o gene COI adotado como marcador molecular que atua como um “código de barras” no método DNA barcoding. Fonte: Imagem adaptada de Freitas et al., 2018. 23
- Figura 4.** Mapa com os pontos de amostragem das diferentes espécies de *Alouatta*. Os círculos representam a localização das amostras coletadas para este trabalho. Os losangos representam a localização dos indivíduos cujas sequências foram obtidas no GenBank para o gene Cyt b. 30
- Figura 5.** Árvore bayesiana ultramétrica para o gene COI apresentando as relações evolutivas dos táxons do gênero *Alouatta*. As barras na lateral representam as MOTUs identificadas por cada abordagem de delimitação single-gene. A cor azul representa o complexo de espécies *A. belzebul*, verde o complexo *A. guariba*, amarelo *A. caraya*, marrom *A. macconnelli* e em laranja o complexo *A. seniculus*. As barras pretas representam as MOTUs consenso recuperadas: (1) MOTU-belzebul 1, (2) MOTU-belzebul 2, (3) MOTU-guariba 1, (4) MOTU-guariba 2, (5) MOTU-guariba 3, (6) MOTU-caraya, (7) MOTU-macconnelli, (8) MOTU-seniculus 1, (9) MOTU-seniculus 2. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior ($PP > 0.9$). 39
- Figura 6.** Árvore bayesiana ultramétrica para o gene Cyt b apresentando as relações evolutivas dos táxons do gênero *Alouatta*. As barras na lateral representam as MOTUs identificadas por cada abordagem de delimitação single-gene. A cor azul representa o complexo de espécies *A. belzebul*, verde o complexo *A. guariba*, amarelo *A. caraya*, marrom *A. macconnelli*, em roxo *A. nigerrima*, em laranja o complexo *A. seniculus*, em vermelho o complexo *A. palliata* e em rosa *A. pigra*. As barras pretas representam as MOTUs consenso recuperadas: (1) MOTU-belzebul 2, (2) MOTU-belzebul 1, (3) MOTU-guariba 1, (4) MOTU-guariba 2, (5) MOTU-guariba 3, (6) MOTU-caraya, (7) MOTU-macconnelli, (8) MOTU-seniculus 1, (9) MOTU-seniculus 2, (10) MOTU-palliata e (11) MOTU-pigra. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior ($PP > 0.9$). 40
- Figura 7.** Árvore bayesiana ultramétrica para o gene Cyt b representando apenas o complexo *A. belzebul* e as MOTUs recuperadas para cada abordagem de delimitação de espécies. As barras pretas representam as MOTUs consenso. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior ($PP > 0.9$). 41
- Figura 8.** Árvore bayesiana ultramétrica para o gene Cyt b representando apenas o complexo de espécie *A. guariba* e as MOTUs recuperadas para cada abordagem de delimitação de espécies. As barras pretas representam as MOTUs consenso. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior ($PP > 0.9$). 42
- Figura 9.** Árvore bayesiana ultramétrica para o gene Cyt b representando as relações entre *A. caraya*, *A. macconnelli*, *A. nigerrima*, *A. seniculus*, *A. palliata* e *A. pigra* indicando as MOTUs recuperadas para cada abordagem de delimitação de espécies. As barras pretas representam as MOTUs consenso. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior ($PP > 0.9$). 43

Figura 10. Gráfico dos quadrantes baseado no gene COI comparando as máximas distâncias intraespecíficas e mínimas interespecífica de quatro espécies de *Alouatta* válidas de acordo com Groves (2001). O ótimo threshold adotado foi de 1,34% de. Os pontos distribuídos no gráfico representam as espécies. No quadrante I estão as espécies *A. caraya* (amarelo). No quadrante II estão situadas as demais espécies, *A. belzebul* (azul), *A. guariba* (verde) e *A. seniculus* (laranja). Os quatro quadrantes indicados representam: (I) a identificação molecular é concordante com a taxonomia; (II) há possíveis complexos de espécies ou espécies crípticas; (III) casos de sinonímias, hibridação ou espécies que divergiram recentemente e (IV) identificação molecular não corresponde com a taxonomia 48

Figura 11. Gráfico dos quadrantes baseado no gene Cyt b comparando as máximas distância intraespecíficas e mínimas interespecífica de quatro espécies de *Alouatta* válidas de acordo com Groves (2001). O ótimo threshold adota foi de 1,1%. Os pontos distribuídos no gráfico representam as espécies. No quadrante I estão as espécies *A. macconnelli* (marrom), *A. pigra* (rosa) e *A. palliata* (vermelho). No quadrante II estão situadas as demais espécies *A. caraya* (amarelo), *A. belzebul* (azul), *A. guariba* (verde) e *A. seniculus* (laranja). Os quatro quadrantes indicados representam: (I) a identificação molecular é concordante com a taxonomia; (II) há possíveis complexos de espécies ou espécies crípticas; (III) casos de sinonímias, hibridação ou espécies que divergiram recentemente e (IV) identificação molecular não corresponde com a taxonomia..... 49

Figura 12. Mapa da distribuição geográfica de *Alouatta caraya*, baseado nos dados disponíveis na IUCN. Os triângulos representam a localidade dos espécimes analisadas por Gregorin (2006). Os círculos e losângulos correspondem aos espécimens analisados no presente estudo que compreendem a MOTU-caraya..... 54

Figura 13. Mapa da distribuição geográfica estimada pela a IUCN para *A. macconnelli* (marrom), *A. seniculus* sobrepondo a *A. juara* (laranja escuro), *A. puruensis* (laranja claro) e *A. sara* (rosa). Os triângulos representam a localidade das espécimes analisadas por Gregorin (2006). O losango representa os dados obtidos do GenBank. Os círculos representam os novos dados gerados para MOTU-macconnelli (marrom), MOTU-seniculus 1 (laranja claro), MOTU-seniculus 2 (laranja escuro)..... 56

Figura 14. Mapa da distribuição geográfica do complexo *A. belzebul* (*belzebul*, *discolor*, *ululata*) nos diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Amazônia). Os triângulos representam a localidade das espécimes analisadas por Gregorin (2006), azul escuro são as espécimes descritas como *A. belzebul*, azul claro *A. discolor* e acinzentado *A. ululata*. Os losangos são as sequências dos diferentes táxons obtidas no banco de dados GenBank. Os círculos na cor azul claro representam a MOTU-belzebul 1 e em azul escuro MOTU-belzebul 2. 61

Figura 15. Mapa da distribuição geográfica do complexo *A. guariba* (*guariba* e *clamitans*) na Mata Atlântica sul-sudeste. Os triângulos representam a localidade das espécimes analisadas por Gregorin (2006), verde escuro são as espécimes descritas como *A. fusca* (= *A. guariba*), verde claro *A. clamitans*. Os losangos são as sequências dos diferentes táxons obtidas no banco de dados GenBank. Os círculos verde escuro representam a MOTU-guariba 1 (BA/MG/ES), em verde intermediário MOTU-guariba 2 (RJ) e em verde claro a MOTU-guariba 3 (SC)..... 64

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material Suplementar S3 Figura 16. Eletroferograma do gene COI para indivíduos da espécie *Alouatta guariba* mostrando a sobreposição de picos (A-G e C-T). Destacado em preto, o sítio 227 apresentou sobreposição de picos para vários indivíduos em ambas as sequências (F e R) ou para pelo menos uma delas. Destacado em vermelho, as sequências F e R de um mesmo indivíduo apresentaram picos de nucleotídeos diferentes entre si..... 108

Material Suplementar S3 Figura 17. Eletroferograma do gene COI para indivíduos da espécie *Alouatta guariba* mostrando a sobreposição de picos (A-G e C-T). Destacado em preto, o sítio 251 apresentou sobreposição de picos para vários indivíduos em ambas as sequências (F e R) ou para pelo menos uma delas. Destacado em vermelho, as sequências F e R de um mesmo indivíduo apresentaram picos de nucleotídeos diferentes entre si..... 109

Material Suplementar S4 Figura 18. Árvore Neighbour-Joining (NJ) para o íntron NPAS3.2 apresentando ramos com politomias não distinguindo as diferentes espécies de *Alouatta* (*A. s. juara*, *A. seniculus*, *A. belzebul*, *A. g. clamitans*, *A. caraya*, *A. sara* e *A. palliata*). 111

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classificações taxonômicas para as espécies e subespécies do gênero *Alouatta* consideradas válidas por diferentes autores. Hill (1962) reconhece 5 espécies dentro do gênero; Gregorin (2006) reconhece 10 espécies com base no padrão de coloração da pelagem, medidas morfo-craniais e do osso hioide de espécimes que ocorrem na América do Sul com foco no Brasil; A revisão bibliográfica de Rylands et al. (2006) assume que há três espécies ocorrendo na Mesoamérica; Cortés-Ortiz et al. (2015) assumem 12 espécies e 12 subespécies dentro do gênero a partir dos dados de revisões taxonômicas, citogenéticos e genéticos (genes mitocondriais Cyt b, COI, COII e outros marcadores moleculares). 17
- Tabela 2.** Diversidade cromossômica e sistemas múltiplos sexuais das diferentes espécies do gênero *Alouatta*. Dados adaptados de Steinberg et al. (2014). 21
- Tabela 3.** Distâncias genéticas (K2P) calculadas a partir do COI representando as mínimas e máximas intraespecíficas (mesma espécie) e interespecíficas (entre espécies) (%) das espécies do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) com pelo menos duas sequências disponíveis por espécie ($n \geq 2$). Os valores em negrito indicam os valores intraespecíficos máximos maiores que 1,34% (OT) sugerindo diversidade críptica para essas espécies. 45
- Tabela 4.** Média das distâncias genéticas (K2P) intraespecíficas ($\% \pm$ desvio padrão) dos genes mitocondriais Cyt b e COI para as espécies do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) com pelo menos duas sequências disponíveis por espécie ($n \geq 2$). Os valores em negrito indicam os valores médios intraespecíficos maiores que 1,11% e 1,34% (OT) sugerindo diversidade críptica para essas espécies. 45
- Tabela 5.** Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) entre espécies do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) calculadas para o gene COI. Os números na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão. 46
- Tabela 6.** Distâncias genéticas (K2P) calculadas a partir do Cyt b representando as mínimas e máximas intraespecíficas e interespecíficas (%) do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) com pelo menos duas sequências disponíveis por espécie ($n \geq 2$). Os valores em negrito indicam os valores intraespecíficos máximos maiores que 1,11% (OT) sugerindo diversidade críptica para essas espécies. 46
- Tabela 7.** Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) entre as espécies do gênero *Alouatta* calculadas para o gene Cyt b seguindo Groves (2001). Os números em azul na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão. O valor em negrito indica distância genética interespecífica abaixo de 1,11% (OT). 47
- Tabela 8.** Média das distâncias genéticas (K2P) intraespecíficas ($\% \pm$ desvio padrão) dos genes mitocondriais Cyt b e COI para as MOTUs consenso recuperadas para o gênero *Alouatta* com pelo menos duas sequências disponíveis por espécie ($n \geq 2$). 50
- Tabela 9.** Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) interespecíficas calculadas para o gene COI seguindo as MOTUs consenso identificadas para o gênero *Alouatta*. Os números em azul na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão (%). 50
- Tabela 10.** Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) interespecíficas calculadas para o gene Cyt b seguindo MOTUs consenso identificadas para o gênero *Alouatta*. Os números em azul na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão (%). 50

Tabela 11. Informações das MOTUs delimitadas no presente trabalho incluindo espécies identificadas, subespécies analisadas e a distribuição geográfica por continente e bioma para as espécies que ocorrem no Brasil..... 68

MATERIAL SUPLEMENTAR

S1 Tabela 12. Informações da localidade de coleta ou procedência dos táxons de *Alouatta* sequenciados para marcadores COI e/ou Cyt b neste trabalho..... 88

S2 Tabela 13. Lista das sequências obtidas no banco de dados que foram incluídas nas análises de delimitação de espécies do Cyt b e do COI. Descrição por marcador molecular incluindo a identificação utilizada nas análises genéticas, número de acesso GenBank, táxons, localidade e referência bibliográfica responsável pelo depósito das sequências..... 96

S5 Tabela 14. Abordagens de delimitação de espécies do gene COI e *Cyt b* que recuperaram as MOTUs consenso dentro do gênero *Alouatta* e quais táxons, com representantes de quais localidades foram incluídos em cada dessas unidades moleculares..... 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA/UFSCAR - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

mtDNA - DNA mitocondrial

COI - Citocromo C Oxidase subunidade I

Cyt b - Citocromo b

NPAS3.2 - *Neuronal PAS domain protein 3*

pb – pares de bases

DNA - Ácido desoxirribonucleico

GMYC - *Generalized mixed Yule-coalescent*

PTP – *Poisson Tree Process*

OT – *optimum threshold*

ASAP – *Assemble Species by Automatic Partitioning*

K2P - Kimura 2-parâmetros

NJ - *Neighbor-Joining*

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MOTU - Unidades taxonômicas operacionais moleculares (*Molecular Operational Taxonomic Units*)

ng - nanogramas

µl - microlitro

µM – micromol

km – Quilômetros

mL - mililitros

mM – milimolar

UHE - Usina hidrelétrica

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. Biologia, distribuição e contextualização taxonômica do gênero <i>Alouatta</i> | 15 |
| 1.2. Estudos citogenéticos e genético-moleculares em <i>Alouatta</i> | 20 |
| 1.3. O método DNA <i>barcoding</i> e abordagens para delimitação de espécies | 22 |
| 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS..... | 28 |
| 2.1. Justificativas e Objetivo Geral | 28 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 29 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 3.1. Amostragem biológica e extração de DNA | 29 |
| 3.2. Amplificação, purificação e sequenciamento de DNA | 31 |
| 3.3. Análises de delimitação baseadas em distância genética..... | 33 |
| 3.4. Análises de delimitação baseadas em filogenética e coalescência..... | 34 |
| 4. RESULTADOS..... | 35 |
| 4.1. Dados das sequências dos genes COI, <i>Cyt b</i> e íntron NPAS3.2 | 35 |
| 4.2. Delimitação de espécies <i>single-locus</i> baseadas em distância genética | 36 |
| 4.3. Delimitação de espécies <i>single-locus</i> baseadas em filogenética e coalescência..... | 37 |
| 4.4. Determinação do número de MOTUs consenso | 44 |
| 4.5. Cálculo das distâncias genéticas seguindo Groves (2001)..... | 45 |
| 4.6. Cálculo das distâncias genéticas seguindo as MOTUs consenso..... | 49 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 51 |
| 5.1. Bugios da Mesoamérica | 51 |
| 5.2. Bugios da América do Sul, com ênfase nos táxons que ocorrem no Brasil..... | 53 |
| 5.2.1. Espécie <i>A. caraya</i> , os bugios do Cerrado | 53 |
| 5.2.2. Complexo de espécies <i>A. seniculus</i> , os bugios da Amazônia Ocidental | 54 |
| 5.2.3 Espécies <i>A. macconnelli</i> e <i>A. nigerrima</i> , os bugios da Amazônia centro-oriental..... | 58 |
| 5.2.4. Complexo de espécies <i>A. belzebul</i> , bugios do norte-nordeste do Brasil..... | 60 |
| 5.2.5. Complexo de espécies <i>A. guariba</i> , os bugios da Mata Atlântica sul-sudeste.. | 63 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 67 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 68 |
| 8. MATERIAL SUPLEMENTAR | 88 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biologia, distribuição e contextualização taxonômica do gênero *Alouatta*

Os primatas do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 são popularmente conhecidos como bugios ou guaribas, mas também conhecidos como macacos uivantes (do inglês, *Howler Monkeys*) por possuírem vocalização alta, grave e com duração de até 55 minutos, a qual é possibilitada pelo aparato ósseo hioide que atua como uma caixa de ressonância (Cornick & Markowitz, 2002). Além disso, esses primatas são arborícolas, com dieta predominantemente folívora (Prates & Bicca-Marques, 2008) que por vezes consomem frutos atuando como potenciais dispersores de sementes (Giraldo et al., 2009). Os bugios vivem em grupos sociais constituídos por um macho alfa reprodutor, fêmeas reprodutoras e a prole (Treves, 2001). Machos e fêmeas de bugios são dispersores (Van Belle & Di Fiore, 2022) que percorrem distâncias variáveis, tendo sido reportados valores médios variando de 1,3 a 4,1 km e máximos de 3 a 13 km para fêmeas de espécies distintas (Glander, 1992; Richard-Hansen et al., 2000). A perda e fragmentação de habitat pode isolar as populações afetando a dispersão desses primatas (Arroyo-Rodríguez & Dias, 2010). Esta condição pode resultar na diminuição ou interrupção do fluxo gênico, ocasionando declínio populacional em fragmentos florestais isolados e/ou explorados, como agroecossistemas e áreas urbanas (Estrada et al., 2017). Para minimizar tais efeitos e garantir a viabilidade populacional a longo prazo, recomenda-se preservar e restaurar o habitat através da manutenção de corredores florestais que possibilitem conectividade e, conseqüentemente, dispersão e fluxo gênico (Oklander & Corach, 2013; Oklander et al., 2017).

O gênero *Alouatta* pertence à família Atelidae Gray, 1825 (Pavordem Platyrrhini), o qual inclui também os gêneros: *Ateles* É. Geoffroy, 1806 (macaco aranha); *Lagothrix* É. Geoffroy, 1812 (macaco barrigudo) e *Brachyteles* Spix, 1823 (muriqui ou monocarvoeiro) (Rylands & Mittermeier, 2009). Schneider e Sampaio (2015) subdividiram os Atelídeos nas subfamílias Atelinae (*Ateles*, *Brachyteles* e *Lagothrix*) e Alouattinae, sendo esta última composta por *Alouatta* incluindo a espécie fóssil *Alouatta mauroi* e quatro gêneros fósseis extintos (*Stirtonia*, *Paralouatta*, *Solimoea*, *Protopithecus*) (Rosenberger et al., 2015; Schneider & Sampaio, 2015; Tejedor et al., 2008).

O gênero *Alouatta* é representado por espécies politípicas (complexos de espécies), ou seja, que possuem metapopulações com distribuição geográfica predominantemente alopátrica ou parapátrica, as quais são frequentemente categorizadas como subespécies. Estes primatas neotropicais possuem ampla distribuição geográfica, com táxons ocorrendo de Veracruz no México (Estrada & Coates-Estrada, 1984) até Corrientes no norte-nordeste da Argentina (Cabrera, 1939) (Figura 1).

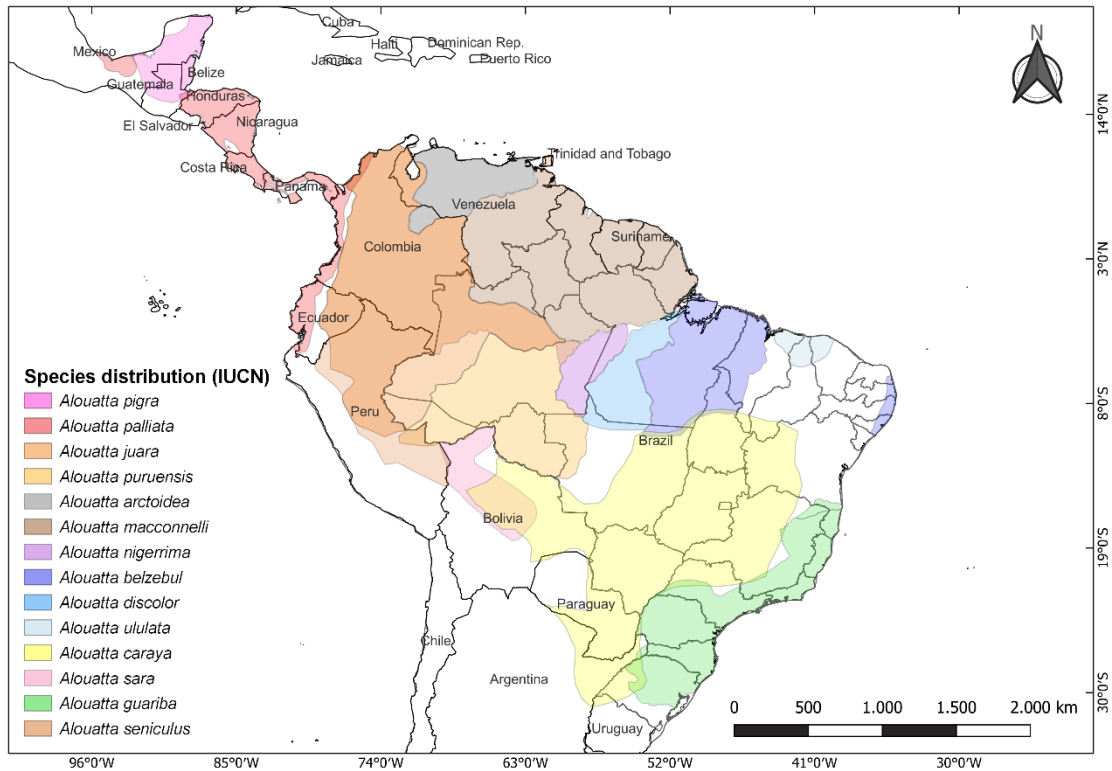


Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de *Alouatta* fornecida pela IUCN da lista de espécies ameaçadas.

O número de espécies e subespécies de *Alouatta* que ocorrem na Mesoamérica e na América do Sul é debatido por diversos autores, com propostas que sugerem a existência de cinco até 12 espécies (Tabela 1) (Cortés-Ortiz et al., 2015; Gregorin, 2006; Hill, 1962; Rylands et al., 2006; Rylands & Mittermeier, 2009).

Tabela 1. Classificações taxonômicas para as espécies e subespécies do gênero *Alouatta* consideradas válidas por diferentes autores. Hill (1962) reconhece 5 espécies dentro do gênero; Gregorin (2006) reconhece 10 espécies com base no padrão de coloração da pelagem, medidas morfo-craniais e do osso hioide de espécimes que ocorrem na América do Sul com foco no Brasil; A revisão bibliográfica de Rylands et al. (2006) assume que há três espécies ocorrendo na Mesoamérica; Cortés-Ortiz et al. (2015) assumem 12 espécies e 12 subespécies dentro do gênero a partir dos dados de revisões taxonômicas, citogenéticos e genéticos (genes mitocondriais *Cyt b*, COI, COII e outros marcadores moleculares).

| Autores | Espécies | Subespécies |
|---|--|--|
| Hill (1962)¹ | <i>A. caraya</i> | |
| | <i>A. belzebul</i> | <i>A. b. belzebul</i> , <i>A. b. discolor</i> , <i>A. b. mexiana</i> , <i>A. b. nigerrima</i> , <i>A. b. ululata</i> |
| | <i>A. guariba</i> | <i>A. g. beniensis</i> , <i>A. g. clamitans</i> , <i>A. g. guariba</i> |
| | <i>A. seniculus</i> | <i>A. s. seniculus</i> , <i>A. s. arctoidea</i> , <i>A. s. straminea</i> , <i>A. s. macconnelli</i> , <i>A. s. insulanus</i> , <i>A. s. amazonica</i> , <i>A. s. juara</i> , <i>A. s. puruensis</i> , <i>A. s. sara</i> |
| | <i>A. palliata</i> | <i>A. p. aequatorialis</i> , <i>A. p. mexicana</i> , <i>A. p. luctuosa</i> , <i>A. p. coibensis</i> , <i>A. p. trabeata</i> , <i>A. p. palliata</i> , <i>A. p. pigra</i> |
| Groves (2001)¹ | <i>A. caraya</i> | |
| | <i>A. belzebul</i> | |
| | <i>A. nigerrima</i> | |
| | <i>A. guariba</i> | <i>A. g. guariba</i> , <i>A. g. clamitans</i> |
| | <i>A. seniculus</i> | <i>A. s. seniculus</i> , <i>A. s. arctoidea</i> , <i>A. s. juara</i> |
| | <i>A. macconnelli</i> | |
| | <i>A. sara</i> | |
| | <i>A. palliata</i> | |
| <i>A. coibensis</i> | | |
| <i>A. pigra</i> | | |
| Gregorin (2006)^{12*} | <i>A. caraya</i> | |
| | <i>A. belzebul</i> | |
| | <i>A. discolor</i> | |
| | <i>A. ululata</i> | |
| | <i>A. nigerrima</i> | |
| | <i>A. fusca</i> (= <i>A. guariba</i>) | |
| | <i>A. clamitans</i> | |
| | <i>A. macconnelli</i> | |
| | <i>A. juara</i> | |
| | <i>A. puruensis</i> | |
| <i>A. palliata</i> | <i>A. p. palliata</i> , <i>A. p. mexicana</i> , <i>A. p. aequatorialis</i> | |
| Rylands et al. (2006) | <i>A. coibensis</i> | <i>A. c. coibensis</i> , <i>A. c. trabeata</i> |
| <i>A. pigra</i> | | |
| Cortés-Ortiz, Rylands e Mittermeier (2015) | <i>A. caraya</i> | |
| | <i>A. guariba</i> | <i>A. g. guariba</i> , <i>A. g. clamitans</i> |
| | <i>A. belzebul</i> | |
| | <i>A. discolor</i> | |
| | <i>A. ululata</i> | |
| | <i>A. seniculus</i> | <i>A. s. seniculus</i> , <i>A. s. juara</i> , <i>A. s. puruensis</i> |
| | <i>A. arctoidea</i> | |
| | <i>A. macconnelli</i> | |
| | <i>A. sara</i> | |
| | <i>A. nigerrima</i> | |
| | <i>A. palliata</i> | <i>A. p. mexicana</i> , <i>A. p. palliata</i> <i>A. p. coibensis</i> , <i>A. p. trabeata</i> e <i>A. p. aequatorialis</i> |
| | <i>A. pigra</i> | <i>A. p. pigra</i> e <i>A. p. luctuosa</i> |

* Autor não analisou os táxons que ocorrem na Mesoamérica (grupo *A. palliata* , *A. pigra* e *A. coibensis*) e analisou parcialmente os da América do Sul (complexo *A. seniculus*).

Decisões taxonômicas fundamentadas no ¹padrão de coloração da pelagem e/ou ² medidas morfo-craniais e do aparato ósseo hioide.

Revisões taxonômicas e sistemáticas para o gênero *Alouatta* têm sido feitas baseadas, principalmente, em medidas morfo-craniais e do aparato ósseo hioide, além do padrão de coloração da pelagem (Figura 2) e dados cariotípicos. A variedade de tonalidade observada nos bugios, entretanto, pode ser afetada por fatores distintos, como a faixa etária dos animais, a presença de pigmentos produzidos por glândulas secretoras (Hirano et al., 2003), e à hierarquia do macho no grupo (Thorington et al., 1984). Adicionalmente é possível observar um clareamento dos pelos em animais que vivem em habitats mais abertos, com maior incidência solar, além da despigmentação em animais depositados em coleções zoológicas, comumente submetidas à ação de conservantes e do tempo (ver Rylands e Brandon-Jones, 1998; Gregorin, 2006). Por isso, para decisões taxonômicas mais resolutivas é importante incluir, além do padrão de coloração da pelagem, medidas craniais e do aparato ósseo hioide, pois estes caracteres diagnósticos são considerados mais adequados para investigar a história evolutiva do grupo (Bjarnason et al., 2015).

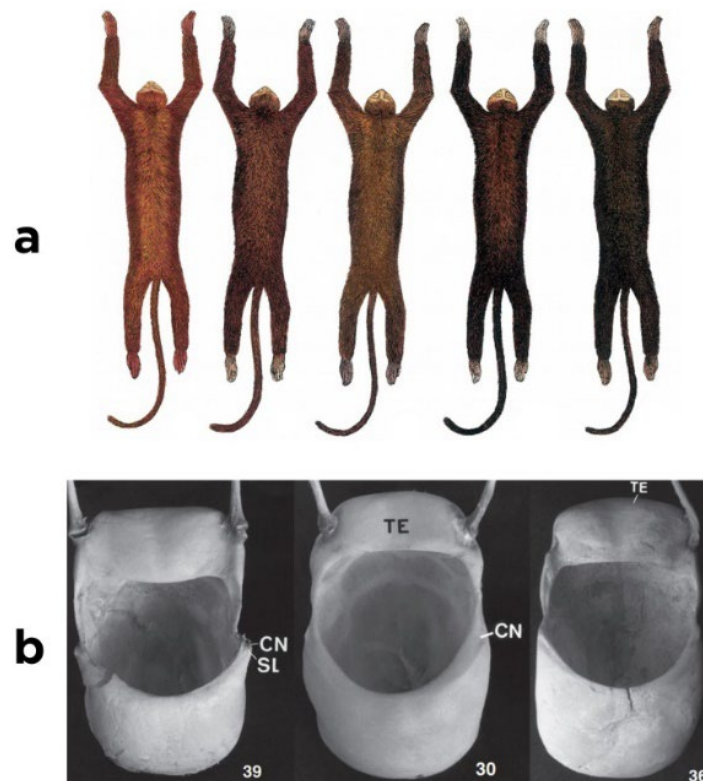


Figura 2. Ilustração exemplificando os caracteres morfológicos utilizados por diferentes taxonomistas para delimitar o número de espécies que constituem o gênero *Alouatta*. **2a.** Diferentes padrões de coloração da pelagem de espécimes de museu de *A. clamitans*; **2b.** Aparato ósseo hioide com variação em tamanho e formato em machos de (39) *A. belzebul*, (30) *A. discolor*, (36) *A. ululata*. Imagens adaptadas de Gregorin (2006).

Hill (1962) analisou o padrão de coloração da pelagem de bugios e descreveu um total de 20 subespécies e cinco espécies de *Alouatta*, sendo quatro delas com ocorrência no Brasil (*A. guariba*, *A. caraya*, *A. belzebul* e *A. seniculus*). Já Groves (2001) reuniu informações disponíveis para cor da pelagem, medidas morfo-craniais e dados cariotípicos e reconheceu um total de nove espécies: três espécies na Mesoamérica (*A. palliata*, *A. pigra* e *A. coibensis*) e sete espécies na América do Sul (*A. caraya*, *A. belzebul*, *A. nigerrima*, *A. guariba*, *A. seniculus*, *A. macconnelli* e *A. sara*), todas ocorrendo no Brasil, exceto *A. sara*. Posteriormente, a revisão de Rylands e colaboradores (2006) reuniu todos os arranjos propostos por taxonomistas para os bugios que ocorrem na Mesoamérica e consideraram três espécies: *A. palliata*, *A. pigra* e *A. coibensis*. Para o Brasil, Gregorin (2006) analisou 1.286 espécimes e reconheceu 10 espécies de *Alouatta* (*A. guariba*, *A. clamitans*, *A. caraya*, *A. juara*, *A. puruensis*, *A. macconnelli*, *A. nigerrima*, *A. belzebul*, *A. discolor*, *A. ululata*). Este estudo empregou métodos estatísticos e dados qualitativos da morfologia craniana, osso hioide, padrão de coloração da pelagem e dados cariotípicos de todos os táxons brasileiros, além de incluir espécimes de outros táxons que ocorrem na América do Sul (Bolívia, Colômbia, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela) para definição dos táxons no Brasil. Gregorin (2006) empregou uma taxonomia integrativa (Dayrat, 2005; Padial et al., 2010) considerando a congruências dos vários complexos de caracteres e aplicou o conceito filogenético de espécies (de Queiroz, 2007), o que justifica o número elevado de espécies e o não reconhecimento de subespécies. Recentemente, Cortés-Ortiz e colaboradores (2015) revisaram os trabalhos taxonômicos realizados até o momento, incluindo dados citogenéticos e moleculares disponíveis e assumiram 24 táxons para *Alouatta*, sendo 12 espécies e 12 subespécies, argumentando que para algumas espécies é recomendado acrescentar informações moleculares utilizando abordagens integrativas (que combinam análises morfológicas, moleculares, ecológicas, etc.) para uma validação taxonômica. Neste mesmo trabalho, os autores apontaram as sinonímias que geram confusões sobre as nomenclaturas utilizadas, como exemplo podemos mencionar a espécie de bugio que ocorre na Mata Atlântica do sul-sudeste do Brasil, nomeada como *A. guariba* e que é sinônimo de *A. fusca* (ver Gregorin, 2006). No presente estudo, nós adotamos a nomenclatura utilizada por Groves (2001) e considerada na última revisão proposta para o gênero *Alouatta* por Cortés-Ortiz e colaboradores (2015), que seguiram a interpretação dada por Rylands e Brandon-Jones (1998) ao usar o nome *A. guariba* para a espécie que ocorre na Mata Atlântica sul-sudeste.

1.2. Estudos citogenéticos e genético-moleculares em *Alouatta*

Dentre os principais estudos genéticos realizados no gênero *Alouatta* estão as abordagens genético-populacionais, citogenéticas, filogeográficas e filogenéticas (Bonvicino et al., 2001; Cortés-Ortiz et al., 2003; de Oliveira et al., 2002; Meireles et al., 1999; Nascimento et al., 2005; Ruiz-García et al., 2017; Villalobos et al., 2004). Na citogenética, de Oliveira e colaboradores (2002) descreveram o cariótipo e investigaram rearranjos cromossômicos de diferentes espécies de bugios, contribuindo para revalidação de táxons considerados subespécies, os quais foram elevados à categoria de espécie.

O valor diploide de cromossomos ($2n$) dentro de *Alouatta* varia de $2n = 23$ para *A. seniculus* da Colômbia (Torres & Leibovici, 2001; Yunis et al., 1976) até $2n = 58$ para *A. pigra* do México (Steinberg et al., 2008). Esta ampla variação do número diploide é explicada pela presença de microcromossomos, mas também por vários rearranjos cromossômicos que ocorreram ao longo do tempo evolutivo, tais como translocações e inversões (Mudry et al., 2015). Neste contexto, a maioria das espécies de *Alouatta* apresenta sistemas de cromossomos sexuais múltiplos (Tabela 2), os quais são classificadas em três tipos (trivalente: X_1X_2Y , quadrivalente: $X_1X_2Y_1Y_2$ e pentavalente: $X_1X_2X_3Y_1Y_2$), possivelmente, relacionados a origens evolutivas independentes (Steinberg et al., 2014).

Sob a perspectiva de estudos populacionais, análises utilizando marcadores de microssatélites avaliaram a diversidade genética das espécies e subespécies mesoamericanas *A. palliata* e *A. pigra* (Milton et al., 2009; Nidiffer & Cortés-Ortiz, 2015; Ruiz-Garcia et al., 2007; Solórzano-García et al., 2021; Van Belle et al., 2012); e as sul-americanas *A. caraya*, *A. seniculus*, *A. macconnelli* e *A. belzebul* (Bastos et al., 2010; Gonçalves et al., 2004; Oklander et al., 2010; Oklander et al., 2017; Ruiz-Garcia et al., 2007). Além disso, análises filogeográficas utilizando principalmente o gene mitocondrial da subunidade b da enzima Citocromo Oxidase (*Cyt b*) investigaram estrutura populacional na espécie *A. caraya* (Ascunce et al., 2007; Nascimento et al., 2005), assim como nos complexos de espécies *A. guariba* e *A. belzebul* (Bonvicino et al., 2001; Harris et al., 2005; Nascimento et al., 2005, 2008; Povill et al., 2022; Viana et al., 2015).

Tabela 2. Diversidade cromossômica e sistemas múltiplos sexuais das diferentes espécies do gênero *Alouatta*. Dados adaptados de Steinberg et al. (2014).

| Espécies | 2n | Sistema Cromossômico Sexual |
|---|---------------|---|
| <i>Alouatta belzebul</i> | ♀50 ♂49 | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y |
| <i>Alouatta seniculus seniculus</i> | ♀♂47 até 49† | XY |
| <i>Alouatta seniculus stramineus</i> (= <i>A. macconnelli</i>) | ♀♂47 até 49† | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta seniculus arctoidea</i> | ♀44 ♂45 ‡ | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta sara</i> | ♀♂ 48 até 51† | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y |
| | ♀♂50 | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta macconnelli</i> | ♀♂ 47 até 49† | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta caraya</i> | ♀♂52 | XX/XY |
| | | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta palliata</i> | ♀♂56 | XX/XY |
| | ♀54 ♂53 | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y |
| <i>Alouatta pigra</i> | ♀♂58 | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta guariba guariba</i> | ♀50 ♂49 | XX/XY |
| | ♂49 | X ₁ X ₂ Y |
| | ♀50♂49 | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ X ₃ X ₃ /X ₁ X ₂ X ₃ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta guariba clamitans</i> | | XX/XY |
| | ♀46 ♂45 | X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ /X ₁ X ₂ Y X ₁ X ₁ X ₂ X ₂ X ₃ X ₃ /X ₁ X ₂ X ₃ Y ₁ Y ₂ |
| <i>Alouatta nigerrima</i> | ♀50 | XX |
| <i>Alouatta coibensis</i> | ND | ND |

† Estas diferenças são devido a presença de microcromossomos (1 até 3 por núcleo);

ND: não foi citogeneticamente caracterizado

Em relação aos estudos de filogenias, estes têm se baseado em análises de um (*single-gene/single-locus*) ou mais genes (*multi-gene/multi-locus*) usando marcadores moleculares mitocondriais e/ou nucleares. As reconstruções filogenéticas têm fornecido evidências para confirmar algumas espécies, mas apresentam resultados divergentes quanto às relações evolutivas dentro do gênero (Bonvicino et al., 2001; Cortés-Ortiz et al., 2003; Doyle et al., 2021; Meireles et al., 1999; Nascimento et al., 2005; Ruiz-García et al., 2016, 2017; Viana et al., 2015; Villalobos et al., 2004). Estas divergências têm sido atribuídas às diferentes taxas evolutivas dos marcadores usados, além de fatores relacionados à amostragem, que pode apresentar representatividade geográfica incompleta e/ou reduzida em relação ao número de táxons (espécies e subespécies) e ao número de indivíduos analisado por táxon. Além dessas limitações, há ainda casos de hibridação no gênero entre *A. pigra* e *A. palliata* na região de Tabasco no México, e *A. guariba clamitans* e *A. caraya* no Brasil (Cortés-Ortiz et al., 2007; Mourthe et al., 2019), os quais foram confirmados com base na análise combinada de marcadores maternos

(mtDNA, DNA mitocondrial) e paternos (gene SRY, *Sex-determining Region Y*), além de microssatélites com alelos espécie-diagnósticos.

Embora, as evidências citogenéticas e os estudos filogenéticos e revisões taxonômicas em *Alouatta* sugiram que há entre 12 e 24 táxons (espécies e subespécies) dentro do gênero, para alguns táxons não há informações moleculares que permitam uma avaliação adequada do status taxonômico do grupo (Cortés-Ortiz et al., 2015). Portanto, o número de espécies e suas relações filogenéticas dentro do gênero *Alouatta* ainda não estão definidos, por isso há uma necessidade de utilização de ferramentas moleculares para delimitação de espécie focando em uma maior quantidade de indivíduos e em uma amostragem com ampla distribuição geográfica.

1.3. O método DNA *barcoding* e abordagens para delimitação de espécies

Dentre as principais abordagens genético-moleculares que auxiliam a taxonomia e sistemática está o método DNA *barcoding*, proposto inicialmente por Hebert et al. (2003). O DNA *barcoding* atua como um sistema “bioidentificador” global que possibilita atribuir uma classificação taxonômica para um grupo animal, incluindo os primatas e demais vertebrados, com base na análise da sequência de nucleotídeos de um fragmento pequeno (~600 pb) do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI) (Figura 3). Dentre as vantagens na utilização do DNA *barcoding* está a possibilidade de identificar espécies em qualquer estágio de vida (Meiklejohn et al., 2013) e também de diferenciar espécies crípticas, ou seja, morfologicamente indistinguíveis, e complexos de espécies que são morfologicamente muito semelhantes (Burns et al., 2008; Hebert, Penton, et al., 2004; Tyagi et al., 2017).

Similar a um “código de barras” (*barcode*), a identificação taxonômica via DNA *barcoding* é possibilitada pelas distintas combinações das quatro bases nitrogenadas (A, T, G, C) que compõem a sequência de DNA dos seres-vivos. Assim, para cada posição nucleotídica do gene COI pode-se gerar sequências únicas de referência para cada espécie (perfil-COI) (Hebert, Cywinska, et al., 2003).

A escolha de um marcador mitocondrial para a abordagem de DNA *barcoding*, ao invés de um nuclear, é justificada pelo genoma mitocondrial apresentar três principais características: (1) ausência de íntrons e facilidade de amplificação, dado seu elevado número de cópias por célula (Bogenhagen & Clayton, 1974); (2) ocorrência rara de

evolutivamente próximas e até mesmo distinguir grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (Mao et al., 2011; Ruiz-García et al., 2015).

Em 2004, foi criado o *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) com o principal objetivo de criar uma biblioteca pública de sequências de DNA associadas a espécimes nomeadas para toda biodiversidade global. Em seguida, foi desenvolvido o banco de dados BOLD (*Barcode of Life Database* <http://www.boldsystems.org/>), especializado em armazenar as sequências perfil-COI de referência. Este banco é consultado e alimentado por inúmeros grupos de pesquisa que geram novos dados e aumentam a eficiência da base, facilitando o processo de identificação de espécies pelo método de DNA *barcoding*. Para criação do perfil-COI é necessário submeter os seguintes dados por indivíduo: informações taxonômicas (espécie, gênero, família), dados do espécime (número de identificação, localidade e data), instituição na qual o espécime está depositado, identificador e/ou coletor do espécime, a sequência COI com no mínimo 500 pb, além de informações sobre os *primers* que foram utilizados nas amplificações do gene e os dados dos eletroferogramas das sequências depositadas na base de dados (Hubert & Hanner, 2015).

O DNA *barcoding* é uma ferramenta que tem duas principais ambições (1) facilitar a identificação de organismos, atribuindo uma classificação ao nível de espécie, e (2) facilitar a descoberta de novas espécies (Frézal & Leblois, 2008). A sua proposta inicial se baseia em análises de distância genética, que tem como premissa que a variação genética entre espécies (interespecífica) excede a variação dentro de espécies (intraespecífica) (Hebert, Cywinska, et al., 2003). Nesta abordagem, as distâncias par-a-par entre sequências são geralmente calculadas assumindo o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), que admite substituição livre de parâmetros para transições e transversões. No que se refere ao modelo evolutivo, as críticas relacionadas ao método baseado em distância destacam que o K2P não é a melhor opção (Srivathsan & Meier, 2012), porém, Collins e colaboradores (2012) demonstram que utilizá-lo não afeta a precisão na identificação das espécies. Adicionalmente, o método *Neighbor-Joining* (NJ) é geralmente utilizado para representação gráfica das relações genéticas da abordagem DNA *barcoding*, pois realiza reconstruções das relações genéticas a partir dos dados de distância genética, agrupando unidades taxonômicas em pares que minimizem os comprimentos dos ramos da topologia da árvore gerada (Saitou & Nei, 1987).

O valor limite (*threshold*), inicialmente sugerido, para a variação intra e interespecífica, e identificação das entidades moleculares pelo método de distâncias, foi

de 2% (Hebert, Ratnasingham, et al., 2003). Posteriormente, Hebert e colaboradores (2004) indicaram um *threshold* que fosse 10x a média das distâncias intraespecíficas calculadas para cada grupo. Contudo, Hickerson e colaboradores (2006) discutem que este último *threshold* sugerido é adequado apenas para espécies que se isolaram há mais de 4 milhões de gerações e que assumir esse valor para toda biodiversidade, possivelmente, levará a erros na identificação das espécies. Complementarmente, Ferri e colaboradores (2009) discutem dois tipos de erros que podem ocorrer nas abordagens baseadas em *threshold*: (1) o falso positivo, quando indivíduos de uma mesma espécie apresentam distância genética superior ao valor *threshold* estabelecido; e (2) o falso negativo, quando indivíduos de espécies diferentes apresentam distâncias genéticas menores que o *threshold*. Diante disto, os autores propõem que o valor de *threshold* mais apropriado seja aquele que contiver a menor taxa de erro cumulativo - o *threshold* ótimo (OT – *optimum threshold*). Portanto, estabelecer um *threshold* adequado é fundamental para realizar análises confiáveis baseadas neste critério.

Além do *threshold*, nas abordagens de distância genética, diferenças evidentes entre a variação intra e interespecífica resultam em um intervalo de distância denominado *barcoding gap* (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004; Hubert et al., 2008). Em casos que há a sobreposição desses valores (ausência do *barcoding gap*), o processo de identificação de espécies é dificultado, resultando em grupos polifiléticos ou parafiléticos. A ausência do *barcoding gap* pode ser resultante de uma amostragem incompleta, tanto em número, quanto em abrangência geográfica. Nessas situações, as variações intraespecíficas e interespecíficas serão, conseqüentemente, subestimadas ou superestimadas. Portanto, uma amostragem deficiente pode gerar falsas subdivisões (falsos positivos) e falsos agrupamentos (falsos negativos) (Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fiedler, 2007). Por outro lado, a ocorrência de estruturação populacional e um grande tamanho efetivo populacional (N_e) também podem resultar em altos valores de variação intraespecífica e, conseqüentemente, ausência do *barcoding gap* (Meyer & Paulay, 2005; Toffoli et al., 2008). Deste modo, apesar do enorme potencial para identificação de espécies pelo método DNA *barcoding*, diversos estudos têm discutido suas limitações, quando aplicado a grupos estreitamente relacionados, como espécies-irmãs ou espécies que divergiram recentemente, espécies crípticas que apresentam baixa divergência interespecífica com sobreposição das variações genéticas e em espécies com relatos de eventos de hibridação (Meyer & Paulay, 2005; Moritz & Cicero, 2004; Stoeckle, 2003; Wiemers & Fiedler, 2007).

Em suma, as abordagens baseadas em distância genética apenas distinguem espécies que apresentam valores de divergência intraespecífica menores do que divergência interespecífica (Wiemers & Fiedler, 2007) sem incorporar informações sobre a história evolutiva dos táxons (DeSalle et al., 2005), nem considerar processos de coalescência (Frézal & Leblois, 2008). Ferguson (2002) também discute diversos pontos das abordagens baseadas em distância que são alvo de críticas e que podem comprometer a identificação correta das espécies. Finalmente, apesar de todas as limitações apresentadas, Collins e Cruickshank (2012) propõem soluções para as principais críticas ao método DNA *barcoding* e Casiraghi e colaboradores (2010) fornecem para comunidade científica sugestões que auxiliam os pesquisadores a decidir quais abordagens adotar para cada conjunto de dados.

Normalmente, estudos de delimitação de espécies associados ao método DNA *barcoding* empregam pelo menos uma abordagem baseada em distância genética, como, por exemplo, o ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*), que estima o *threshold* a partir da identificação do *barcoding gap*, demarcando o limite entre as menores distâncias intraespecíficas e as maiores distâncias interespecíficas. Deste modo, são fornecidas diversas possibilidades de separação de MOTUs, sem que haja um *score* para auxiliar a decidir a melhor divisão para o conjunto de dados avaliado (Puillandre et al., 2012). Recentemente, Puillandre e colaboradores (2021) propuseram um método complementar para análises *single-locus*, denominado ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*). Esta abordagem, também baseada em distância, é vantajosa em relação às demais por classificar as propostas de subdivisão para o conjunto de dados através de uma pontuação (*asap-score*), que é resultado de duas métricas combinadas: a largura do *barcoding gap* e a probabilidade de que cada grupo seja uma única espécie.

Em razão das limitações das abordagens de distância já comentadas, vários métodos alternativos *single* ou *multilocus* têm sido propostos e aplicados para delimitação de espécies (Casiraghi, Labra, Ferri, Galimberti, & de Mattia, 2010; Frézal & Leblois, 2008; Mallo & Posada, 2016). Determinadas abordagens *single-locus* incorporam premissas filogenéticas e/ou da teoria coalescente e delimitam espécies baseando-se na modelagem dos padrões evolutivos de ramificação intra-interespecíficos e na detecção da transição entre eles, como, por exemplo, os modelos GMYC (*Generalized Mixed Yule-Coalescent* -Pons et al., 2006) e PTP (*Poisson Tree Process* - Zhang, et al., 2013).

O GMYC diferencia quais os pontos de ramificação que correspondem a eventos de divergência entre espécies (modelo de especiação Yule) e quais indicam eventos coalescentes entre populações amostradas dentro de uma espécie (modelo de coalescência) a partir de árvores filogenéticas ultramétricas. Este modelo, porém, tende a superestimar a diversidade de linhagens (Fujisawa & Barraclough, 2013; Reid & Carstens, 2012). Já o PTP utiliza o número de substituições nucleotídicas (mutações) de árvores filogenéticas não-ultramétricas para modelar especiações ou processos de ramificação dentro e entre espécies. Ele assume que o número de mutações é significativamente maior entre espécies do que dentro de espécies e pode adotar uma combinação que maximiza a probabilidade do padrão de substituição de recuperar a topologia (Máxima Verossimilhança - ML) (Kapli et al., 2017), ou que produza probabilidades posteriores das linhagens delimitadas (Inferência Bayesiana - IB) (Zhang et al., 2013). O método PTP é considerado mais confiável nas abordagens de delimitação de espécies *single-locus*, pois minimiza falsos positivos (Blair & Bryson, 2017).

As diferentes abordagens mencionadas têm sido amplamente utilizadas na identificação e delimitação das espécies de diversos grupos taxonômicos, incluindo invertebrados (Burns et al., 2008; Kim et al., 2020; Montagna et al., 2016; Ramirez et al., 2021); peixes (Arruda et al., 2019; Lopes et al., 2020; C. D. B. Machado et al., 2017; Machado et al., 2018; Ota et al., 2020; Ramirez et al., 2017; Rossini et al., 2016); aves (Hebert, Stoeckle, et al., 2004; Johnsen et al., 2010; Yoo et al., 2006); anfíbios (Grosjean et al., 2015; Lalronunga et al., 2020; Zimkus & Schick, 2010); répteis (Bhaskar & Mohindra, 2018; Bittencourt et al., 2019; Blair & Bryson, 2017; Hofmann et al., 2019; Roberto et al., 2020); golfinhos (Kundu et al., 2019); morcegos (Clare et al., 2007); carnívoros (Chaves et al., 2012) e roedores (Ermakov et al., 2015).

Em primatas, abordagens de distância genética (K2P) e de similaridade (*Neighbour-Joining* – NJ) foram testadas para diferentes marcadores mitocondriais e para diversas finalidades (Ascunce et al., 2003; Hajibabaei et al., 2006; Jackson & Nijman, 2020; Lorenz et al., 2005; Minhós et al., 2013; Ruiz-García et al., 2017). Por exemplo, Nijman e Aliabadian (2010) testaram a eficácia do gene COI e de outros genes mitocondriais (*Cyt b* e 16S) para chimpanzé (*Pan troglodytes*), bonobo (*Pan paniscus*), gorila (*Gorilla gorilla*), orangutango (*Pongo pygmaeus*), gibão (*Hylobates lar*) e lêmure (*Lemur catta*). Os autores concluíram que há diferenças significantes nas distâncias genéticas intraespecíficas entre os marcadores, mas que o COI apresenta uma maior variabilidade para alguns táxons, enquanto o *Cyt b* e o 16S são mais variáveis para outros.

Adicionalmente, os autores identificaram um *barcoding gap* evidente entre distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas de oito espécies do gênero *Alouatta*, que foram calculadas a partir de 126 sequências de *Cyt b*. Apesar desses estudos, as abordagens de delimitação de espécies *single-gene* utilizando a análise filogenética-coalescência associada ao método DNA *barcoding* ainda não foram exploradas para investigar diversidade genética oculta em primatas neotropicais.

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

2.1. Justificativas e Objetivo Geral

A sistemática de *Alouatta* é complexa devido principalmente à similaridade fenotípica entre os táxons, e, muitas vezes, à falta de dados morfológicos suficientes para esclarecer incertezas taxonômicas (Boubli et al., 2018; Buckner et al., 2015; Mercês et al., 2015; Morales-Jimenez et al., 2015; Silva et al., 2018). Neste contexto, as filogenias genético-moleculares existentes para o gênero têm contribuído para o debate sobre o número de espécies, auxiliando a esclarecer as relações evolutivas dentro do grupo. Porém, são poucas as análises filogenéticas que incluem modelos evolutivos, algoritmos estatísticos de máxima verossimilhança e análises bayesianas combinadas a uma ampla representatividade de táxons, que abranja a diversidade observada na área de distribuição geográfica das espécies propostas por Gregorin (2006). Desse modo, embora revisões sistemáticas tenham sido realizadas para as espécies de *Alouatta* com ocorrência no Brasil, até o momento, ainda não há um consenso sobre o número de táxons que de fato constitui o grupo.

Diante do debate sobre o número de espécies que compõe o gênero *Alouatta* e do potencial que o método DNA *barcoding* possui para contribuir com questões taxonômicas, as abordagens de delimitação de espécies *single-gene*, baseadas em distância e filogenética-coalescência, podem se configurar como ferramentas úteis para acessar a diversidade genética inter e intraespecífica e auxiliar na identificação de linhagens dos bugios brasileiros.

Considerando a problemática apresentada, estabelecemos como objetivo geral de trabalho delimitar Unidades Taxonômicas Moleculares (*Molecular Operational Taxonomic Units*, MOTUs) para as espécies do gênero *Alouatta* que ocorrem no Brasil, aplicando as diferentes abordagens de delimitação de espécies *single-gene* associadas ao método DNA *barcoding*.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos de trabalho foram:

1. Avaliar a concordância das MOTUs identificadas dentro do gênero *Alouatta* com as espécies reconhecidas por Gregorin (2006), Groves (2001), e Cortés-Ortiz et al. (2015);
2. Criar um banco de dados de referência com códigos de barras de DNA *barcode* para espécies de *Alouatta*, baseados na análise dos genes mitocondriais COI e *Cyt b*;
3. Oferecer dados que subsidiem as subseqüentes propostas de validações taxonômicas no gênero *Alouatta*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem biológica e extração de DNA

Nossa amostragem incluiu 141 amostras biológicas (tecido muscular, sangue, pelo ou fezes) obtidas de espécimes de *Alouatta* provenientes de diversas localidades do Brasil, conforme descrito a seguir: *A. belzebul* (n=50), *A. guariba* (n=47), *A. seniculus* (n=24), *A. caraya* (n=15) e *A. macconnelli* (n=1) (Figura 4). Para os complexos de espécies *A. belzebul*, *A. guariba* e *A. seniculus*, incluímos, respectivamente, as seguintes subespécies: *A. b. discolor* e *A. b. ululata*; *A. g. guariba* e *A. g. clamitans*; e *A. s. seniculus*, *A. s. puruensis* e *A. s. juara*. Optamos por adotar a proposta conservativa do número de táxons de *Alouatta*, seguindo Groves (2001), pois as identificações taxonômicas iniciais dos indivíduos da nossa amostragem foram realizadas por diversos colaboradores e não taxonomistas, e se deram com base, majoritariamente, no padrão de coloração da pelagem, nem sempre incluindo dados morfo-craniais ou do aparato hioide. Todas as

informações sobre localidades e demais dados das amostras coletadas estão disponíveis na Tabela 12, Material Suplementar S1.

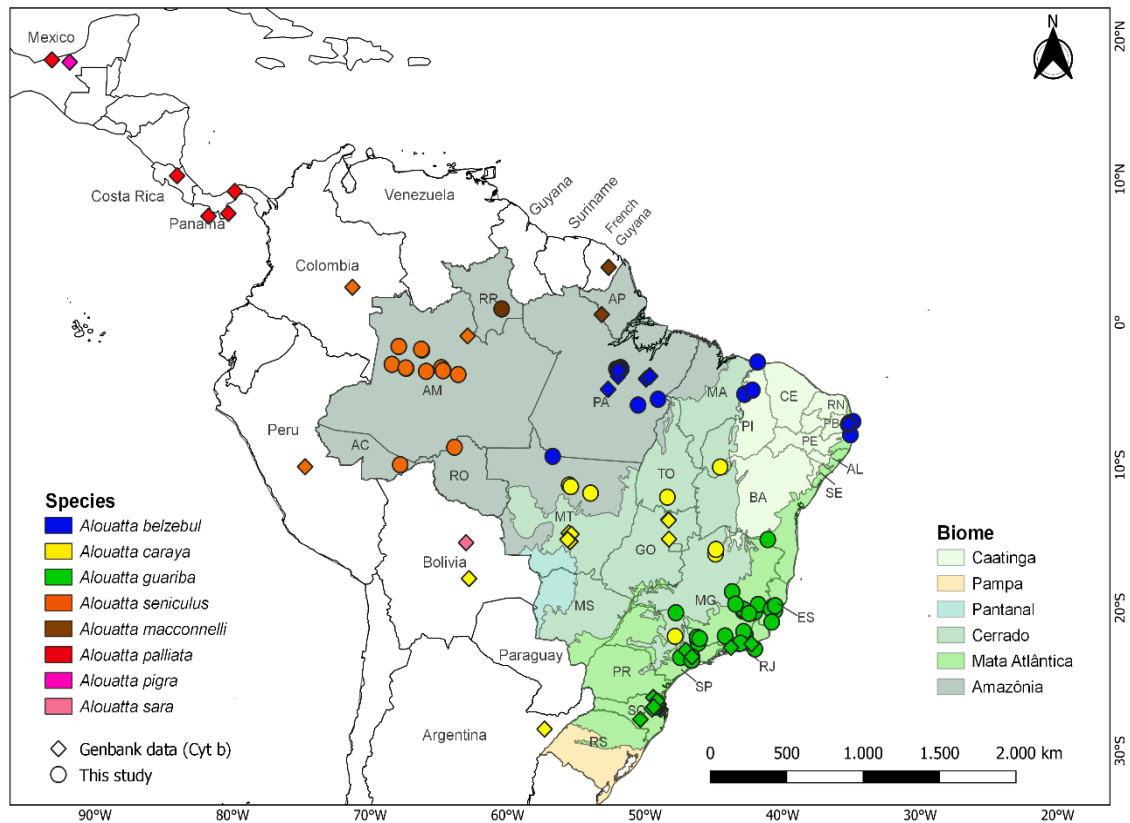


Figura 4. Mapa com os pontos de amostragem das diferentes espécies de *Alouatta*. Os círculos representam a localização das amostras coletadas para este trabalho. Os losangos representam a localização dos indivíduos cujas sequências foram obtidas no GenBank para o gene *Cyt b*.

Os procedimentos para coleta de material biológico seguiram os requerimentos legais e as normas e protocolos estabelecidos pelo Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal (CEUA, #6618060320) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar); Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN, #A411359); Sistema de Autorização e Informações sobre Biodiversidade (SISBIO, 49643-16, 71555-1, 29092-1, 29092-3, 42111-3, 7143-1/13507) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Ministério do Meio Ambiente (MMA) e pela Sociedade Americana de Primatologistas (ASP) para tratamento ético de primatas não-humanos.

O DNA das amostras biológicas foi extraído seguindo os protocolos usando Fenol-Clorofórmio (Sambrook et al., 1989) e/ou Tampão Salino (Aljanabi & Martinez, 1997), com adaptações. A integridade do DNA foi avaliada via eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação foi realizada em biofotômetro (Eppendorf).

Nossa amostragem foi ampliada a partir da obtenção de sequências de DNA disponíveis na base pública de dados nucleotídicos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), acessadas no período de julho de 2019 a dezembro de 2021, das seguintes espécies: *A. palliata*, *A. pigra*, *A. sara*, *A. nigerrima*, *A. macconnelli*, *A. seniculus*, *A. belzebul*, *A. caraya*, *A. guariba* (Material Suplementar S2). Adicionalmente, sequências de representantes de *Ateles fusciceps robustus* (KR902385.1), *Ateles belzebuth chamek* (KR902368.1) e *Brachyteles arachnoides* (AY065906.1) foram obtidas para serem usadas como grupo externo (Wildman et al., 2009; Kiesling et al., 2015).

3.2. Amplificação, purificação e sequenciamento de DNA

Fragmentos de aproximadamente 710 pb do gene COI foram amplificados utilizando os *primers* LCO1490 (*forward*) (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HC02198 (*reverse*) (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), que foram desenhados e testados por (Folmer et al., 1994). As Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram padronizadas nas seguintes condições: 1X de buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 0,26 µM de dNTPs; 2,0- 3,0 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,64 pmol de cada primer; 1 unidade de Platinum Taq polimerase (Invitrogen); 20-50 ng/µL DNA e H₂O Mili-Q; para um volume final de 10 µL. O ciclo de PCR consistiu em 5 minutos a 94° C para desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94° C, 45 s a 48° C, 45 s a 72° C, e extensão final de 10 min a 72° C. Para o *Cyt b* cerca de 1140 pb foram amplificados utilizando-se os *primers* F (*forward*) (5' GCACAACCTACAGCACCCTA 3') e R (*reverse*) (5' CAGCTTTGGGTGTTGAYGGTRGAA 3'), e testados para o gênero *Callicebus* (Primates: Pitheciidae) (Byrne et al., 2016). As PCRs foram padronizadas nas seguintes condições: 1X de buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 0,2 µM de dNTPs; 2,0-3,0 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 1,0 pmol de cada primer; 1 unidade de Platinum Taq polimerase (Invitrogen); 20-50 ng/µL DNA e H₂O Mili-Q; para

um volume final de reação de 10 µL. O ciclo de PCR consistiu em 5 minutos a 95° C para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 60° C, 90 s a 72° C; e 5 min de extensão final a 72° C.

Amplificações do marcador nuclear íntron *NPAS3.2* (*Neuronal PAS domain protein 3*) também foram realizadas para acessar uma história evolutiva molecular independente da mitocondrial e realizar análises de delimitação *multilocus* para o gênero *Alouatta*. As amplificações para o íntron *NPAS3.2* (674 pb) foram realizadas utilizando-se os *primers* *NPAS3.2-F* (*forward*) (5'- TCAGCATTGTTGATCTGCTTTT-3') e *NPAS3.2-R* (*reverse*) (5'- TGGAATATCTAACCATCTCTGAACA -3'), que foram desenhados e testados por Perelman e colaboradores (2011). As PCRs foram padronizadas nas seguintes condições: 1X de buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 0,25 µM de dNTPs; 1,5-1,8 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,4166 pmol de cada primer; 1 unidade de Platinum Taq polimerase (Invitrogen); 20-50 ng/µL DNA e H₂O Mili-Q; para volume final de 12 µL; para um ciclo de 95° C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 60° C, 1 min a 72° C; com extensão final por 10 min a 72° C.

Para todos os marcadores, examinou-se as amplificações dos produtos de PCR em gel de agarose a 2% corados com Gel RedTM em transiluminador de luz ultravioleta. Em seguida, os fragmentos que apresentaram os respectivos tamanhos esperados e bom padrão de amplificação foram purificados utilizando protocolo de polietilenoglicol 20% (Kusukawa et al., 1990) e, posteriormente, sequenciados em Plataforma ABI3730XL (Applied Biosystem). Como já mencionado, o nosso conjunto de dados foi complementado com sequências disponíveis na base de dados GenBank. Foram obtidas quatro sequências para o marcador *NPAS3.2*, 16 para o COI e 198 para o *Cyt b*. Todas as informações sobre as sequências obtidas do banco de dados e as geradas neste trabalho, que foram utilizadas nas análises para cada um dos marcadores, estão disponíveis nas Tabelas 12 e 13 do Material Suplementar (S1 e S2).

O conjunto total de sequências para cada *locus*, foi editado e alinhado utilizando o algoritmo MUSCLE disponível no software Geneious R7 7.0.1 (Kearse et al., 2012). Os alinhamentos foram avaliados para manter o máximo de sítios informativos e detectar a presença de inserções-deleções, picos duplos, e códons de parada que indicam a presença de pseudogenes. No programa MEGAX 10.2.5 (Kumar et al., 2018) foram obtidos o número de sítios conservados, variáveis e parcimoniosamente informativos para

cada um dos marcadores moleculares. Para as sequências do marcador *NPAS3.2*, a função "achar heterozigotos" com um limiar de 80% foi utilizada com o objetivo de encontrar os sítios ambíguos e assinalar códigos para as bases degeneradas no programa Geneious. Após essa etapa, os haplótipos de cada indivíduos foram recuperados por meio da ferramenta Unphase dentro do programa *DNA Sequence Polymorphism* (DNAsp v6.12.03, Librado & Rozas (2009)) utilizando 10.000 interações.

3.3. Análises de delimitação baseadas em distância genética

As distâncias genéticas intra e interespecíficas foram calculadas para cada alinhamento separadamente, seguindo a nomenclatura taxonômica proposta por Groves (2001) e para as MOTUs consenso aqui identificadas. Todos os cálculos foram realizados utilizando o modelo de evolução Kimura 2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), disponível no programa MEGAX 10.2.5 (Kumar et al., 2018). Collins e colaboradores (2012) compararam o modelo K2P com outros modelos evolutivos em diferentes grupos animais no cálculo das distâncias genéticas no nível de espécies. Os resultados indicaram que as diferenças das distâncias do modelo K2P para os demais foram mínimas e a taxa de sucesso na identificação das espécies não foi afetada. Para o conjunto de dados do íntron *NPAS3.2* geramos uma árvore com topologia de *Neighbour-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987), utilizando modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). O suporte dos cladogramas foi avaliado pelo valor de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas), conforme sugerido por Felsenstein (1985).

O *threshold* ótimo (OT) foi calculado utilizando a função "localMinima", implementada no pacote SPIDER (*Species Identity and Evolution* in R; (BROWN et al., 2012) para a plataforma R (<http://www.R-project.org>), o qual posteriormente foi aplicado para delimitar as MOTUs no software jMOTU (Jones et al., 2011), usando o *threshold* que apresentou correspondência com a classificação taxonômica aqui empregada e com o padrão de distribuição geográfica descrito para os táxons. A comparação entre a máxima distância genética intraespecífica e a mínima interespecífica foi realizada através da aplicação do OT para ambos os genes mitocondriais para cada espécie nominalmente reconhecida, com pelo menos dois indivíduos ($n > 1$) analisados em cada táxon.

Os alinhamentos do conjunto de dados do COI e do *Cyt b* foram submetidos separadamente à análise na plataforma ASAP (*Assemble Species by Automatic*

Partitioning) (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>) (Nicolas Puillandre et al., 2021). O ASAP propõe diversas possibilidades de subdivisões para o conjunto de dados que são classificadas em ordem decrescente a partir do *asap-score* que é a combinação do *p-value* com o *barcoding gap*. Quanto menor o *asap-score* mais confiável é o resultado gerado. O *p-value* é uma métrica probabilística calculada a partir das distâncias genéticas intra e interespecíficas em que os melhores resultados são aqueles próximos a 1. O *barcoding gap* é a largura entre as distâncias genéticas intra e interespecíficas e os melhores resultados são os que apresentam os maiores valores.

3.4. Análises de delimitação baseadas em filogenética e coalescência

Para as análises baseadas em filogenética e coalescência nós utilizamos os métodos GMYC (Pons et al., 2006; <https://species.h-its.org/gmyc/>), PTP (*Poison Tree Process*) e bPTP (implementação bayesiana do método *Poison Tree Process*) (Zhang et al., 2013; <https://species.h-its.org/ptp/>). O GMYC classifica os ramos de uma árvore ultramétrica (unidades de tempo absoluto/relativo) entre espécies, assumindo um modelo de especiação (Yule, 1925); e dentro de espécies, adotando o modelo coalescente neutro (Hudson, 1990) (Fujisawa & Barraclough, 2013; Pons et al., 2006). Já o PTP, classifica o ponto de transição das ramificações entre ou dentro de espécies a partir do número de substituições nucleotídicas acumuladas, adotando um parâmetro para especiação e um para os eventos de coalescência. A premissa implícita no PTP é que cada substituição possui uma pequena probabilidade de gerar um evento de ramificação, por isso os eventos de ramificação serão mais frequentes dentro de espécies do que entre espécies (KAPLI et al., 2017; ZHANG, J. et al., 2013).

Reconstruímos as árvores filogenéticas sob o melhor modelo evolutivo selecionado para o COI (GTR+I) utilizando o critério AIC (*Akaike Information Criterion*) e para o *Cyt b* (HKY+G) pelo critério BIC (*Bayesian Information Criterion*), fornecidos pelo jModelTest 2.1.1 (Posada, 2008). Para o PTP, as árvores filogenéticas não ultramétricas foram geradas no programa MrBayes 3.2.7a (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e no PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010; <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Já para o GMYC, a reconstrução das árvores filogenéticas ultramétricas foram realizadas no BEAST2 2.6.6 (Bouckaert et al., 2014) no servidor CIPRES 3.3 (<https://www.phylo.org> - MILLER et al., 2011). Nós adotamos o relógio molecular relaxado não correlacionado com distribuição logNormal e o modelo

de especiação *birth-death* que considera a ocorrência de eventos de especiação e extinção, pois nossas análises incluem várias espécies e há registros fósseis de espécies extintas para o gênero *Alouatta* (Rosenberger et al., 2015; Tejedor et al., 2008). Para o COI, três cadeias independentes de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) foram iniciadas a partir de árvores aleatórias, corridas com 50 milhões de gerações, com parâmetros e árvores sendo salvas a cada 5.000 gerações. Para o *Cyt b*, três cadeias independentes de MCMC foram iniciadas a partir de árvores aleatórias e corridas com 200 milhões de gerações, com parâmetros e árvores sendo salvas a cada 10.000 gerações. Os parâmetro de convergência e o valor de ESS (*Effective Sample Size*) > 200 foram conferidos no Tracer 1.7.2 (Drummond & Rambaut, 2007). Para o *burn-in* foram descartadas 10-25% das topologias e as corridas foram combinadas utilizando o software LogCombiner 2.6.6 (Drummond et al., 2012).

3.5. Delimitação de MOTUs consenso para o gênero *Alouatta*

Considerando que os métodos de delimitação de espécies (OT, ASAP, PTP, bPTP e GMYC) adotam premissas distintas, é esperado que abordagens diferentes apresentem discordâncias quanto ao número de MOTUs recuperadas para o nosso conjunto de dados. Portanto, para identificar as linhagens evolutivas nós determinamos MOTUs consenso foi determinada considerando o maior número de correspondências entre os métodos para ambos os genes mitocondriais de um dado táxon.

4. RESULTADOS

4.1. Dados das sequências dos genes COI, *Cyt b* e íntron *NPAS3.2*

No presente trabalho foram gerados novos dados de sequências mitocondriais para um total de 141 indivíduos de *Alouatta* identificados morfologicamente como *A. guariba* (n=25), *A. g. clamitans* (n=15), *A. belzebul* (n=43), *A. b. discolor* (n=1), *A. b. ululata* (n=6), *A. caraya* (n=13), *A. macconnelli* (n=1), *A. seniculus* (n=15), *A. s. juara* (n=8), *A. s. puruensis* (n=4) e *Alouatta* sp (n=10). Adicionalmente, analisamos sequências do gene *Cyt b* disponíveis no GenBank para táxons com ocorrência na Mesoamérica e/ou América

do Sul (incluindo representantes de *A. palliata*, *A. pigra*, *A. nigerrima* e *A. sara*) para todas as espécies/subespécies que ocorrem no Brasil.

Considerando o conjunto total de dados, para o gene do *Cyt b* foram analisadas 335 sequências editadas para 635 pb, sendo identificados 123 sítios parcimoniosamente informativos, para os respectivos táxons: *A. caraya* (n=62), complexo *A. belzebul* (n=147), complexo *A. guariba* (n=84), complexo *A. seniculus* (n=29), complexo *A. palliata* (n=6), *A. pigra* (n=2), *A. macconnelli* (n=3), *A. sara* (n=1) e *A. nigerrima* (n=1). As sequências nomeadas como *Alouatta* sp foram identificadas no presente estudo como sendo *A. guariba* (n=8) e *A. caraya* (n=2).

Para o gene mitocondrial COI foram analisadas 98 sequências editadas para 601 pb, sendo identificados 74 sítios parcimoniosamente informativos para os respectivos táxons: *A. caraya* (n=21), *A. macconnelli* (n=1), complexo *A. belzebul* (n=41), complexo *A. seniculus* (n=23) e complexo *A. guariba* (n=13). O número de sequências para este último táxon ficou reduzido para o gene COI, uma vez que 41 sequências não foram incluídas nas análises de delimitação de espécies por apresentarem sobreposição de picos (A-G e C-T) ao longo de diversos sítios em ambas as direções (F e R) (Figuras 16 e 17, Material Suplementar S3). Para as demais sequências, nenhum códon de parada, deleção ou inserção foi observado nos alinhamentos de ambos os genes mitocondriais.

Os dados relativos à análise do íntron *NPAS3.2* incluíram 18 sequências com 417 pb, sendo 14 delas geradas no presente trabalho para os seguintes táxons *A. belzebul* (n=2), *A. caraya* (n=3), *A. g. clamitans* (n=2), *A. s. juara* (n=4), *A. seniculus* (n=3); e quatro obtidas do GenBank para as espécies *A. belzebul* (HM759886), *A. caraya* (HM759888), *A. palliata* (HM759899) e *A. sara* (HM759900). Foram recuperados, portanto, um total de 40 haplótipos. A árvore de NJ construída a partir desse marcador não evidenciou clados distintos para as diferentes espécies, sendo, portanto, observado majoritariamente politomias (Figura 18, Material Suplementar S4). Esses resultados indicam que esse marcador não é capaz de diferenciar as espécies, exceto *A. caraya*. Dessa forma, nós seguimos com as demais análises sem utilizar o *NPAS3.2*.

4.2. Delimitação de espécies *single-locus* baseadas em distância genética

A transição entre distâncias intra e interespecíficas calculada pela função “*LocalMinima*” no SPIDER sugeriu três valores de *threshold* ótimo para o gene COI

(OT= 4,4%, 3% ou 1,34%) e quatro valores para o *Cyt b* (OT= 7,74%, 6,14%, 2,73% ou 1,1%). Com base nestes resultados, os valores de OT de 1,34% para COI e de 1,1% para *Cyt b* foram adotados, uma vez que apresentam sentido biológico, comparado aos demais valores que agruparam espécies reconhecidas como distintas pelos taxonomistas, e que possuem distribuição geográfica alopátrica (por exemplo, *A. macconnelli* e *A. nigerrima*). A função “*threshVal*” calculou os erros acumulativos de cada OT (a soma entre falsos positivos e falsos negativos) e nenhum falso negativo e positivo foi encontrado para o COI, embora 11 falsos negativos tenham sido apontados no OT adotado para o *Cyt b*. O valor OT determinado mais confiável é aquele minimiza falsos positivos e falsos negativos, pois isto indica agrupamento ou separação de espécies erroneamente. Em outras palavras, quanto menor for o erro cumulativo e os valores para falso positivos e negativos, mais acurado será o valor OT adotado.

Considerando as análises de delimitação de espécies *single-locus* dos genes mitocondriais COI e *Cyt b*, o número total de MOTUs recuperado pelas abordagens baseadas em distância genética variaram de sete a nove. A análise para o COI usando o OT=1,34% como ponto de corte no jMOTU recuperou sete MOTUs, enquanto o ASAP indicou nove MOTUs (Figura 5). Já para o *Cyt b*, o emprego do OT=1,1% no jMOTU gerou nove MOTUs, enquanto o ASAP resultou em oito MOTUs (Figura 6). As partições sugeridas pelos ASAP com o menor *asap-score* e com valores significativos probabilísticos ($p < 0.05$) em que as subdivisões correspondiam, pelo menos, com a classificação proposta por Groves (2001) foram escolhidas como as mais plausíveis.

4.3. Delimitação de espécies *single-locus* baseadas em filogenética e coalescência

As árvores filogenéticas bayesianas (ultramétricas e não-ultramétricas) e de máxima verossimilhança resultaram em topologias idênticas para as análises do gene *Cyt b* e para o COI. As delimitações de espécies baseadas em filogenética e coalescência (GMYC, PTP e bPTP) recuperaram de 10 a 12 MOTUs para o gene COI (Figura 5) e de 11 a 42 para o *Cyt b* (Figura 6).

Para o COI, a análise no GMYC encontrou 10 MOTUs com intervalo de confiança de 10-11, sendo que duas MOTUs foram geradas com uma única sequência (*singleton*) (Figura 5). Ao todo foram recuperadas três MOTUs para *A. belzebul*, três MOTUS para

A. guariba, duas MOTUs para *A. seniculus*, uma MOTU para *A. caraya*, e uma para *A. macconnelli*. O modelo nulo ($L_0= 845.8634$) foi significativamente menor ($p < 0.001$) do que o modelo GMYC ($L=887.7622$). As análises PTP apresentaram resultados concordantes para o número de MOTUs estabelecido para *A. seniculus* (duas MOTUs), *A. macconnelli* (uma MOTU) e *A. caraya* (uma MOTU). O número total de MOTUs divergiu para as espécies *A. belzebul*, sendo identificadas duas MOTUs para o PTP e três bPTP. Já para *A. guariba* foram encontradas quatro MOTUs (três *singletons*) com o método PTP, e cinco MOTUs (quatro *singletons*), com o bPTP (Figura 5).

Para o *Cyt b*, o GMYC resultou em um total de 42 MOTUs (cinco *singletons*), com intervalo de confiança de 42-48 (Figura 6). Nossos resultados mostraram 16 MOTUs para *A. belzebul* (Figura 7), 12 MOTUs para *A. guariba* (Figura 8), cinco MOTUs para *A. caraya*, uma MOTU para *A. macconnelli*, uma MOTU para *A. nigerrima*, quatro MOTUs para *A. seniculus*, duas MOTUs para *A. palliata* e uma MOTU para *A. pigra* (Figura 9). Os indivíduos identificados como *A. sara* (AY065887, Bolívia) e *A. seniculus* (KR902387, Peru) foram agrupados com *A. seniculus puruensis* em uma mesma MOTU (Figura 9). O modelo nulo ($L_0= 3452.913$) foi significativamente menor ($p < 0.001$) que o modelo GMYC ($L=3547.391$), sendo descartada a hipótese nula de que o conjunto de dados é formado por apenas uma unidade molecular. As análises PTP e bPTP recuperaram o mesmo número de MOTUs para *A. belzebul* (2) (Figura 7), *A. guariba* (3) (Figura 8), *A. seniculus* (2), *A. macconnelli* (1) e *A. pigra* (1) (Figura 9). Para *A. palliata* foram identificadas uma MOTU para PTP e duas MOTUs para bPTP. *Alouatta caraya* apresentou uma e duas MOTUs para PTP e bPTP, respectivamente. Além disso, encontramos que apenas as abordagens bPTP e GMYC separaram a espécie nominal *A. nigerrima* do clado de *A. macconnelli* (Figura 9).

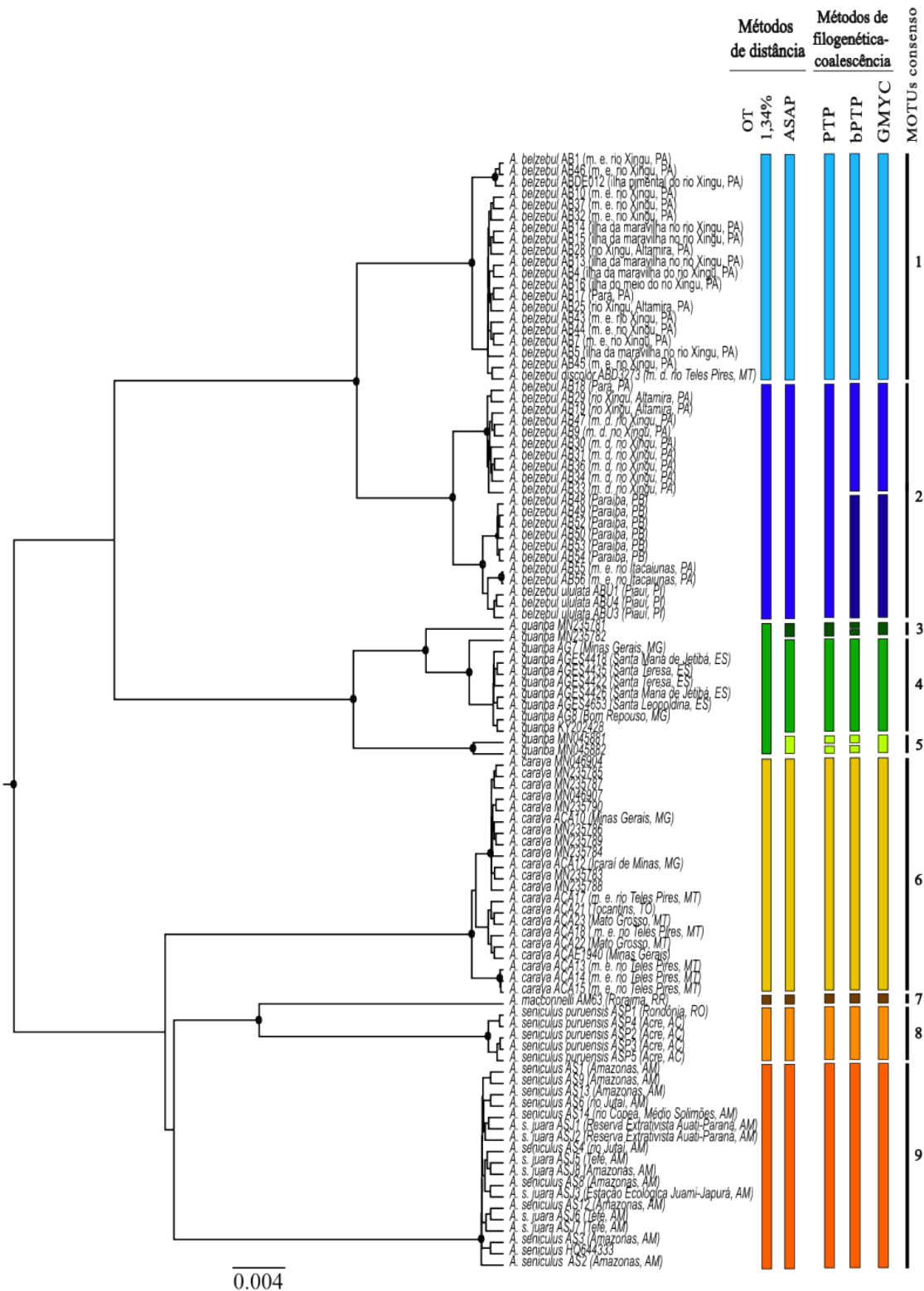


Figura 5. Árvore bayesiana ultramétrica para o gene COI apresentando as relações evolutivas dos táxons do gênero *Aouatta*. As barras na lateral representam as MOTUs identificadas por cada abordagem de delimitação *single-gene*. A cor azul representa o complexo de espécies *A. belzebul*, verde o complexo *A. guariba*, amarelo *A. caraya*, marrom *A. macconnelli* e em laranja o complexo *A. seniculus*. As barras pretas representam as MOTUs consenso recuperadas: (1) MOTU-belzebul 1, (2) MOTU-belzebul 2, (3) MOTU-guariba 1, (4) MOTU-guariba 2, (5) MOTU-guariba 3, (6) MOTU-caraya, (7) MOTU-macconnelli, (8) MOTU-seniculus 1, (9) MOTU-seniculus 2. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior (PP>0.9).

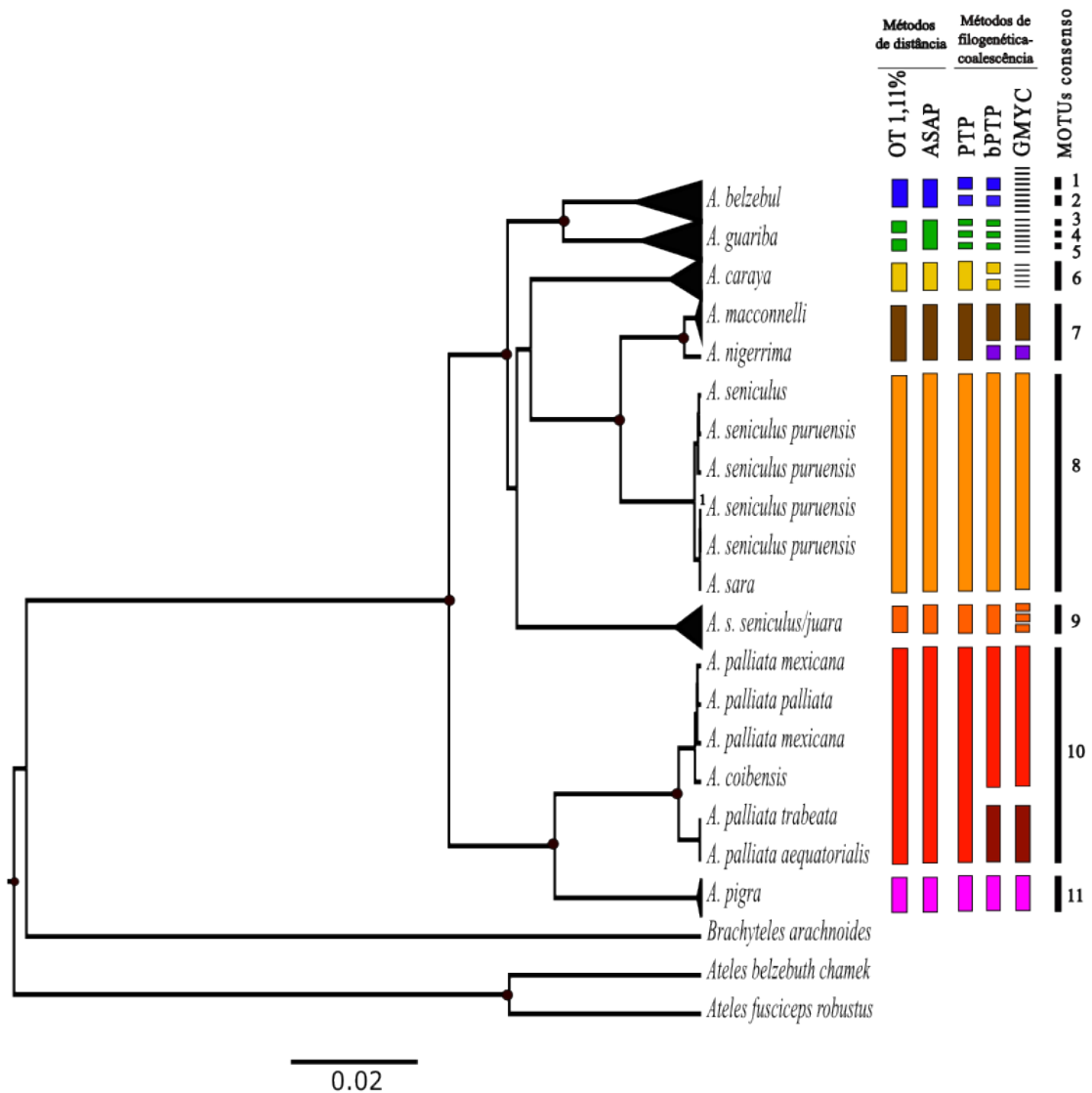


Figura 6. Árvore bayesiana ultramétrica para o gene *Cyt b* apresentando as relações evolutivas dos táxons do gênero *Alouatta*. As barras na lateral representam as MOTUs identificadas por cada abordagem de delimitação *single-gene*. A cor azul representa o complexo de espécies *A. belzebul*, verde o complexo *A. guariba*, amarelo *A. caraya*, marrom *A. macconnelli*, em roxo *A. nigerrima*, em laranja o complexo *A. seniculus*, em vermelho o complexo *A. palliata* e em rosa *A. pigra*. As barras pretas representam as MOTUs consenso recuperadas: (1) MOTU-belzebul 2, (2) MOTU-belzebul 1, (3) MOTU-guariba 1, (4) MOTU-guariba 2, (5) MOTU-guariba 3, (6) MOTU-caraya, (7) MOTU-macconnelli, (8) MOTU-seniculus 1, (9) MOTU-seniculus 2, (10) MOTU-palliata e (11) MOTU-pigra. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior (PP>0.9).

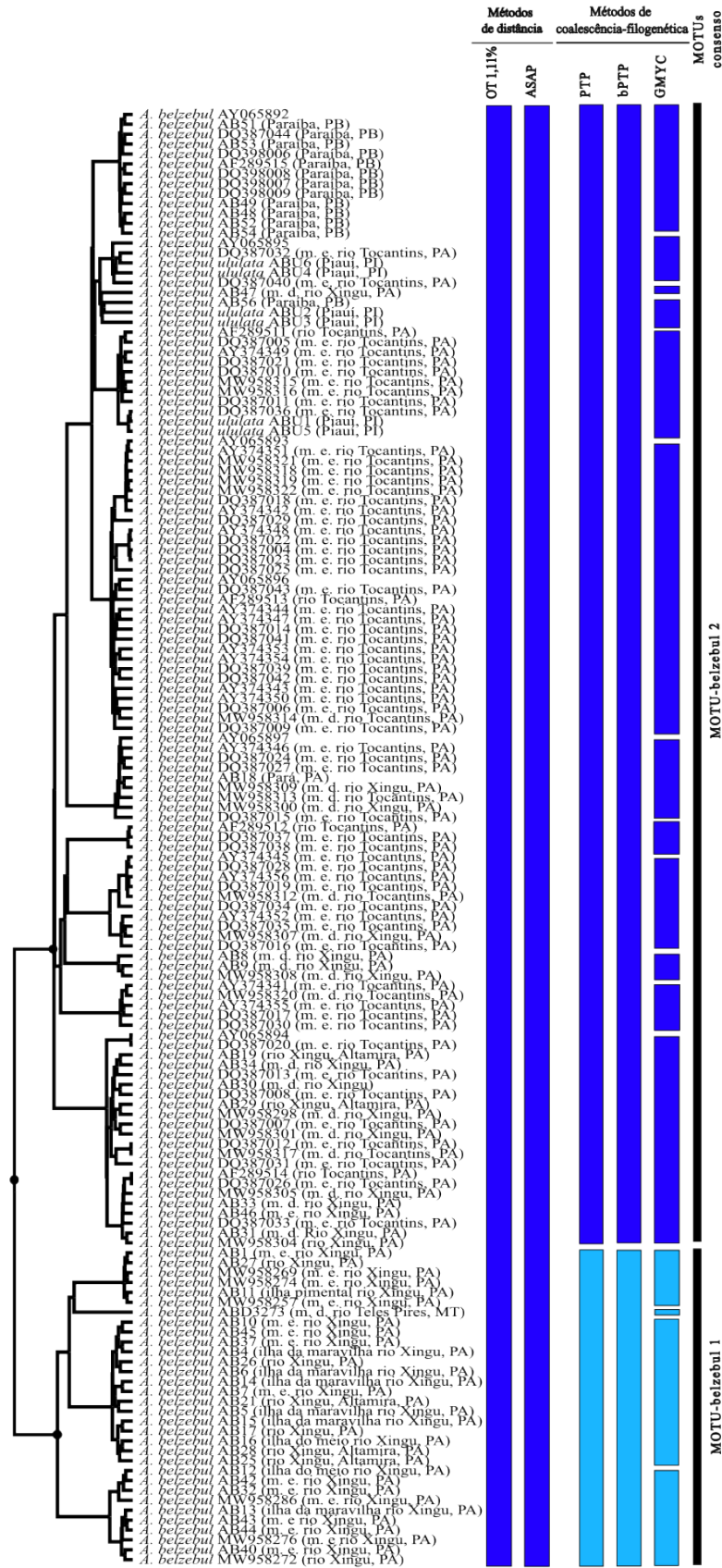


Figura 7. Árvore bayesiana ultramétrica para o gene *Cyt b* representando apenas o complexo *A. belzebul* e as MOTUs recuperadas para cada abordagem de delimitação de espécies. As barras pretas representam as MOTUs consenso. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior (PP > 0.9).

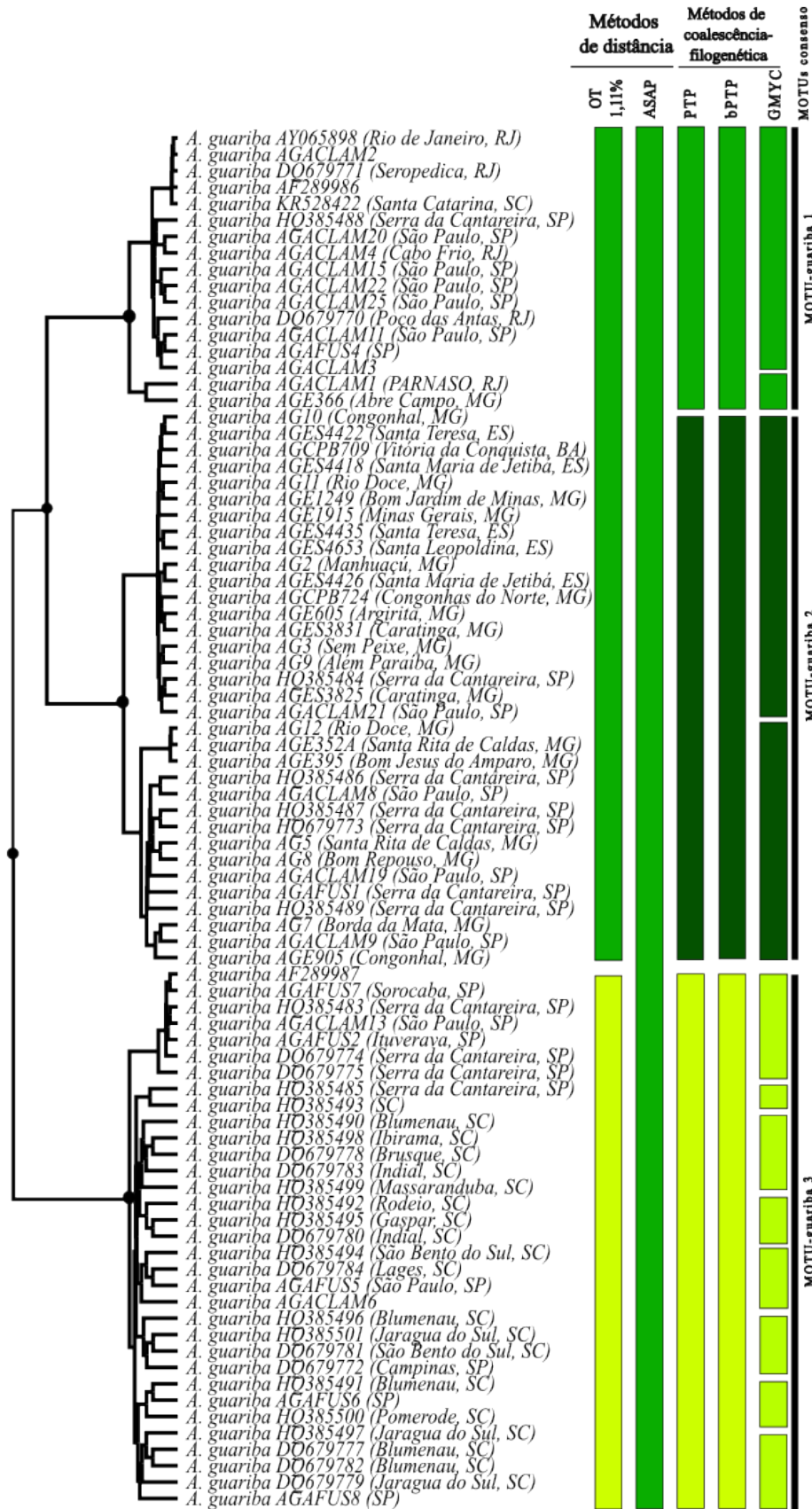


Figura 8. Árvore bayesiana ultramétrica para o gene *Cyt b* representando apenas o complexo de espécie *A. guariba* e as MOTUs recuperadas para cada abordagem de delimitação de espécies. As barras pretas representam as MOTUs consenso. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior (PP>0.9).

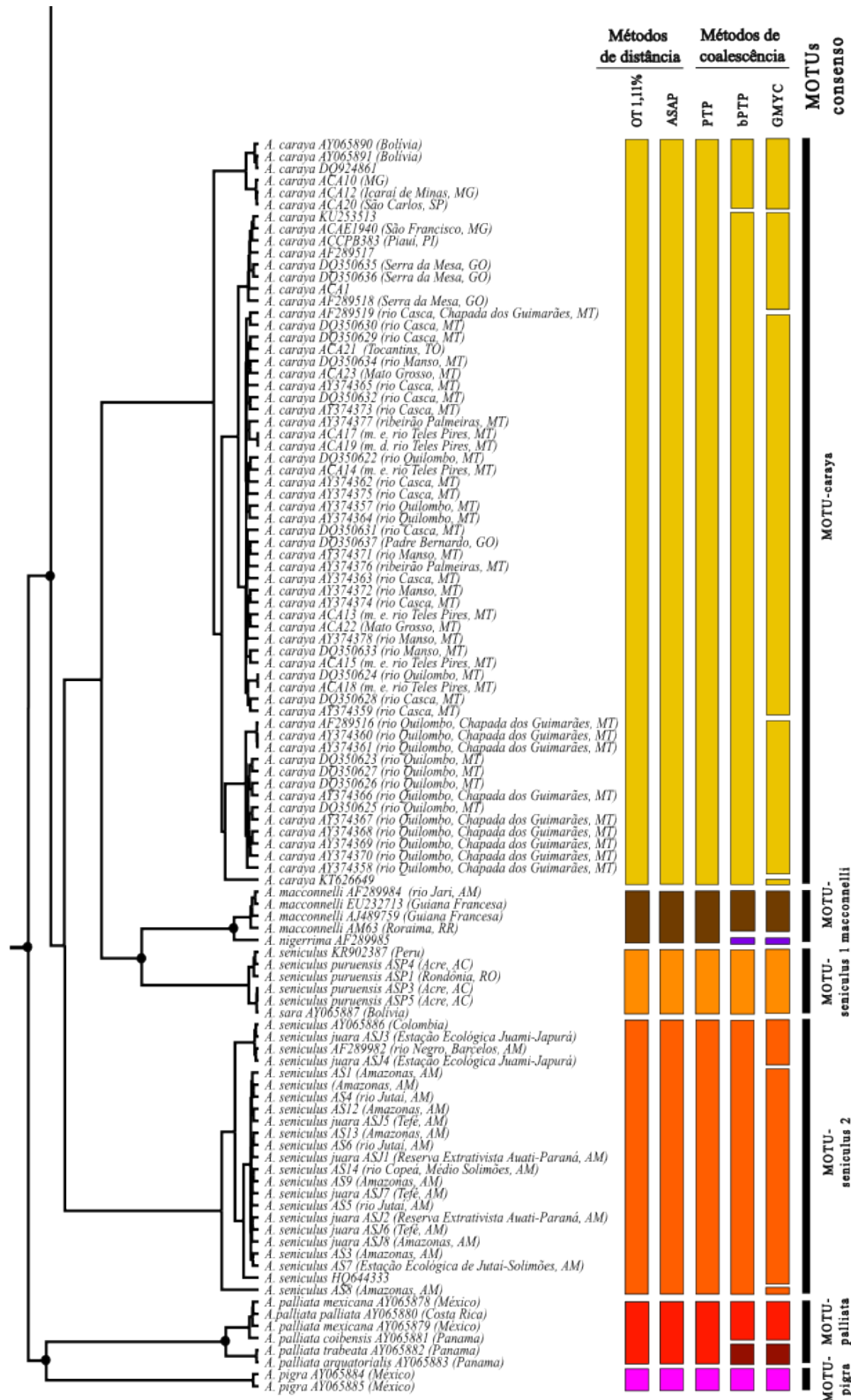


Figura 9. Árvore bayesiana ultramétrica para o gene *Cyt b* representando as relações entre *A. caraya*, *A. macconnelli*, *A. nigerrima*, *A. seniculus*, *A. palliata* e *A. pigra* indicando as MOTUs recuperadas para cada abordagem de delimitação de espécies. As barras pretas representam as MOTUs consenso. Os círculos nos nós representam a probabilidade posterior (PP>0.9).

4.4. Determinação do número de MOTUs consenso

As análises de delimitação de espécies para o COI e *Cyt b* apresentam discordâncias entre as cinco abordagens utilizadas (OT, ASAP, PTP, bPTP e GMYC) (Figura 5 e 6), porém, a correspondência entre os métodos para ambos os genes sugere 11 MOTUs consenso dentro de *Alouatta*. Foram sugeridas duas MOTUs consenso para o complexo *A. belzebul* (MOTU-belzebul 1 e MOTU-belzebul 2) (Figura 7); três MOTUs consenso para o complexo *A. guariba* (MOTU-guariba 1, MOTU-guariba 2, MOTU-guariba 3) (Figura 8); e duas MOTUs consenso para *A. seniculus* (MOTU-seniculus 1 e MOTU-seniculus 2). Para as espécies nomeadas como *A. caraya*, *A. macconnelli*, *A. palliata*, *A. pigra*, foi encontrada apenas uma MOTU consenso para cada táxon, sendo estas: MOTU-caraya, MOTU-macconnelli, MOTU-palliata, MOTU-pigra, respectivamente (Figura 9). Para *A. nigerrima*, o resultado consenso agrupou esta espécie na MOTU-macconnelli. Entretanto, as abordagens de coalescência-filogenética (bPTP, GMYC) distinguiram *A. nigerrima* de *A. macconnelli*, com alto valor de suporte (PP>0.9 - Figura X). Por isso, nós consideramos a MOTU-nigerrima, visto que a taxonomia clássica reconhece *A. nigerrima* como espécie válida distinta de *A. macconnelli*, devido a existência de caracteres diagnósticos, e que *A. nigerrima* está representada neste estudo por apenas um indivíduo analisado com um único marcador (*Cyt b*).

Em suma, este estudo identificou 12 MOTUs para o gênero *Alouatta* apresentando padrões de distribuição geográfica (Figuras 5 e 6), sendo duas delas estabelecidas para os bugios mesoamericanos (MOTU-pigra e MOTU-palliata) e dez para os táxons que ocorrem no Brasil, conforme descrito na tabela 14 (Material Suplementar S5): MOTU-caraya (*A. caraya* proveniente da Bolívia e estados brasileiros MG, SP, MT, GO, TO, PI); MOTU-macconnelli (*A. macconnelli* da Guiana Francesa e Amazônia brasileira nos estados do AM e RR); MOTU-nigerrima (*A. nigerrima* de origem desconhecida); MOTU-belzebul 1 (margem esquerda do rio Xingu; subespécie *discolor*); MOTU-belzebul 2 (margem direita do Rio Xingu, rio Tocantins, Mata Atlântica do nordeste, incluindo a subespécie *ululata*), MOTU-seniculus 1 (*A. sara*, *A. seniculus* e subespécie *puruensis*), MOTU-seniculus 2 (*A. seniculus* e subespécie *juara*) e MOTU-guariba 1 (RJ/MG/SP – subespécie *clamitans*), MOTU-guariba 2 (MG/ES/SP – subespécies *guariba*), MOTU-guariba 3 (SC/SP – subespécie *clamitans*). Espécimes de São Paulo (SP) apresentaram distribuição parafilética em todos os clados de indivíduos de *A. guariba* (Figura 8).

4.5. Cálculo das distâncias genéticas seguindo Groves (2001)

As distâncias genéticas K2P intra e interespecíficas do COI e *Cyt b* foram calculadas seguindo a classificação de Groves (2001). O COI evidenciou distâncias intraespecíficas máximas maiores do que o OT de 1,34% para as espécies *A. belzebul* (2,56%), *A. guariba* (2,73%) e *A. seniculus* (4,70%) (Tabela 3). Apenas *A. seniculus* apresentou distância média intraespecífica maior que o OT (1,59% > 1,34%) (Tabela 4). Os valores médios e máximos intraespecíficos maiores que o valor OT (1,34%) evidenciam que esses grupos podem constituir espécies crípticas ou complexos de espécies. As mínimas distâncias interespecíficas variaram de 3,62% para *A. seniculus* a 3,8% para *A. caraya* (Tabela 3).

Tabela 3. Distâncias genéticas (K2P) calculadas a partir do COI representando as mínimas e máximas intraespecíficas (mesma espécie) e interespecíficas (entre espécies) (%) das espécies do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) com pelo menos duas sequências disponíveis por espécie ($n \geq 2$). Os valores em negrito indicam os valores intraespecíficos máximos maiores que 1,34% (OT) sugerindo diversidade críptica para essas espécies.

| Espécies | COI | | |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|
| | Máx. Intra. | Mín. Inter. | Máx. Inter. |
| <i>A. belzebul</i> | 2,56% | 3,78% | 6,71% |
| <i>A. guariba</i> | 2,73% | 3,78% | 7,11% |
| <i>A. caraya</i> | 0,67% | 3,80% | 6,14% |
| <i>A. seniculus</i> | 4,70% | 3,62% | 7,11% |

Tabela 4. Média das distâncias genéticas (K2P) intraespecíficas (% \pm desvio padrão) dos genes mitocondriais *Cyt b* e COI para as espécies do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) com pelo menos duas sequências disponíveis por espécie ($n \geq 2$). Os valores em negrito indicam os valores médios intraespecíficos maiores que 1,11% e 1,34% (OT) sugerindo diversidade críptica para essas espécies.

| Espécies | <i>Cyt b</i> (OT=1,1%) | | | COI (OT=1,34%) | | |
|-----------------------|------------------------|-------------------|---------|----------------|-------------------|--------|
| | | | | | | |
| <i>A. belzebul</i> | 0,91% | \pm 0,2% | (n=147) | 1,27% | \pm 0,3% | (n=39) |
| <i>A. caraya</i> | 0,31% | \pm 0,1% | (n=62) | 0,19% | \pm 0,1% | (n=21) |
| <i>A. guariba</i> | 1,18% | \pm 0,3% | (n=84) | 0,93% | \pm 0,2% | (n=10) |
| <i>A. seniculus</i> | 1,33% | \pm 0,3% | (n=30) | 1,59% | \pm 0,3% | (n=23) |
| <i>A. palliata</i> | 0,50% | \pm 0,2% | (n=6) | | | |
| <i>A. pigra</i> | 0,16% | \pm 0,2% | (n=2) | | | |
| <i>A. macconnelli</i> | 0,16% | \pm 0,1% | (n=4) | | | |

A menor distância média interespecífica obtida foi entre *A. seniculus* e *A. caraya* (4,20%) e a maior distância média obtida foi entre *A. seniculus* e *A. belzebul* (5,81%) com valores maiores que o OT= 1,34% (Tabela 5).

Tabela 5. Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) entre espécies do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) calculadas para o gene COI. Os números na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão.

| Espécies | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 <i>A. belzebul</i> | - | 0,95% | 0,78% | 0,87% | 0,90% |
| 2 <i>A. caraya</i> | 5,71% | - | 0,91% | 0,87% | 0,77% |
| 3 <i>A. guariba</i> | 4,74% | 5,14% | - | 0,92% | 0,93% |
| 4 <i>A. macconnelli</i> | 4,91% | 4,50% | 5,04% | - | 0,75% |
| 5 <i>A. seniculus</i> | 5,81% | 4,20% | 5,79% | 4,25% | - |

Para o gene *Cyt b*, quatro espécies de *Alouatta* apresentaram valores médios e/ou máximos intraespecíficos maiores que o valor *threshold* ótimo (OT=1,1%), sendo *A. seniculus* com distância máxima intraespecífica de 4,07% e média de 1,33%; *A. guariba* com distância máxima intraespecífica de 2,58% e média de 1,18%, *A. belzebul* máxima de 2,75%; e *A. caraya* com distância máxima de 1,28% (Tabelas 4 e 6). O valores médios e máximos intraespecíficos maiores que o valor OT (1,11%) evidenciam que esses grupos podem constituir espécies crípticas ou complexos de espécies. O menor valor de distância mínima entre espécies (interespecífica) foi de 2,25% para *A. macconnelli*; e o maior valor de máxima interespecífica foi de 8,35% para *A. guariba* e *A. palliata*, ambos com valores maiores que OT=1,1% (Tabela 6). A menor distância média entre espécies foi entre *A. nigerrima* e *A. macconnelli*, com valor menor do que o OT (0,71% < 1,1%); e a maior média entre espécies foi entre *A. guariba* e *A. palliata* (7,59%) (Tabela 7).

Tabela 6. Distâncias genéticas (K2P) calculadas a partir do *Cyt b* representando as mínimas e máximas intraespecíficas e interespecíficas (%) do gênero *Alouatta* (Groves, 2001) com pelo menos duas sequências disponíveis por espécie (n ≥ 2). Os valores em negrito indicam os valores intraespecíficos máximos maiores que 1,11% (OT) sugerindo diversidade críptica para essas espécies.

| Espécies | <i>Cyt b</i> | | |
|-----------------------|--------------|-------------|-------------|
| | Máx. Intra. | Mín. Inter. | Máx. Inter. |
| <i>A. belzebul</i> | 2,75% | 2,92% | 7,45% |
| <i>A. caraya</i> | 1,28% | 3,24% | 7,24% |
| <i>A. guariba</i> | 2,58% | 2,92% | 8,35% |
| <i>A. macconnelli</i> | 0,32% | 2,25% | 7,45% |
| <i>A. seniculus</i> | 4,07% | 2,25% | 7,24% |
| <i>A. palliata</i> | 0,95% | 4,44% | 8,35% |
| <i>A. pigra</i> | 0,16% | 4,44% | 8,34% |

Tabela 7. Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) entre as espécies do gênero *Alouatta* calculadas para o gene *Cyt b* seguindo Groves (2001). Os números em azul na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão. O valor em negrito indica distância genética interespecífica abaixo de 1,11% (OT).

| Espécies | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-------------------------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 <i>A. belzebul</i> | - | 0,85% | 0,73% | 0,83% | 0,89% | 0,79% | 0,79% | 1,02% | 1,02% |
| 2 <i>A. caraya</i> | 4,60% | - | 0,86% | 0,86% | 0,91% | 0,79% | 0,80% | 1,05% | 1,08% |
| 3 <i>A. guariba</i> | 4,30% | 5,16% | - | 0,86% | 0,89% | 0,82% | 0,90% | 1,10% | 1,10% |
| 4 <i>A. macconnelli</i> | 4,41% | 4,49% | 4,99% | - | 0,33% | 0,70% | 0,62% | 1,11% | 1,10% |
| 5 <i>A. nigerrima</i> | 4,71% | 4,71% | 4,90% | 0,71% | - | 0,79% | 0,67% | 1,15% | 1,15% |
| 6 <i>A. seniculus</i> | 4,81% | 4,37% | 5,32% | 3,85% | 4,32% | - | 0,64% | 0,99% | 1,04% |
| 7 <i>A. sara</i> | 4,20% | 3,89% | 5,33% | 2,50% | 2,74% | 3,16% | - | 1,08% | 1,07% |
| 8 <i>A. palliata</i> | 6,67% | 6,69% | 7,59% | 7,02% | 7,30% | 6,65% | 6,73% | - | 0,88% |
| 9 <i>A. pigra</i> | 6,20% | 6,73% | 7,55% | 7,07% | 7,34% | 6,86% | 6,78% | 4,72% | - |

A comparação entre máximas intraespecíficas e mínimas interespecíficas dos genes mitocondriais está caracterizada no gráfico dos quadrantes. A partir do uso de um *threshold* estimado é possível observar a presença de quatro quadrantes (ver Figuras 10 e 11) que evidenciou as espécies nominais dentro de *Alouatta* situadas nos quadrantes I e II no gráfico que representa diferentes categorias de espécies (Figuras 10 e 11). O quadrante I categoriza aquelas espécies em que há concordância dos dados moleculares com atual taxonomia, os grupos no quadrante II indicam prováveis complexos de espécies ou espécies crípticas, já o quadrante III sugere divergência recente, hibridação e sinonímias e, finalmente o quadrante IV pode ser interpretado como identificação errônea de espécime, em outras palavras, a identificação molecular não corresponde com a taxonomia (Hebert, Stoeckle, et al., 2004a). Para o COI, o quadrante I inclui *A. caraya* apresentando distância intraespecífica menor e interespecífica maior que 1,34%. No quadrante II, estão *A. belzebul*, *A. guariba* e *A. seniculus* com distâncias intraespecíficas maiores que 1,34%.

Para o *Cyt b*, no quadrante I estão *A. pigra*, *A. palliata* e *A. macconnelli* com distância intraespecífica menor e interespecífica maior que 1,1%. No quadrante II, *A. caraya*, *A. belzebul*, *A. guariba* e *A. seniculus* com distância intra e interespecífica maiores que 1,1%. Nenhum grupo foi posicionado nos quadrantes III e IV para ambos os marcadores moleculares. Para ambos os genes mitocondriais as espécies *A. belzebul*, *A. guariba* e *A. seniculus* estão representadas no quadrante II, o que sinaliza a presença de espécies crípticas. Os cálculos de distância genética para o COI e *Cyt b* seguindo Groves

(2001) sugerem que *A. seniculus*, *A. guariba* e *A. belzebul* constituem complexos de espécies (Figura 10 e 11) e esses resultados concordam com as MOTUs consenso que apontam pelo menos duas MOTUs dentro de cada complexo (Tabela 14, Material Suplementar S5).

Os valores de distâncias médias e máximas intraespecíficas maiores que os valores OT (1,11% e 1,34%) para as espécies *A. belzebul*, *A. guariba* e *A. seniculus* somado a representação das espécies situadas no II quadrante para ambos os genes mitocondriais sugerem que esses grupos potencialmente constituem espécies crípticas ou complexos de espécies.

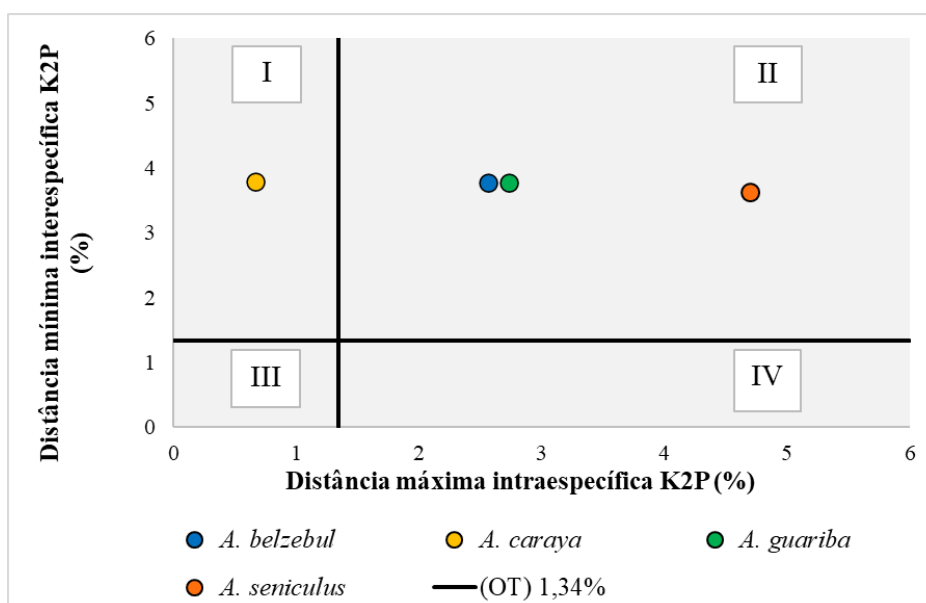


Figura 10. Gráfico dos quadrantes baseado no gene COI comparando as máximas distâncias intraespecíficas e mínimas interespecíficas de quatro espécies de *Alouatta* válidas de acordo com Groves (2001). O ótimo *threshold* adotado foi de 1,34% de. Os pontos distribuídos no gráfico representam as espécies. No quadrante I estão as espécies *A. caraya* (amarelo). No quadrante II estão situadas as demais espécies, *A. belzebul* (azul), *A. guariba* (verde) e *A. seniculus* (laranja). Os quatro quadrantes indicados representam: (I) a identificação molecular é concordante com a taxonomia; (II) há possíveis complexos de espécies ou espécies crípticas; (III) casos de sinónimas, hibridação ou espécies que divergiram recentemente e (IV) identificação molecular não corresponde com a taxonomia

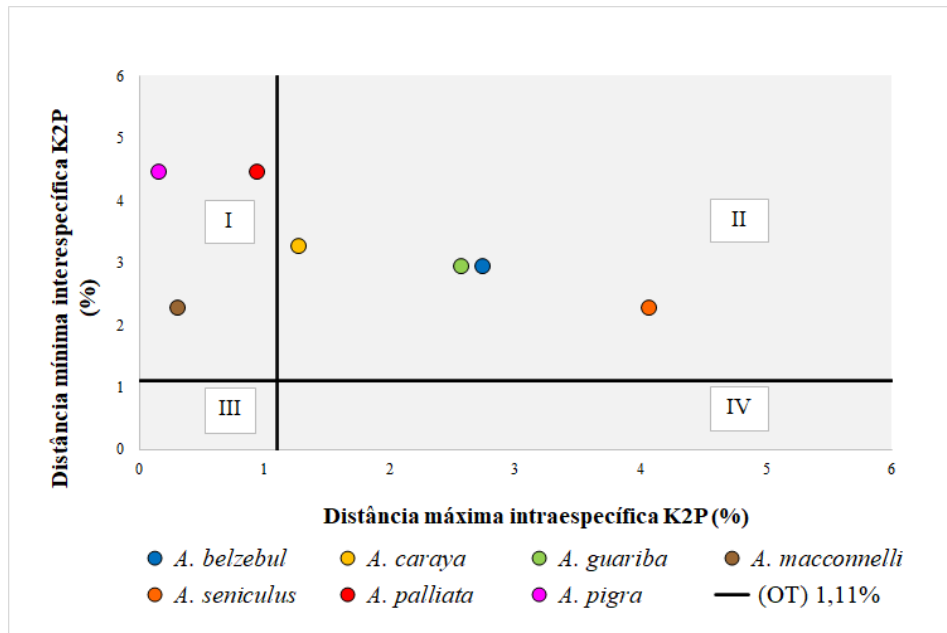


Figura 11. Gráfico dos quadrantes baseado no gene *Cyt b* comparando as máximas distância intraespecíficas e mínimas interespecíficas de quatro espécies de *Alouatta* válidas de acordo com Groves (2001). O ótimo *threshold* adotado foi de 1,1%. Os pontos distribuídos no gráfico representam as espécies. No quadrante I estão as espécies *A. macconnelli* (marrom), *A. pigra* (rosa) e *A. palliata* (vermelho). No quadrante II estão situadas as demais espécies *A. caraya* (amarelo), *A. belzebul* (azul), *A. guariba* (verde) e *A. seniculus* (laranja). Os quatro quadrantes indicados representam: (I) a identificação molecular é concordante com a taxonomia; (II) há possíveis complexos de espécies ou espécies crípticas; (III) casos de sinónimias, hibridação ou espécies que divergiram recentemente e (IV) identificação molecular não corresponde com a taxonomia.

4.6. Cálculo das distâncias genéticas seguindo as MOTUs consenso

As distâncias genéticas K2P médias intraespecíficas e interespecíficas do COI e *Cyt b* foram calculadas seguindo as MOTUs consenso. As distâncias médias intraespecíficas para todas as MOTUs consenso foram menores do que o OT de 1,34% e 1,11% sugerido para o COI e *Cyt b*, respectivamente (Tabela 8).

As distâncias médias interespecíficas comparando as diferentes MOTUs consenso foram maiores que o OT sugerido (1,34% e 1,11%), exceto entre as MOTU-guariba 2 e MOTU-guariba 1 (0,9% < 1,34%) para o COI (Tabela 9 e 10).

Tabela 8. Média das distâncias genéticas (K2P) intraespecíficas (% \pm desvio padrão) dos genes mitocondriais *Cyt b* e COI para as MOTUs consenso recuperadas para o gênero *Alouatta* com pelo menos duas seqüências disponíveis por espécie (n \geq 2).

| MOTUs consenso | <i>Cyt b</i> | | | COI | | |
|----------------|--------------|-------------|---------|-------|--------------|--------|
| belzebul 1 | 0,54% | $\pm 0,2\%$ | (n=32) | 0,12% | $\pm 0,07\%$ | (n=20) |
| belzebul 2 | 0,50% | $\pm 0,1\%$ | (n=115) | 0,41% | $\pm 0,17\%$ | (n=21) |
| caraya | 0,31% | $\pm 0,1\%$ | (n=62) | 0,19% | $\pm 0,1\%$ | (n=21) |
| guariba 1 | 0,19% | $\pm 0,1\%$ | (n=17) | 0,84% | $\pm 0,39\%$ | (n=2) |
| guariba 2 | 0,31% | $\pm 0,1\%$ | (n=34) | 0,04% | $\pm 0,04\%$ | (n=8) |
| guariba 3 | 0,28% | $\pm 0,1\%$ | (n=33) | 0,67% | $\pm 0,33\%$ | (n=2) |
| macconnelli | 0,38% | $\pm 0,2\%$ | (n=5) | - | - | (n=1) |
| seniculus 1 | 0,09% | $\pm 0,1\%$ | (n=5) | 0,17% | $\pm 0,04\%$ | (n=5) |
| seniculus 2 | 0,29% | $\pm 0,2\%$ | (n=23) | 0,07% | $\pm 0,12\%$ | (n=18) |
| palliata | 0,50% | $\pm 0,2\%$ | (n=6) | | | |
| pigra | 0,16% | $\pm 0,2\%$ | (n=2) | | | |

Tabela 9. Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) interespecíficas calculadas para o gene COI seguindo as MOTUs consenso identificadas para o gênero *Alouatta*. Os números em azul na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão (%).

| MOTUs | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 belzebul 2 | - | 0,6% | 1,0% | 0,9% | 0,9% | 1,0% | 0,9% | 1,0% | 1,0% |
| 2 belzebul 1 | 2,2% | - | 1,0% | 0,9% | 0,8% | 0,9% | 0,9% | 1,0% | 1,0% |
| 3 caraya | 5,8% | 5,7% | - | 0,9% | 1,0% | 0,9% | 0,9% | 0,9% | 1,0% |
| 4 guariba 1 | 5,1% | 4,5% | 4,7% | - | 0,3% | 0,5% | 0,9% | 0,9% | 1,0% |
| 5 guariba 2 | 5,1% | 4,1% | 5,4% | 0,9% | - | 0,6% | 0,9% | 1,0% | 1,0% |
| 6 guariba 3 | 5,8% | 4,7% | 4,5% | 1,7% | 2,4% | - | 1,0% | 1,0% | 1,1% |
| 7 macconnelli | 4,9% | 5,0% | 4,5% | 5,1% | 4,9% | 5,6% | - | 0,9% | 0,8% |
| 8 seniculus 2 | 5,4% | 5,9% | 3,9% | 5,5% | 5,7% | 6,2% | 4,4% | - | 0,9% |
| 9 seniculus 1 | 6,3% | 6,2% | 5,2% | 6,2% | 5,7% | 6,9% | 3,8% | 4,3% | - |

Tabela 10. Média em porcentagem das distâncias genéticas (K2P) interespecíficas calculadas para o gene *Cyt b* seguindo MOTUs consenso identificadas para o gênero *Alouatta*. Os números em azul na diagonal superior representam a estimativa do desvio padrão (%).

| MOTUs | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 belzebul 2 | - | 0,4% | 0,9% | 0,8% | 0,8% | 0,8% | 0,8% | 0,9% | 0,8% | 1,1% | 1,0% |
| 2 belzebul 1 | 1,7% | - | 0,8% | 0,8% | 0,8% | 0,7% | 0,8% | 0,8% | 0,8% | 1,1% | 1,0% |
| 3 caraya | 4,7% | 4,2% | - | 0,9% | 0,9% | 0,9% | 0,9% | 0,9% | 0,8% | 1,1% | 1,1% |
| 4 guariba 1 | 4,4% | 4,2% | 5,2% | - | 0,5% | 0,5% | 0,9% | 1,0% | 0,9% | 1,2% | 1,1% |
| 5 guariba 2 | 4,8% | 4,6% | 5,5% | 1,6% | - | 0,5% | 0,9% | 1,0% | 0,9% | 1,2% | 1,2% |
| 6 guariba 3 | 3,9% | 3,7% | 4,8% | 1,5% | 1,8% | - | 0,9% | 0,9% | 0,9% | 1,1% | 1,1% |
| 7 macconnelli | 4,5% | 4,4% | 4,5% | 5,0% | 5,4% | 4,6% | - | 0,8% | 0,6% | 1,1% | 1,1% |
| 8 seniculus 2 | 5,1% | 4,5% | 4,5% | 5,8% | 5,5% | 5,0% | 4,3% | - | 0,8% | 1,0% | 1,1% |
| 9 seniculus 1 | 4,1% | 4,1% | 3,8% | 5,4% | 5,5% | 4,9% | 2,5% | 3,7% | - | 1,0% | 1,0% |
| 10 palliata | 6,7% | 6,5% | 6,7% | 7,8% | 7,9% | 7,3% | 7,1% | 6,6% | 6,6% | - | 0,9% |
| 11 pigra | 6,4% | 5,6% | 6,7% | 7,2% | 8,0% | 7,2% | 7,1% | 6,9% | 6,7% | 4,7% | - |

5. DISCUSSÃO

Apesar dos resultados relativos ao número de MOTUs identificadas terem variado entre os métodos de delimitação aqui empregados (Figura 6, 10 e Tabela 14, Material Suplementar S5), a congruência entre as abordagens baseadas em distância e em filogenética-coalescência, respaldada no reconhecimento das espécies válidas pela taxonomia clássica, para o conjunto de dados gerados no presente estudo, sugere, a presença de 12 MOTUs dentro do gênero *Alouatta* (Figura 5 e 6). Este número não corresponde ao número de espécies de *Alouatta* sugerido por Groves (2001), que relata seis espécies na América do Sul e Mesoamérica; mas se assemelha à revisão realizada por Gregorin (2006), que sugere 10 espécies ocorrendo no Brasil e por Cortés-Ortiz e colaboradores (2015), que aponta 12 espécies mesoamericanas e sul-americanas, considerando *A. nigerrima* como distinta de *A. macconnelli*. No nosso estudo nós identificamos duas MOTUs para as espécies da Mesoamérica e dez MOTUs para as que ocorrem no Brasil, sendo que o conjunto de dados utilizado nas análises do *Cyt b* incluiu todos os táxons descritos por Gregorin (2006), provenientes de diversas localidades do Brasil, correspondendo à maior amostragem utilizada até o momento para investigar diversidade de táxons no gênero *Alouatta*.

5.1. Bugios da Mesoamérica

Groves (2001) e Rylands e colaboradores (2006) reconheceram três espécies de bugios que ocorrem na Mesoamérica: *A. pigra*, *A. palliata* e *A. coibensis*. Os autores basearam suas decisões nos estudos de Frohlich e Frohlich (1987), que descreveram os bugios da ilha de Coiba e da Península Azuero do Panamá como *A. coibensis*, e incluíram a forma *trabeata* como subespécie (*A. coibensis trabeata*), distinguindo-a de *A. pigra* e *A. palliata*. Groves (2001) descreveu os padrões diagnósticos de coloração da pelagem dessas três espécies, ressaltando que *A. pigra* apresenta as regiões das bochechas, ombro e parte anterior do dorso na cor marrom; *A. palliata* apresenta pelagem preta com pelos longos castanhos ou dourados nos flancos (região entre as costelas e quadril); e *A. coibensis* apresenta pelagem escura variando do marrom ao avermelhado, com os pelos do dorso longos com pontas claras e dimorfismo sexual evidente, no qual os machos são maiores que as fêmeas.

No entanto, Cortés-Ortiz e colaboradores (2015) sugeriram a existência de apenas duas espécies mesoamericanas, sendo elas *A. pigra* e *A. palliata*, e reconheceram a existência de cinco subespécies de *A. palliata* (*A. p. mexicana*, *A. p. palliata*, *A. p. coibensis*, *A. p. trabeata* e *A. p. aequatorialis*). Suas decisões foram baseadas em análises filogenéticas com marcadores mitocondriais (*Cyt b*, ATP6 e ATP8) que incluíram representantes de *A. pigra*, *A. palliata* e suas subespécies, as quais encontraram que *A. coibensis* constitui o mesmo clado de *A. palliata* (Cortés-Ortiz et al., 2003). Posteriormente, Ruiz-García e colaboradores (2017) empregaram abordagens filogenéticas de máxima verossimilhança e bayesiana analisando um conjunto de seis genes mitocondriais (COI, COII, *Cyt b*, ND4, ND5, ND6) em 124 indivíduos dos seguintes táxons: *A. p. palliata*, *A. p. mexicana*, *A. p. aequatorialis*, *A. pigra*, *A. c. coibensis* e *A. c. trabeata*. Os autores também não encontraram evidências para elevar *A. coibensis* ao nível de espécie, mas assumiram *A. pigra* e *A. palliata* como espécies válidas; consideraram apenas *A. p. palliata* e *A. p. mexicana* como subespécies. Adicionalmente, a descrição do cariótipo ressalta a diferença entre *A. pigra* ($2n=58$ e $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ - México) e representantes de *A. palliata* provenientes de diversos países da América Central e do Sul (Guatemala, Panamá, Colômbia e México) que apresentaram número diploide ($2n$) variando entre 54-56 (♀) e 53-56 (♂) e sistemas sexuais diversos (XX/XY – bugios da Colômbia e Guatemala; $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ – bugios do Panamá e México) (Armada et al., 1987; Mudry et al., 2015; Steinberg et al., 2008).

Nossas análises de delimitação de espécies para o gene *Cyt b* de fato evidenciaram apenas duas MOTUs consenso para as espécies mesoamericanas, as quais foram aqui denominadas MOTU-pigra (*A. pigra*) e MOTU-palliata (*A. p. palliata*, *A. p. mexicana*, *A. p. trabeata*, *A. p. aequatorialis* e *A. p. coibensis*) (Figura 6 e 10). Entretanto, duas (bPTP e GMYC) das cinco análises realizadas, subdividiram a MOTU-palliata em dois clados, separando *A. p. trabeata* e *A. p. aequatorialis* dos demais indivíduos de *A. palliata*. É preciso ressaltar, no entanto, que estes táxons foram sub-amostrados em nosso conjunto de dados, fato este que pode resultar em falsos agrupamentos ou subdivisões nas análises do DNA *barcoding* (Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fiedler, 2007). Portanto, neste estudo nós reconhecemos como espécies apenas a *A. pigra* (MOTU-pigra) e *A. palliata* (MOTU-palliata), concordando com a proposta taxonômica de Cortés-Ortiz e colaboradores (2015).

5.2. Bugios da América do Sul, com ênfase nos táxons que ocorrem no Brasil

5.2.1. Espécie *A. caraya*, os bugios do Cerrado

Alouatta caraya é a espécie que apresenta a maior área de distribuição geográfica dentre as espécies do gênero, ocorrendo no Brasil e em outros países da América do Sul (ao norte da Argentina, Paraguai e Bolívia) (Figura 12). Groves (2001), Gregorin (2006) e Cortés-Ortiz et al. (2015) reconhecem *A. caraya* como uma espécie válida, sem subespécies, que apresenta um dicromatismo sexual, no qual os machos, em sua maioria, possuem pelagem preta e as fêmeas exibem uma coloração castanho-amarelada ou rajada (Groves, 2001; Gregorin, 2006). Diferenças no padrão de coloração da pelagem e na morfologia do aparato ósseo hioide de machos (ausência de tentório), distinguem o bugio do Cerrado de outras espécies de bugios (ver Hershkovitz 1949; Gregorin 2006). Análises de haplótipos mitocondriais (D-loop e *Cyt b*) evidenciaram um padrão filogeográfico indicando estruturação em populações alopátricas de *A. caraya*, separando os bugios que ocorrem no Brasil dos da Argentina e dos da Bolívia (Ascunce et al., 2007; Nascimento et al., 2005), fato que pode sugerir a possível existência de subespécies neste táxon. Há descrições do cariótipo apenas para as espécimes da Argentina de *A. caraya* que apresentam o mesmo número diploide ($2n=52$) e sistema cromossômico sexual XX/XY, ou sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y_1Y_2$ (Mudry et al., 2015).

Os nossos resultados evidenciaram, porém, apenas uma MOTU consenso para *A. caraya* (MOTU-caraya) (Figura 5 e 6), concordando com as propostas de Groves (2001), Gregorin (2006) e Cortés-Ortiz et al. (2015). Destacamos que, todas as análises do COI recuperaram uma única MOTU (Figura 6), mas as análises bPTP e GMYC do gene *Cyt b* superestimaram a diversidade neste táxon, porém, elas não indicam um padrão geográfico separando espécimes de *A. caraya* que ocorrem no Brasil dos que ocorrem em outros países da América do Sul (ver Figura 9). Nossa amostragem abrangeu principalmente a área de distribuição geográfica dos espécimes analisados por Gregorin (2006), que se concentra no bioma Cerrado (Figura 12), mas incluiu também representantes de diversas localidades do Brasil (Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Piauí) e de outros países da América do Sul (Bolívia e Argentina). Portanto, nossos achados indicam que a MOTU-caraya potencialmente corresponde à espécie válida *A. caraya*.

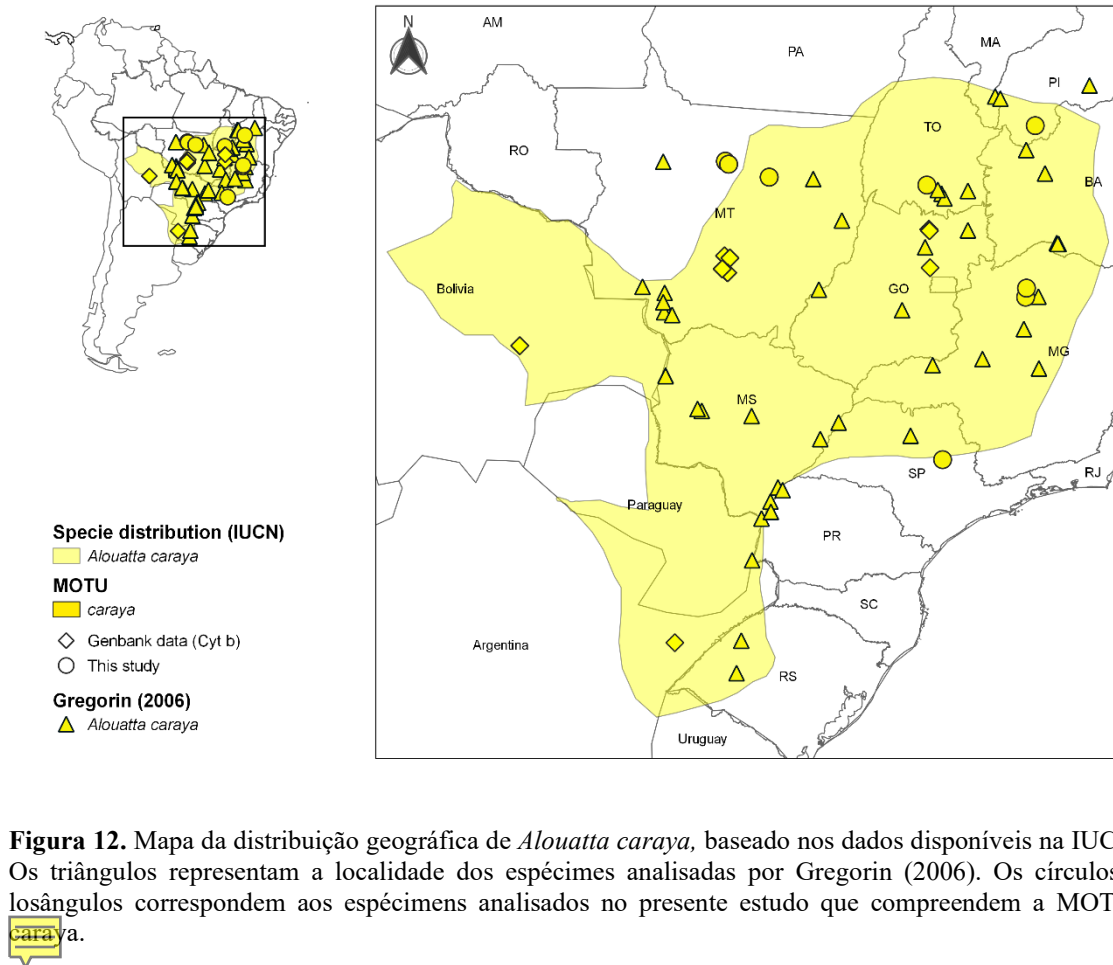


Figura 12. Mapa da distribuição geográfica de *Alouatta caraya*, baseado nos dados disponíveis na IUCN. Os triângulos representam a localidade dos espécimes analisadas por Gregorin (2006). Os círculos e losângulos correspondem aos espécimes analisados no presente estudo que compreendem a MOTU-
 caraya.

5.2.2. Complexo de espécies *A. seniculus*, os bugios da Amazônia Ocidental

O complexo de espécies *A. seniculus*, inicialmente incluía nove subespécies, sendo elas: *A. s. seniculus*, *A. s. arctoidea*, *A. s. stramineus*, *A. s. insulanus*, *A. s. amazonica*, *A. s. macconnelli*, *A. s. juara*, *A. s. puruensis* e *A. s. sara* (Hill, 1962). Groves (2001) reconheceu três destes táxons como espécies válidas (*A. seniculus*, *A. macconnelli* e *A. sara*) com base no padrão de coloração da pelagem e dados cariotípicos, mantendo *A. s. arctoidea*, *A. s. juara* e *A. s. puruensis* como táxons infraespecíficos de *A. seniculus*. Groves (2001) descreve *A. s. seniculus* como um bugio com corpo vermelho-dourado, cabeça (incluindo barba), ombros, membros e parte proximal da cauda marrons e flancos inferiores com uma linha marrom. Já *A. sara* foi descrita como sendo um bugio de cor vermelho-tijolo, exibindo membros, cabeça e parte proximal da cauda ligeiramente mais escuras e ruivas. Além disso, dados citogenéticos apontam diferenças no número diploide e sistema cromossômico sexual entre espécimes da Colômbia de *A. seniculus* ($2n=43-45$, XX/XY) e espécimes da Bolívia de *A. sara* ($2n=46-51$, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ou $X_1X_2Y_1Y_2$)

(Mudry et al., 2015). Posteriormente, Gregorin (2006) elevou *A. s. juara* e *A. s. puruensis* ao nível de espécie, baseando-se em medidas craniais, na morfologia do osso hioide e no padrão de coloração da pelagem. Para *A. s. juara*, o autor descreveu um padrão de coloração marrom-avermelhado escuro, com região do manto e terço final da cauda com coloração dourada. Já para *A. s. puruensis* foi usado o caráter diagnóstico de dicromatismo sexual, com machos ruivos escuros com dorso vermelho-mogno e fêmeas laranja-douradas com porções distais dos membros, cauda e barba ruivo escuro. Apesar de Gregorin (2006) ter reconhecido estas espécies como válidas, o autor comenta que a revisão taxonômica comparativa entre espécimes de *A. s. juara* e *A. s. seniculus* foi limitada em seu estudo, pois analisou parcialmente espécimes que ocorrem em outros países da América do Sul, que não o Brasil. Além disso, dados cariotípicos estão disponíveis para um único espécime de Tefé, Amazonas (AM) em que a localidade coincide com a área de distribuição geográfica de *A. s. juara* e não houve diferenças relevantes quando comparado com os sistemas cromossômicos de *A. s. seniculus* (Bonvicino et al., 1995; Lima & Seuánez, 1991; Yunis et al., 1976). Adicionalmente, não há dados citogenéticos descrevendo o cariótipo de *A. s. puruensis* para fins de comparação com outros táxons. Finalmente, Cortés-Ortiz e colaboradores (2015) reconhecem *A. sara* e *A. s. seniculus* como espécies válidas incluindo como subespécies *A. s. juara* e *A. s. puruensis* devido à ausência de informações genético-moleculares suficientes para sustentar a decisão de Gregorin (2006).

O táxon descrito como *A. s. seniculus* ocorre na Colômbia, na Amazônia brasileira (norte do rio Solimões e sul do rio Negro), noroeste da Venezuela, leste do Equador e leste do Peru, ocorrendo em simpatria com *A. s. juara* que ocorre apenas na porção ocidental da Amazônia brasileira (rio Juruá), nos estados do Acre (AC) e Amazonas (AM) (sul do rio Solimões e oeste do rio Purus) e se estende até o Peru, com os limites de alcance geográfico ainda não descritos (Figura 13) (Cortés-Ortiz et al., 2015). Em relação à *A. s. puruensis*, sua distribuição se dá ao longo de ambas as margens do rio Purus, até o baixo rio Madeira e médio rio Aripuanã, estendendo-se para leste até o rio Teles Pires e a localidade mais ao sul descrita para a espécie é Plácido de Castro no Acre (AC), Brasil (Figura 13) (Cortés-Ortiz et al., 2015). Já *A. sara* ocorre do sul da Cordilheira dos Andes, ao leste da Bolívia (Cortés-Ortiz et al., 2015) (Figura 13).

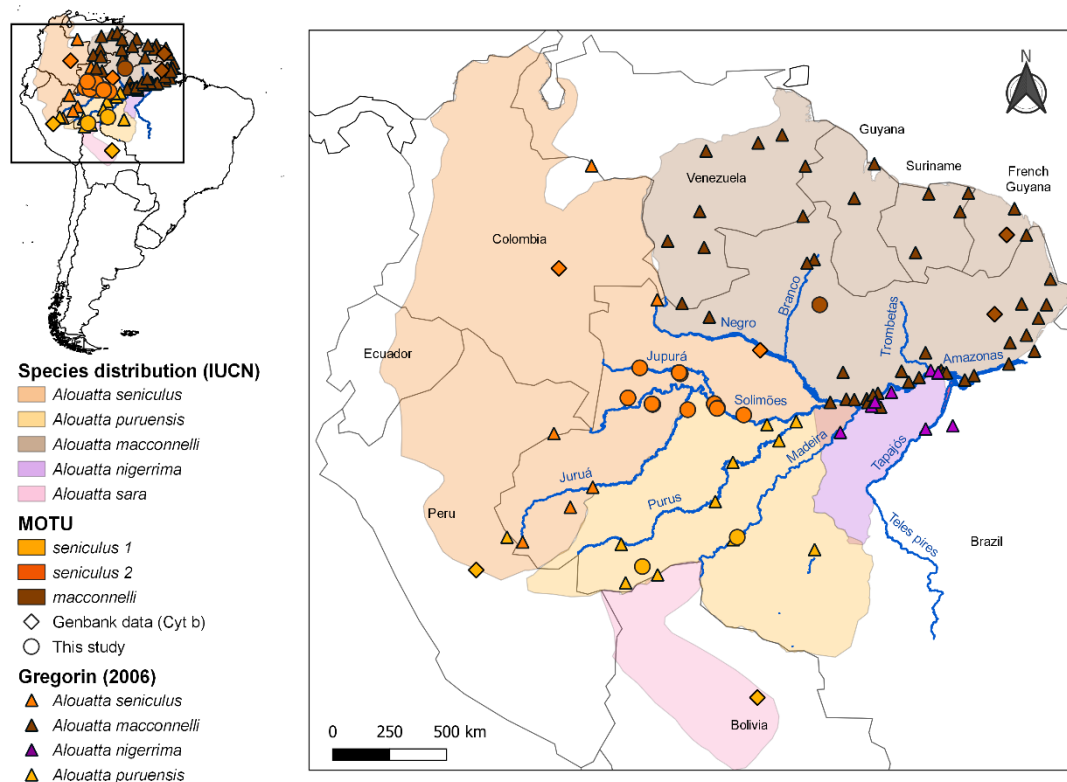


Figura 13. Mapa da distribuição geográfica estimada pela IUCN para *A. macconnelli* (marrom), *A. seniculus* sobrepondo a *A. juara* (laranja escuro), *A. puruensis* (laranja claro) e *A. sara* (rosa). Os triângulos representam a localidade das espécimes analisadas por Gregorin (2006). O losango representa os dados obtidos do GenBank. Os círculos representam os novos dados gerados para MOTU-macconnelli (marrom), MOTU-seniculus 1 (laranja claro), MOTU-seniculus 2 (laranja escuro).

Como já mencionado, Groves (2001) validou *A. sara* como espécie, e análises filogenéticas posteriores, baseadas em dados de mtDNA, mostraram que de fato *A. sara* e *A. seniculus* são espécies distintas que divergiram há aproximadamente 2,4 MA (Cortés-Ortiz et al., 2003). Adicionalmente, Ruiz-García e colaboradores (2016), empregando análises filogenéticas bayesianas e de máxima verossimilhança de genes mitocondriais (COI, COII e *Cyt b*) para os bugios que ocorrem no Peru, também indicaram *A. sara* como espécie distinta de *A. seniculus*. Ademais, os autores também incluíram possíveis representantes de *A. s. puruensis* e *A. s. juara*, identificados com base na localidade de coleta, e não encontram evidências para elevar esses táxons em nível de espécie, pois estes foram recuperados no clado *A. seniculus*. Portanto, o reconhecimento de *A. sara* como uma espécie distinta de *A. seniculus* foi fortemente suportado por dados morfológicos, citogenéticos, moleculares, mas ainda não havia evidências genéticas-moleculares para suportar *A. s. puruensis* e *A. s. juara* como espécies válidas.

Nossas análises de delimitação de espécies recuperaram duas MOTUs consenso para o complexo *A. seniculus*: a MOTU-seniculus 1, que incluiu todos os indivíduos identificados como *A. s. puruensis* e um representante obtido no banco de dados de *A. sara* (Bolívia) e de *A. seniculus* (Peru) (ver Figura 5, 6 e 9) e a MOTU-seniculus 2, que agrupou espécimes identificados como *A. seniculus* e *A. s. juara*, provenientes, majoritariamente, da porção ocidental da Amazônia brasileira, ao norte do rio Solimões (Figura 13). É preciso, porém, ressaltar que *A. s. juara* apresentou um arranjo parafilético nos clados recuperados para ambos os genes COI e *Cyt b* (Figura 6 e 9). Além disso, as análises do gene *Cyt b* incluíram apenas um indivíduo da localidade-tipo de *A. seniculus* (Colômbia) no clado MOTU-seniculus 2 (Figura 9). Diante do exposto, primeiramente, nós sugerimos que a MOTU-seniculus 2 pode corresponder a espécie nominal *A. seniculus*, incluindo *A. s. juara*, concordando com as propostas de Groves (2001) e Cortés-Ortiz et al. (2015).

Nossos resultados também evidenciaram a MOTU-seniculus 2, como uma linhagem evolutiva distinta da MOTU-seniculus 1 (*A. sara*, *A. seniculus* e *A. s. puruensis* e *A. sara*) (Figura 9). Visto que *A. sara* ocorre no Peru e já foi considerado táxon infraespecífico de *A. seniculus* (Groves, 2001; Ruiz-Garcia et al., 2016), é possível que o representante de *A. seniculus* incluído nessa MOTU seja na realidade *A. sara*. Além disso, nossas análises filogenéticas bayesianas não recuperaram altos valores de suporte (PP>0,9) dentro no clado recuperado como MOTU-seniculus 1 que poderia sugerir linhagens evolutivas distintas entre *A. sara* e os demais indivíduos analisados (Figura 9). Entretanto, o táxon *A. sara* está subamostrado em nosso conjunto de dados (n=1), por isso, nós optamos por sermos mais conservativos e não sugerir que *A. sara* de fato constitui a mesma unidade taxonômica de *A. s. puruensis*. No entanto, nós destacamos aqui a importância em incluir mais representantes desses táxons em estudos moleculares subsequentes para obter resoluções mais confiáveis em relação ao status desse táxon.

Além disso, é preciso ressaltar que *A. sara* foi descrita por Elliot em 1910 e, posteriormente, *A. puruensis* por Lonnberg em 1941, e que seguindo as regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, o nome *A. sara* teria prioridade sobre o nome *A. puruensis*. Diante do exposto, nossos resultados recuperaram que a MOTU-seniculus 1 potencialmente corresponde a espécie válida *A. sara*, incluindo o táxon infraespecífico *A. s. puruensis*. Por fim, nós sugerimos que os taxonomistas avaliem a possibilidade de *A. s. puruensis* na realidade ser sinonimizado ou constituir táxon infraespecífico de *A. sara* ao invés de *A. seniculus*.

5.2.3. Espécies *A. macconnelli* e *A. nigerrima*, os bugios da Amazônia centro-oriental

Bonvicino e colaboradores (1995) elevaram ao nível de espécie *A. stramineus* e *A. macconnelli* com base em dados de medidas craniais, e apoiados em dados citogenéticos. Os autores sugeriram que há duas espécies de bugios que ocorrem na margem norte do rio Amazonas no Brasil: *A. stramineus*, que ocorre do rio Negro até a margem oeste do rio Trombetas ou Erepecurú no Amazonas; e *A. macconnelli*, que ocorre da margem leste do rio Erepecurú até a costa do Amapá. Posteriormente, Groves (2001) reconheceu apenas *A. macconnelli*, baseando sua decisão no padrão de coloração da pelagem, em diferenças de medidas craniais (Bonvicino et al., 1995) e em dados cromossômicos ($2n=47-49$) (Lima & Seuánez, 1991). O autor sugeriu que essa espécie ocorre por todo o Escudo das Guianas, incluindo Guiana Francesa, Suriname, Guiana, sul da Venezuela (sul do rio Orinoco) e norte do Brasil (desde a costa do estado do Amapá até as margens orientais dos rios Negro e Branco, incluindo a ilha de Gurupá no delta do Amazonas) (Figura 13).

Gregorin (2006) também reconheceu apenas *A. macconnelli* como única espécie válida para o Escudo das Guianas, baseando-se no padrão de coloração da pelagem, na morfometria de espécimes amostrados no Brasil e em dados citogenéticos. O autor descreveu três padrões de coloração da pelagem para os espécimes que ocorrem na região descrita para *A. stramineus* e *A. macconnelli* por Bonvicino e colaboradores (1995), e demonstrou que a variabilidade de cor da pelagem não apresenta um padrão geográfico associado. Adicionalmente, suas análises de componentes principais das medidas morfo-craniais, e de morfologia do osso hioide, também não suportaram o reconhecimento de dois táxons para estas regiões do Brasil. Além disso, comparações entre espécimes brasileiros e do resto do Escudo das Guianas (Guiana Francesa, Suriname e sul da Venezuela) evidenciaram que o padrão de coloração da pelagem encontrado para exemplares do Brasil estão presentes também nas demais localidades, sugerindo a existência de uma única espécie para o Escudo da Guianas. No entanto, um quarto padrão de coloração da pelagem para *A. macconnelli* foi registrado por Gregorin (2006) em exemplares restritos à localidade de Itapiranga (Amazonas), os quais apresentaram regiões com coloração da pelagem negra na cabeça, membros, cauda e partes do dorso. O autor (2006) ressaltou que a região estudada pode se constituir um ponto de hibridação

com *A. nigerrima* ou que outros fatores relativos a adaptações locais poderiam estar envolvidos com esta variação de fenótipo.

Apesar de *A. nigerrima* ter sido inicialmente classificada como subespécie do complexo *A. belzebul*, devido ao seu padrão de coloração da pelagem (Hill, 1962; Bonvicino et al., 1989), Groves (2001) e Gregorin (2006) reconheceram *A. nigerrima* como uma espécie válida. Gregorin (2006) analisou uma ampla gama de espécimes de diversas localidades, descrevendo um padrão de coloração de pelagem preta diagnosticável e invariável para a maioria destes exemplares, além de uma morfologia do osso hioide que distinguiu esse táxon dos demais bugios brasileiros. Além disso, Gregorin (2006) indicou, com base no cariótipo ($2n=50$, XX - Armada et al., 1987) e em dados morfo-craniais e do osso hioide, que essa espécie está mais relacionada com *A. macconnelli* do que com *A. belzebul*. Análises filogenéticas posteriores utilizando o marcador mitocondrial *Cyt b* também sugerem *A. nigerrima* como linhagem distinta e irmã de *A. macconnelli* (Bonvicino et al., 2001; Nascimento et al., 2005; Viana et al., 2015).

Nossos dados de fato recuperaram uma MOTU consenso (MOTU-macconnelli) que incluiu todos os espécimes identificados como *A. macconnelli* (ver Figura 5 e 9). A MOTU-macconnelli recuperada para o gene *Cyt b* ($n=4$) incluiu indivíduos provenientes do estado do Amazonas no Brasil e da Guiana Francesa, não suportando a hipótese de existência de dois táxons (Figura 9 e 13). Além do mais, nenhum indivíduo reconhecido como *A. seniculus*, pertencente à MOTU-seniculus 2 foi agrupado na MOTU-macconnelli conforme esperado. Nossos achados, portanto, são congruentes com análises filogenéticas prévias para os genes mitocondriais (*Cyt b*, ATP6, ATP8, COI, COII, ND4, ND5, ND6) que distinguiram *A. seniculus* e *A. sara* de *A. macconnelli* (Cortés-Ortiz et al., 2003; Ruiz-García et al., 2017) e com as revisão taxonômica de Gregorin (2006) e com as propostas de Groves (2001) e Cortés-Ortiz et al. (2015), que assumem *A. macconnelli* como espécie válida e distinta de *A. seniculus*.

Em relação à *A. nigerrima*, recuperamos uma MOTU consenso que a incluiu na MOTU-macconnelli (Figura 5 e 9). Entretanto, duas abordagens de delimitação, baseadas em filogenética e coalescência (bPTP e GMYC), recuperaram este táxon em uma MOTU distinta da MOTU-macconnelli, com alto valor de suporte ($P>0.9$). Portanto, ausência de dados COI e o fato de *A. nigerrima* estar subamostrada ($n=1$) no nosso estudo limita o nosso poder de inferir sobre o status desse táxon, baseado na abordagem de MOTU-

consenso. Apesar disso, é importante ressaltar que as revisões taxonômicas descrevem caracteres diagnósticos evidentes que consideram *A. nigerrima* como espécie válida, com distribuição alopátrica à de *A. macconnelli* (Groves, 2001; Gregorin, 2006). Adicionalmente, estudos moleculares também recuperaram *A. nigerrima* como espécie distinta das demais do gênero *Alouatta* (Bonvicino et al., 2001; Nascimento et al., 2005; Viana et al., 2015). Portanto, nós não consideramos os dados de distância que agruparam *A. nigerrima* na MOTU consenso de *A. macconnelli*, e consideramos *A. nigerrima* como espécie válida e distinta de *A. macconnelli*, com base nos dados obtidos para as análises filogenéticas e de coalescência e na possibilidade de eventual viés na abordagem de distância genética (Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fiedler, 2007), dada a amostragem reduzida e divergência recente entre os táxons considerados (~0.65 milhões de anos - Nascimento et al., 2005). Ressaltamos, porém, que é fundamental aumentar o número de indivíduos para *A. nigerrima* em futuros estudos genéticos, além de ampliar o número de marcadores moleculares empregados.

5.2.4. Complexo de espécies *A. belzebul*, bugios do norte-nordeste do Brasil

A revisão taxonômica de Hill (1962) descreveu cinco subespécies para o complexo *A. belzebul* (*A. b. belzebul*, *A. b. discolor*, *A. b. ululata*, *A. b. mexicanae* e *A. b. nigerrima*). Bonvicino e colaboradores (1989), porém, analisaram cinco morfotipos para o padrão de coloração da pelagem e reconheceram quatro subespécies (*A. b. belzebul*, *A. b. discolor*, *A. b. ululata* e *A. b. nigerrima*), indicando um padrão de distribuição geográfica ao norte e nordeste do Brasil. Posteriormente, Groves (2001) propôs *A. belzebul* como uma espécie válida, mas não reconheceu as subespécies. Suas decisões foram tomadas considerando a cor da pelagem e dados do cariótipo que apontam número diploide $2n=50$ para fêmeas e $2n=49$ para machos e a existência de sistema cromossômico sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ (Armada et al., 1987).

Diferenças evidentes no padrão de coloração da pelagem, e em caracteres morfo-craniais e do aparato ósseo hioide foram utilizadas por Gregorin (2006) para admitir as três espécies, sendo elas *A. belzebul*, *A. discolor* e *A. ululata*. O autor descreveu *A. belzebul* como parte considerável dos espécimes analisados com coloração da pelagem toda negra, com mãos, pés e terço apical da cauda com variação do ruivo ao castanho-avermelhado, osso hioide com tentório retangular, abertura ovalada e sulco lateral presente; e ocorrência na Floresta Amazônica (estados do Amapá, Pará, Maranhão) e na Mata Atlântica nordestina nos estados do Piauí, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, e Rio

Grande do Norte (Figura 15). Por outro lado, *A. discolor* foi diferenciado de *A. belzebul* por possuir uma faixa dorsal ampla que vai da cabeça até a região lombar, de coloração ruiva a castanho-avermelhada, osso hioide em formato ovalado, abertura larga e tentório reduzido; e ocorrer ao sul do rio Amazonas, da margem esquerda do rio Tapajós até o baixo rio Tocantins (Figura 15). Por fim, a descrição de *A. ululata* se baseou em diferenças relacionadas ao dicromatismo sexual e ao menor tamanho de algumas regiões do crânio, além de sua distribuição geográfica que coincide com a vegetação de transição entre a Floresta Amazônica e Mata Atlântica, ocorrendo nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (Figura 15). No entanto, o autor sugeriu para confirmar se este táxon é na realidade uma variação de *A. belzebul* ou para confirmar sua validação, estudos mais aprofundados de variação morfológica, citogenética e dados ecológicos deveriam ser realizados. Finalmente, a revisão bibliográfica de Cortés-Ortiz e colaboradores (2015) considera as espécies reconhecidas por Gregorin (2006), mas reafirmam a necessidade de dados genético-moleculares para confirmação das espécies *A. discolor* e *A. ululata*.

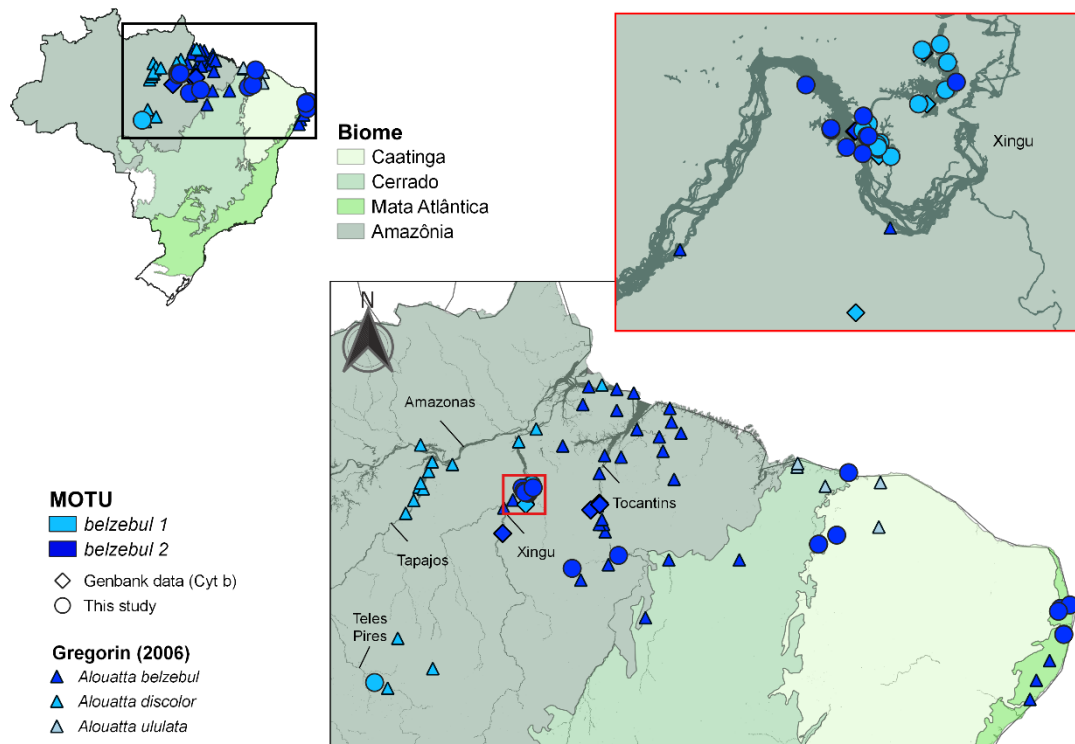


Figura 14. Mapa da distribuição geográfica do complexo *A. belzebul* (*belzebul*, *discolor*, *ululata*) nos diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Amazônia). Os triângulos representam a localidade das espécimes analisadas por Gregorin (2006), azul escuro são as espécimes descritas como *A. belzebul*, azul claro *A. discolor* e acinzentado *A. ululata*. Os losangos são as sequências dos diferentes táxons obtidas no banco de dados GenBank. Os círculos na cor azul claro representam a MOTU-belzebul 1 e em azul escuro MOTU-belzebul 2.

No caso do complexo *A. belzebul*, não há evidências de subdivisão populacional entre as populações que ocorrem na Floresta Amazônica e as que ocorrem na Mata Atlântica nordestina (Nascimento et al., 2005; 2008), sendo esse padrão de ausência de diferenciação atribuído à conexão existente entre ambos os biomas no passado. Adicionalmente, Viana et al. (2015) realizaram análises filogenéticas e populacionais para representantes dos táxons *A. b. belzebul* e *A. b. ululata* e, não encontraram estruturação populacional ou evidências suficientes para conclusões taxonômicas. Por fim, Povill e colaboradores (2022) reportam evidências genéticas para elevar *A. b. discolor* ao nível de espécie, sem diferenciar, porém, *A. b. belzebul* e *A. b. ululata*. No entanto, as descrições do cariótipo para o complexo *A. belzebul* têm sugerido um similaridades entre os táxons (*A. b. ululata* e *A. belzebul*) que apresentaram o mesmo número diploide: $2n=49$ para os machos (Armada et al., 1987; Villalobos et al., 2004), e $2n=50$ entre fêmeas de *A. b. discolor* e *A. belzebul* (Povill et al., 2022; Armada et al., 1987).

No nosso estudo, as análises de delimitação de espécies para o *Cyt b* e COI recuperaram apenas duas MOTUs consenso para o complexo *A. belzebul* (MOTU-belzebul 1 e MOTU-belzebul 2) (Figura 5, 6 e 8). Nós encontramos clados que distinguem os indivíduos que ocorrem na margem esquerda do rio Xingu (PA) (MOTU-belzebul 1) dos que ocorrem na margem direita rio Xingu (MOTU-belzebul 2), o qual inclui também *A. b. ululata* e as populações da Mata Atlântica nordestina (Figura 8 e 15). Estes achados corroboram aqueles encontrados por Povill e colaboradores (2022), que forneceram evidências genéticas para elevar *A. b. discolor* ao nível de espécie, mas que não suportaram a validade de *A. ululata* mantendo-a como subespécie de *A. belzebul*.

Adicionalmente, as análises bPTP e GMYC para o COI indicaram uma subdivisão da MOTU-belzebul 2, a qual evidenciou um padrão geográfico separando *A. b. ululata* e os espécimes que ocorrem na Mata Atlântica, na região leste do Pará, nas proximidades do rio Itacaiúnas, afluente do rio Tocantins, dos demais espécimes que ocorrem na região oeste do Pará (Figura 6). Contudo, apenas o COI apresentou resultados, sugerindo uma possível subdivisão entre indivíduos Amazônicos e aqueles que ocorrem na Caatinga e na Mata Atlântica. Desta forma, sugerimos que estudos futuros incluam abordagens que possam esclarecer se tal subdivisão se deve a questões relacionadas ao sinal filogenético do marcador utilizado (Andrews & Eastal, 2000; Saccone et al., 1999) e/ou possíveis evidências de subdivisão filogeográfica (Avise et al., 1987).

Nossos resultados sugerem duas potenciais espécies para o complexo *A. belzebul*, sendo estas *A. discolor* (MOTU-belzebul 1) e *A. belzebul*, incluindo *A. b. ululata* (MOTU-belzebul 1), o qual corrobora com os resultados de Povill et al. (2022) e fornece evidências moleculares para assumir *A. discolor* como espécie válida conforme a proposta taxonômica de Gregorin (2006).

5.2.5. Complexo de espécies *A. guariba*, os bugios da Mata Atlântica sul-sudeste

Diferentes revisões taxonômicas adotam nomes distintos (*A. guariba* ou *A. fusca*) para a espécie de bugios que ocorrem na Mata Atlântica sul-sudeste, sendo o nome *A. guariba* utilizado por Hill (1962) e o nome *A. fusca* adotado por Gregorin (2006). Esse debate se inicia com a história taxonômica do bugio da Mata Atlântica do nordeste (*A. belzebul*). Jorge Marcgrave em 1648 descreveu um espécime de bugio que habitava a costa Atlântica do estado de Pernambuco referindo-se a esta como “guariba”. Atualmente, sabe-se que a única espécie que ocorre nesta localidade é *A. belzebul*. Posteriormente, É. Geoffroy Saint-Hilaire (1806) descreveu um táxon com o padrão de coloração dos bugios que ocorrem na Mata Atlântica do sudeste como [*Stentor*] *fuscus* e entendeu [*Simia*] *guariba* como sinônimo júnior de *A. belzebul*. Sob esta perspectiva, Hershkovitz (1949) concluiu que o nome correto para este táxon seria *A. fusca*, considerando *A. guariba* sinônimo de *A. belzebul*; e Gregorin (2006) se apoia nesta visão. Porém, Rylands e Brandon-Jones (1998) discordam desta interpretação e consideram que o nome “guariba” utilizado por Marcgrave (1648) foi utilizado apenas como nome popular para diferenciar o bugio que ocorre no nordeste brasileiro do macaco aranha *Ateles belzebuth*. Portanto, Ryland e Brandon-Jones (1998) assumem *A. guariba* como a espécie que ocorre na Mata Atlântica sul-sudeste. Nós seguimos a interpretação de Rylands & Brandon-Jones (1998) e seguiremos com as interpretações das revisões taxonômicas nos referindo ao bugio da Mata Atlântica sul-sudeste como *A. guariba*.

Na revisão taxonômica de Hill (1962) três subespécies são incluídas no complexo *A. guariba*, sendo estas denominadas como *A. g. guariba*, *A. g. beniensis* e *A. g. clamitans*. Posteriormente, o táxon nomeado como *beniensis* foi indicado como pertencendo ao complexo *A. seniculus* (Gregorin, 2006). Groves (2001) reconhece a espécie *A. guariba* incluindo apenas as subespécies *A. g. guariba* e *A. g. clamitans*. Entretanto, Gregorin (2006) reconheceu *A. guariba* e *A. clamitans* como espécies analisando o formato do osso

hioide, tamanho corpóreo e a cor da pelagem. O autor descreveu *A. guariba* como sendo um bugio castanho enegrecido com as pontas dos pelos amareladas na região médio-dorsal e região lombar ruiva a alaranjada em ambos os sexos com ausência de dicromatismo sexual. A distribuição geográfica para a espécie estaria restrita à Mata Atlântica ao sul do rio São Francisco ocorrendo nos estados da Bahia, Espírito Santo, noroeste de Minas Gerais e Rio de Janeiro, com registro neste apenas para a cidade de Teresópolis (Figura 16). Para a espécie *A. clamitans*, Gregorin (2006) descreveu um dicromatismo sexual evidente, com machos adultos de pelagem dorsal variando do ruivo-vermelho para um ruivo-amarelado (avelã), com membros e cauda invariavelmente mais escuros que o dorso; e com fêmeas escuras com pelagem dorsal e membros variando do castanho-enegrecido ao castanho-avermelhado. Em relação a sua distribuição geográfica, foi indicado que essa espécie ocorre da região de Misiones, na Argentina e no Brasil na Mata Atlântica dos estado do Rio Grande do Sul até o sul do estado do Rio de Janeiro (RJ), e no vale do Jequitinhonha em Minas Gerais (Figura 16).

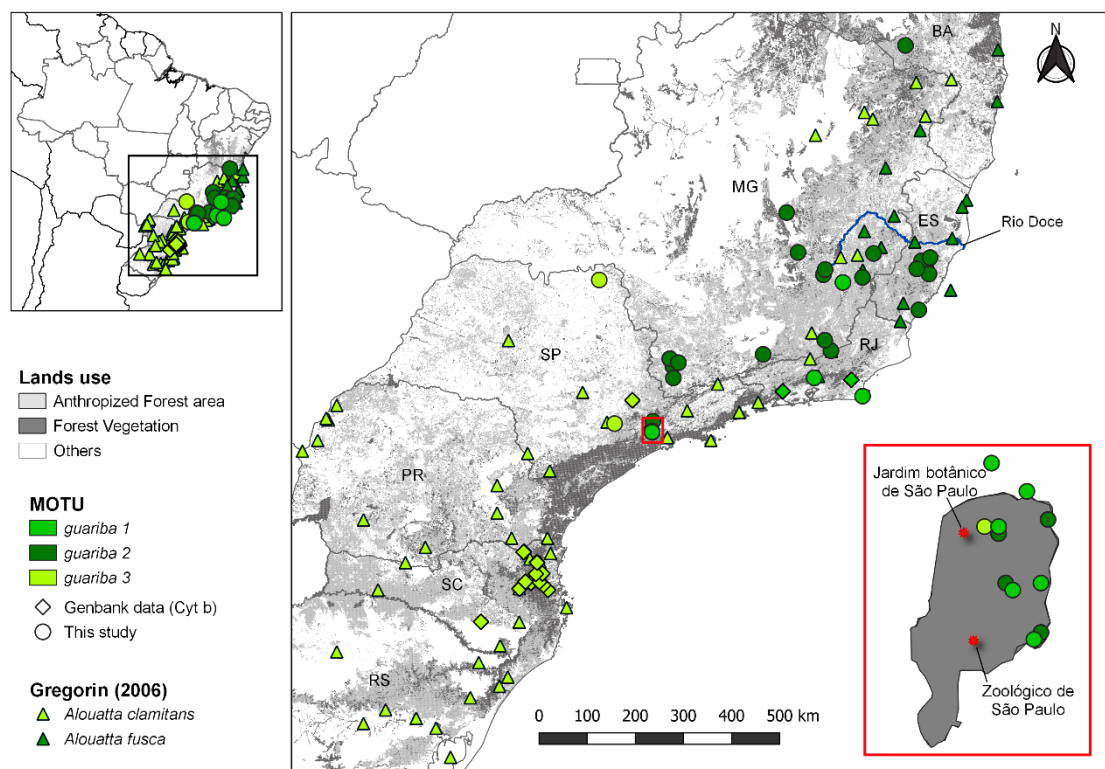


Figura 15. Mapa da distribuição geográfica do complexo *A. guariba* (*guariba* e *clamitans*) na Mata Atlântica sul-sudeste. Os triângulos representam a localidade das espécimes analisadas por Gregorin (2006), verde escuro são as espécimes descritas como *A. fusca* (= *A. guariba*), verde claro *A. clamitans*. Os losangos são as sequências dos diferentes táxons obtidas no banco de dados GenBank. Os círculos verde escuro representam a MOTU-guariba 1 (BA/MG/ES), em verde intermediário MOTU-guariba 2 (RJ) e em verde claro a MOTU-guariba 3 (SC).

Análises para o gene *Cyt b* evidenciaram uma subdivisão filogeográfica com padrão Norte-Sul para o complexo *A. guariba* da Mata Atlântica, o qual separou as populações de bugios do estado do Rio de Janeiro (clado Norte) e daquelas de Santa Catarina (clado Sul) há aproximadamente 1,2 milhões de anos (Bonvicino et al., 2015; de Mello Martins et al., 2011; Harris et al., 2005). Populações com ocorrência no estado de São Paulo, no entanto, evidenciaram compartilhamento de haplótipos com ambos os cladros. A distribuição geográfica das populações de bugios estudadas corresponde à área de ocorrência de *A. clamitans*, descrita por Gregorin (2006).

Análises filogenéticas bayesianas (*Cyt b*) posteriores, realizadas com uma amostragem mais ampla, incluindo representantes da Argentina e do Brasil de populações de Minas Gerais, Espírito Santos, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, evidenciaram a existência de três cladros bem suportados conforme descrito a seguir: Clado 1 representado por populações da Argentina, RS e SP; Clado 2 por representantes de MG, RJ, SP; e Clado 3 por populações de MG, ES, e SP (Machado; 2011). É importante destacar o fato que o mesmo padrão geográfico obtido para os cladros recuperados pelas análises moleculares coincide com o padrão geográfico observado para três morfotipos da cor da pelagem de *A. clamitans* descrito por Gregorin (2006) que descreveu o morfotipo 1 para espécimes do RS e SC, morfotipo 2 para espécimes de SP; e morfotipo 3 para espécimes do RJ e das populações que ocorrem na região central e meridional de MG.

Além disso, há descrito para *A. guariba* e suas subespécies uma ampla diversidade de sistemas cromossômicos sexuais, arranjos cromossômicos e diferenças no número diploide (Mudry et al., 2015). Contudo, Bonvicino et al. (2015) consideraram a distribuição geográfica sugerida por Gregorin (2006) para *A. g. guariba* e sugeriram que o cariótipo $2n=52$ e sistema sexual XY descrito para um indivíduo proveniente do ES é o mais adequado para caracterizar esse táxon (Oliveira et al., 2000). Em contrapartida, *A. g. clamitans* possui uma ampla diversidade de cariomorfos apresentando uma variedade de número diploide e sistemas sexuais com um padrão geográfico (Mudry et al., 2015), o qual coincide com aqueles encontrados para dados morfológicos e moleculares (Gregorin, 2006; Machado, 2011). As populações de Santa Catarina e Paraná se diferenciam das demais por apresentarem $2n=46$ e $2n=45$, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ ou $X_1X_2X_3Y_1Y_2$ (de Oliveira et al., 2002); enquanto as populações de Minas Gerais e Rio de Janeiro apresentam $2n=50$ e $2n=49$, $X_1X_1X_2X_2X_3X_3/X_1X_2X_3Y_1Y_2$ ou X_1X_2Y (de Oliveira et al., 1998; 2002); e, por fim, populações de São Paulo apresentam $2n=50$ e $2n=49$, XX/XY (Koiffmann &

Saldanha, 1974); Bonvicino e colaboradores (2015) argumentam que os diferentes arranjos cariotípicos envolveram cromossomos distintos autossômicos nas translocações do Y (de Oliveira et al., 2000) e que somado aos resultados das análises moleculares *Cyt b* esses resultados sugerem duas linhagens evolutivas distintas de *A. g. clamitans*.

Nossas análises de delimitação de espécies para o complexo *A. guariba* recuperaram três MOTUs consenso (Figura 5, 6 e 9), sendo elas: MOTU-guariba 1 (RJ, MG e SP); MOTU-guariba 2 (ES, MG e SP); e MOTU-guariba 3 (SC e SP) (Figura 8 e 16). Nossos achados concordam com Machado (2011), sugerindo a existência de três linhagens evolutivas que possivelmente correspondem aos táxons *A. guariba* (MOTU-guariba 2), *A. clamitans* (MOTU-guariba 1) e *A. clamitans* (MOTU-guariba 3) com padrão Norte-sul da Mata Atlântica sul-sudeste. Além disso, nosso estudo também separa os bugios do RJ em clado distinto dos de SC, conforme sugerido em estudos anteriores (Bonvicino et al., 2015; de Mello Martins et al., 2011; Harris et al., 2005). Portanto, A MOTU-guariba 2 coincide com a área de distribuição geográfica de *A. guariba* e as localidades ao sul com *A. clamitans* (MOTU-guariba 1 e MOTU-guariba 3), conforme descrito por Gregorin (2006). O arranjo parafilético dos indivíduos que ocorrem no estado de SP presente nas três MOTUs pode ser devido à prevalência de polimorfismo ancestral e/ou a existência de uma zona de contato ou zona de migração em SP, composta por populações receptoras de migrantes dos estados do sul e sudeste do Brasil. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de ocorrência de hibridação, já que este fato tem sido reportado para *A. guariba* e *A. caraya* (Mourthe et al., 2019).

Nós assumimos três potenciais táxons para o complexo *A. guariba*: *A. guariba* (MOTU-guariba 2), *A. clamitans* 1 (MOTU-guariba 1) e *A. clamitans* 2 (MOTU-guariba 3). Nossos resultados sugerem que *A. clamitans* pode constituir duas linhagens evolutivas independentes, assim apontando para os taxonomistas a necessidade de revisitar o táxon em uma revisão taxonômica-sistemática. Contudo, para reforçar que esses táxons de fato constituem espécies válidas sugere-se empregar uma análise taxonômica integrativa que inclua abordagens genômicas, abrangendo representantes das localidades estabelecidas pelas MOTU-guariba 1, MOTU-guariba 2 e MOTU-guariba 3, realizadas em espécimes identificadas a partir do padrão de coloração da pelagem, conforme descrito por Gregorin (2006).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a delimitação de espécies seja um problema filosófico e complexo (Hey et al., 2003), os diversos conceitos de espécie compartilham amplamente a ideia de que as espécies são linhagens, contínuo ancestral-descendente, metapopulacionais evoluindo independentemente (Conceito de espécie unificado, ver De Queiroz, 2005, 2007). No presente estudo, nós adotamos também o Conceito Filogenético de Espécies (CFE), baseado em monofiletismo (Hennig, 1966; Rosen, 1978).

As MOTUs delimitadas nesse trabalho potencialmente correspondem a 12 espécies do gênero *Alouatta* (Tabela 11). Para a Mesoamérica identificamos apenas as espécies *A. pigra* e *A. palliata*; para o Brasil, foco principal de nosso trabalho, identificamos uma espécie ocorrendo no Cerrado (*A. caraya*); seis espécies ocorrendo exclusivamente na região Amazônica (*A. seniculus*, *A. sara*, *A. macconnelli*, *A. nigerrima*, *A. discolor*); uma ocorrendo na Amazônia e também na Mata Atlântica nordestina (*A. belzebul*); e três espécies ocorrendo na Mata Atlântica sul-sudeste identificadas como *A. guariba*, sendo duas linhagens evolutivas independentes de *A. clamitans*. A tabela 11 sumariza os nossos principais achados em relação à diversidade dos táxons do gênero *Alouatta* estudados no presente trabalho.

É importante, porém, destacar que o método DNA *barcoding* e as abordagens de delimitação de espécies não são substitutas da taxonomia tradicional (Ebach & Holdrege, 2005; Hajibabaei et al., 2007), mas sim aliadas desta, pois possibilitam a identificação das unidades taxonômicas moleculares (Blaxter et al., 2005; Floyd et al., 2002). Deste modo, as abordagens de delimitação ligadas ao método DNA *barcoding* devem ser associadas a outros dados, como por exemplo os morfológicos (Galimberti et al., 2012), e assim serem utilizadas para delimitar espécies por meio da taxonomia integrativa (Dayrat, 2005). Embora as MOTUs identificadas possam não corresponder às espécies diagnosticadas morfológicamente pela taxonomia (Casiraghi et al., 2010), os resultados gerados se constituem em um dado primário para diagnosticar linhagens evolutivas independentes, visto que dados moleculares podem assinalar processos históricos envolvidos na divergência de linhagens (Templeton, 2021). Sob essa perspectiva, os resultados das análises de DNA *barcoding* e das demais abordagens de delimitação de espécies podem servir como ponto de partida para a escolha de táxons para análises

filogenéticas subsequentes, e também para sinalizar quais grupos, em qualquer nível taxonômico, necessitam de revisões sistemáticas (Hajibabaei et al., 2007).

Tabela 11. Informações das MOTUs delimitadas no presente trabalho incluindo espécies identificadas, subespécies analisadas e a distribuição geográfica por continente e bioma para as espécies que ocorrem no Brasil.

| Continentes | MOTUs consenso ² | Espécies | Subespécies | Ocorrência nos biomas brasileiros |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---|--|
| América do Sul (Brasil) ¹ | MOTU-caraya | <i>A. caraya</i> | | Cerrado |
| | MOTU-seniculus 1 | <i>A. sara</i> | <i>A. s. puruensis</i> | Amazônia |
| | MOTU-seniculus 2 | <i>A. seniculus</i> | <i>A. s. juara</i> | Amazônia |
| | MOTU-macconnelli | <i>A. macconnelli</i> | | Amazônia |
| | MOTU-nigerrima | <i>A. nigerrima</i> | | Amazônia |
| | MOTU-belzebul 1 | <i>A. discolor</i> | | Amazônia |
| | MOTU-belzebul 2 | <i>A. belzebul</i> | <i>A. b. ululata</i> | Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica nordestina |
| | MOTU-guariba 2 | <i>A. guariba</i> | | Mata Atlântica da BA, ES e noroeste de MG |
| | MOTU-guariba 1 | <i>A. clamitans</i> | | Mata Atlântica do RJ e sul de MG |
| | MOTU-guariba 3 | <i>A. clamitans</i> | | Mata Atlântica de SC |
| América Central | MOTU-pigra | <i>A. pigra</i> | | Não ocorre no Brasil |
| | MOTU-palliata | <i>A. palliata</i> | <i>A. p. palliata</i> , <i>A. p. mexicana</i> , <i>A. p. trabeata</i> , <i>A. p. coibensis</i> , <i>A. p. aequatorialis</i> | Não ocorre no Brasil |

¹ Nossas análises incluíram alguns táxons provenientes de outros países da América do Sul, porém a maior parte da nossa amostragem incluiu indivíduos provenientes do Brasil. ² Exceto a MOTU-nigerrima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692–4693.
- Andrews, T. D., & Easteal, S. (2000). Evolutionary Rate Acceleration of Cytochrome c Oxidase Subunit I in Simian Primates. *Journal of Molecular Evolution*, 50(6), 562–568. <https://doi.org/10.1007/s002390010059>
- Armada, J. L. A., Barroso, C. M. L., Lima, M. M. C., Muniz, J. A. P. C., & Seuánez, H.

- N. (1987). Chromosome studies in *Alouatta belzebul*. *American Journal of Primatology*, 13(3), 283–296. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350130306>
- Arroyo-Rodríguez, V., & Dias, P. A. D. (2010). Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: A review. *American Journal of Primatology*, 72(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/ajp.20753>
- Arruda, Ferreira, Oliveira, & Venere. (2019). DNA Barcoding Reveals High Levels of Divergence among Mitochondrial Lineages of Brycon (Characiformes, Bryconidae). *Genes*, 10(9), 639. <https://doi.org/10.3390/genes10090639>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.004>
- Ascunce, Marina S., Hasson, E., & Mudry, M. D. (2003). COII: a useful tool for inferring phylogenetic relationships among New World monkeys (Primates, Platyrrhini). *Zoologica Scripta*, 32(5), 397–406. <https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.2003.00123.x>
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522. <http://www.jstor.org/stable/2097141>
- Bastos, H. B., Gonçalves, E. C., Ferrari, S. F., Silva, A., & Schneider, M. P. C. (2010). Genetic structure of red-handed howler monkey populations in the fragmented landscape of eastern Brazilian Amazonia. *Genetics and Molecular Biology*, 33(4), 774–780. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010000400027>
- Bhaskar, R., & Mohindra, V. (2018). Variability in DNA COI sequences reveals new haplotypes in freshwater turtles from northern region of India. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1), 317–323. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1443850>
- Bittencourt, P. S., Campos, Z., Muniz, F. de L., Marioni, B., Souza, B. C., Da Silveira, R., de Thoisy, B., Hrbek, T., & Farias, I. P. (2019). Evidence of cryptic lineages within a small South American crocodylian: the Schneider's dwarf caiman *Paleosuchus trigonatus* (Alligatoridae: Caimaninae). *PeerJ*, 7(3), e6580. <https://doi.org/10.7717/peerj.6580>
- Bjarnason, A., Soligo, C., & Elton, S. (2015). Phylogeny, Ecology, and Morphological Evolution in the Atelid Cranium. *International Journal of Primatology*, 36(3),

- 513–529. <https://doi.org/10.1007/s10764-015-9839-z>
- Blair, C., & Bryson, R. W. (2017). Cryptic diversity and discordance in single-locus species delimitation methods within horned lizards (Phrynosomatidae: Phrynosoma). *Molecular Ecology Resources*, *17*(6), 1168–1182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12658>
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). *Defining operational taxonomic units using DNA barcode data*. September, 1935–1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>
- Bogenhagen, D., & Clayton, D. A. (1974). The Number of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid Genomes in Mouse L and Human HeLa Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *249*(24), 7991–7995. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42063-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42063-2)
- Bonvicino, C. R., Fernandes, M. E. B., & Seuánez, H. N. (1995). Morphological analysis of *Alouatta seniculus* species group (Primates, Cebidae). A comparison with biochemical and karyological data. *Human Evolution*, *10*(2), 169–176. <https://doi.org/10.1007/BF02437539>
- Bonvicino, Cibele R., Lemos, B., & Seuánez, H. N. (2001). Molecular phylogenetics of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini). *Chromosoma*, *110*(3), 241–246. <https://doi.org/10.1007/s004120000128>
- Bonvicino, Cibele Rodrigues, Langguth, A., & Mittermeier, R. A. (1989). A study of pelage color and geographic distribution in *Alouatta belzebul* (Primates: Cebidae). *Revista Nordestina de Biologia*, 139–148.
- Bonvicino, Cibele Rodrigues, & Viana, M. C. (2015). Genetic Diversity of *Alouatta* (Primates) from Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Primatology*, *04*(02). <https://doi.org/10.4172/2167-6801.1000131>
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, *10*(4), e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- BROWN, S. D. J., COLLINS, R. A., BOYER, S., LEFORT, M.-C., MALUMBRES-OLARTE, J., VINK, C. J., & CRUICKSHANK, R. H. (2012). Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, *12*(3), 562–565. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>

- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>
- Buhay, J. E. (2009). “COI-like” Sequences Are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1), 96–110. <https://doi.org/10.1651/08-3020.1>
- Burns, J. M., Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. N. (2008). DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservación Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6350–6355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712181105>
- Byrne, H., Rylands, A. B., Carneiro, J. C., Alfaro, J. W. L., Bertuol, F., da Silva, M. N. F., Messias, M., Groves, C. P., Mittermeier, R. A., Farias, I., Hrbek, T., Schneider, H., Sampaio, I., & Boubli, J. P. (2016). Phylogenetic relationships of the New World titi monkeys (*Callicebus*): first appraisal of taxonomy based on molecular evidence. *Frontiers in Zoology*, 13(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0142-4>
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., & de Mattia, F. (2010). DNA barcoding: A six-question tour to improve users’ awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*, 11(4), 440–453. <https://doi.org/10.1093/bib/bbq003>
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., & De Mattia, F. (2010). DNA barcoding: a six-question tour to improve users’ awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*, 11(4), 440–453. <https://doi.org/10.1093/bib/bbq003>
- Chaves, P. B., Graeff, V. G., Lion, M. B., Oliveira, L. R., & Eizirik, E. (2012). DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 18–35. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03056.x>
- Clare, E. L., Lim, B. K., Engstrom, M. D., Eger, J. L., & Hebert, P. D. N. (2007). DNA barcoding of Neotropical bats: Species identification and discovery within Guyana: Barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 184–190. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01657.x>
- Collins, R. A., & Cruickshank, R. H. (2012). The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12046>

- Collins, Rupert A., Boykin, L. M., Cruickshank, R. H., & Armstrong, K. F. (2012). Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(3), 457–465. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00176.x>
- Cornick, L. A., & Markowitz, H. (2002). DIURNAL VOCAL PATTERNS OF THE BLACK HOWLER MONKEY (*ALOUATTA PIGRA*) AT LAMANAI, BELIZE. *Journal of Mammalogy*, 83(1), 159–166. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2002\)083<0159:DVPOTB>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2002)083<0159:DVPOTB>2.0.CO;2)
- Cortés-Ortiz, L., Duda Jr., T. F., Canales-Espinosa, D., García-Orduña, F., Rodríguez-Luna, E., & Bermingham, E. (2007). Hybridization in Large-Bodied New World Primates. *Genetics*, 176(4), 2421–2425. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.074278>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00308-1)
- Cortés-Ortiz, Liliana, 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* (pp. 55–84). Springer.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(3), 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
- de Mello Martins, F., Gifalli-Iughetti, C., Koiffman, C. P., & Harris, E. E. (2011). Coalescent analysis of mtDNA indicates Pleistocene divergence among three species of howler monkey (*Alouatta* spp.) and population subdivision within the Atlantic Coastal Forest species, *A. guariba*. *Primates*, 52(1), 77–87. <https://doi.org/10.1007/s10329-010-0226-2>
- De Oliveira, E. H. C., Lima, M., Sbalqueiro, I. J., & Pissinati, A. (1998). The karyotype of *Alouatta fusca clamitans* from Rio de Janeiro, Brazil: Evidence for a y-autosome translocation. *Genetics and Molecular Biology*, 21, 361–364.
- De Oliveira, E. H. C., Neusser, M., Figueiredo, W. B., Nagamachi, C., Pieczarka, J. C., Sbalqueiro, I. J., Wienberg, J., & Müller, S. (2002). The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): Reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*, 10(8), 669–683. <https://doi.org/10.1023/A:1021520529952>

- De Oliveira, E. H. C., Suemitsu, E., Silva, A., & Sbalqueiro, I. J. (2000). Geographical variation of chromosomal number in *Alouatta fusca clamitans* (Primates, Atelidae). *Caryologia*, 53(2), 163–168. <https://doi.org/10.1080/00087114.2000.10589192>
- De Queiroz, K. (2005). Different species problems and their resolution. *BioEssays*, 27(12), 1263–1269. <https://doi.org/10.1002/bies.20325>
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1905–1916. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1722>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10329-020-00854-x>
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>
- 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. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Ebach, M. C., & Holdrege, C. (2005). More Taxonomy, Not DNA Barcoding. *BioScience*, 55(10), 822–824. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0823:MTNDB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0823:MTNDB]2.0.CO;2)
- Ermakov, O. A., Simonov, E., Surin, V. L., Titov, S. V., Brandler, O. V., Ivanova, N. V., & Borisenko, A. V. (2015). Implications of Hybridization, NUMTs, and Overlooked Diversity for DNA Barcoding of Eurasian Ground Squirrels. *PLOS ONE*, 10(1), e0117201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117201>
- Estrada, A., Garber, P. A., Rylands, A. B., Roos, C., Fernandez-Duque, E., Di Fiore, A., Nekaris, K. A.-I., Nijman, V., Heymann, E. W., Lambert, J. E., Rovero, F., Barelli, C., Setchell, J. M., Gillespie, T. R., Mittermeier, R. A., Arregoitia, L. V., de Guinea, M., Gouveia, S., Dobrovolski, R., ... Li, B. (2017). Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Science Advances*, 3(1). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600946>

- Ferguson, J. W. H. (2002). On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75(4), 509–516.
<https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00042.x>
- Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferté, H., Bandi, C., Martin, C., & Casiraghi, M. (2009). Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-1>
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11(4), 839–850.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299. https://www.mbari.org/wp-content/uploads/2016/01/Folmer_94MMBB.pdf
- Frézal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727–736.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.005>
- Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology*, 62(5), 707–724.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>
- Galimberti, A., Spada, M., Russo, D., Mucedda, M., Agnelli, P., Crottini, A., Ferri, E., Martinoli, A., & Casiraghi, M. (2012). Integrated operational taxonomic units (IOTUs) in echolocating bats: A bridge between molecular and traditional taxonomy. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040122>
- Giraldo, P., Gómez-Posada, C., Martínez, J., & Kattan, G. (2009). Resource Use and Seed Dispersal by Red Howler Monkeys (*Alouatta seniculus*) in a Colombian Andean Forest . *Neotropical Primates*, 14(2), 55–64.
<https://doi.org/10.1896/044.014.0202>
- Glander, K. E. (1992). Dispersal patterns in Costa Rican mantled howling monkeys. *International Journal of Primatology*, 13(4), 415–436.
<https://doi.org/10.1007/BF02547826>
- Gonçalves, E. C., Silva, A., Barbosa, M. S. R., & Schneider, M. P. C. (2004). Isolation and characterization of microsatellite loci in Amazonian red-handed howlers

- Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini). *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 406–408.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00667.x>
- Gregorin, R. (2006). Taxonomy and geographic variation of species of the genus *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) in Brazil. *Revista Brasileira De Zoologia*, 23(1), 64–144.
- Grosjean, S., Ohler, A., Chuaynkern, Y., Cruaud, C., & Hassanin, A. (2015). Improving biodiversity assessment of anuran amphibians using DNA barcoding of tadpoles. Case studies from Southeast Asia. *Comptes Rendus Biologies*, 338(5), 351–361.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.03.015>
- Guindon, S., Dufayard, J., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hagstrom, E., Freyer, C., Battersby, B. J., Stewart, J. B., & Larsson, N.-G. (2014). No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline. *Nucleic Acids Research*, 42(2), 1111–1116.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt969>
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4), 167–172.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>
- Hajibabaei, M., Singer, G. A., & Hickey, D. A. (2006). Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome*, 49(7), 851–854.
<https://doi.org/10.1139/g06-025>
- 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. <https://doi.org/10.1896/1413-4705.13.2.16>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical

- skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004a). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2(10), e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004b). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2(10), e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hey, J., Waples, R. S., Arnold, M. L., Butlin, R. K., & Harrison, R. G. (2003). Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(11), 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.08.014>
- Hickerson, M. J., Meyer, C. P., & Moritz, C. (2006). DNA Barcoding Will Often Fail to Discover New Animal Species over Broad Parameter Space. *Systematic Biology*, 55(5), 729–739. <https://doi.org/10.1080/10635150600969898>
- Hill, W. C. O. (1962). *Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy. Cebidae (part B): a Monograph*. University Press.
- Hirano, Z. M. B., Tramonte, R., Silva, A. R. M., Rodrigues, R. B., & Santos, W. D. (2003). Morphology of epidermal glands responsible for the release of colored secretions in *Alouatta guariba clamitans*. *Laboratory Primate Newsletter*, 42(2), 4–7.
- Hofmann, E. P., Nicholson, K. E., Luque-Montes, I. R., Köhler, G., Cerrato-Mendoza, C. A., Medina-Flores, M., Wilson, L. D., & Townsend, J. H. (2019). Cryptic Diversity, but to What Extent? Discordance Between Single-Locus Species Delimitation Methods Within Mainland Anoles (Squamata: Dactyloidae) of Northern Central America. *Frontiers in Genetics*, 10(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00011>
- Hubert, N., & Hanner, R. (2015). DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. *DNA Barcodes*, 3(1), 44–58. <https://doi.org/10.1515/dna-2015-0006>

- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., BurrIDGE, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J., & Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, 3(6), e2490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490>
- Hudson, R. R. (1990). Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7(1), 44.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hurst, G. D. D., & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525–1534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3056>
- Jackson, A. S., & Nijman, V. (2020). Dna barcoding of primates and the selection of molecular markers using african great apes as a model. *Journal of Anthropological Sciences*, 98, 15–26. <https://doi.org/10.4436/jass.98017>
- Johnsen, A., Rindal, E., Ericson, P. G. P., Zuccon, D., Kerr, K. C. R., Stoeckle, M. Y., & Lifjeld, J. T. (2010). DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology*, 151(3), 565–578. <https://doi.org/10.1007/s10336-009-0490-3>
- Jones, M., Ghoorah, A., & Blaxter, M. (2011). jMOTU and Taxonator: Turning DNA Barcode Sequences into Annotated Operational Taxonomic Units. *PLoS ONE*, 6(4), e19259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019259>
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33(11), btx025. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx025>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kim, S., Lee, Y., Mutanen, M., Seung, J., & Lee, S. (2020). High functionality of DNA barcodes and revealed cases of cryptic diversity in Korean curved-horn moths

- (Lepidoptera: Gelechioidea). *Scientific Reports*, 10(1), 6208.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-63385-x>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.
- Koiffmann, C. P., & Saldanha, P. H. (1974). *Cytogenetics of Bradian*. 275–282.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kundu, S., Sharma, G., Balakrishnan, S., Tyagi, K., Chandra, K., & Kumar, V. (2019). DNA barcoding identified two endangered dolphins: threats on living aquatic mammals in India. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(1), 77–80.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1536467>
- Kusukawa, N., Uemori, T., Asada, K., & Kato, I. (1990). Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 9(1), 66-68,70,72. <http://europepmc.org/abstract/MED/2393575>
- Lalronunga, S., Vanramliana, Lalrinchhana, C., Vanlalhrima, Vanlalhrizuala, S., Lalnunhlua, Sailo, L., Zosangliana, I., Lalmangaiha, K., & Lalhmingliani, E. (2020). DNA barcoding reveals a new country record for three species of frogs (Amphibia: Anura) from India. *Science Vision*, 20(3), 106–117.
<https://doi.org/10.33493/scivis.20.03.02>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Lima, M. M. C., & Seuánez, H. N. (1991). Chromosome studies in the red howler monkey, *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): description of an X₁X₂Y₁Y₂/X₁X₁X₂X₂sex-chromosome system and. *Cytogenetic and Genome Research*, 57(2–3), 151–156. <https://doi.org/10.1159/000133135>
- Lopes, U., Galetti, P. M., & Domingues de Freitas, P. (2020). Hidden diversity in *Prochilodus nigricans*: A new genetic lineage within the Tapajós River basin. *PLOS ONE*, 15(8), e0237916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237916>
- Lorenz, J. G., Jackson, W. E., Beck, J. C., & Hanner, R. (2005). The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1869–1877. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1718>

- Machado, C. D. B., Ishizuka, T. K., Freitas, P. D. De, Valiati, V. H., & Galetti, P. M. (2017). DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in Salminus (Characiformes). *Systematics and Biodiversity*, *15*(4), 372–382. <https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1254390>
- Machado, S. (2011). *Filogeografia do bugio ruivo, Alouatta guariba (Primates, Atelidae)*.
- Machado, V. N., Collins, R. A., Ota, R. P., Andrade, M. C., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2018). One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26550-x>
- Mallo, D., & Posada, D. (2016). Multilocus inference of species trees and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1702), 20150335. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0335>
- Mao, Y., Gao, T., Yanagimoto, T., & Xiao, Y. (2011). Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *407*(2), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.002>
- Meiklejohn, K. A., Wallman, J. F., & Dowton, M. (2013). DNA Barcoding Identifies all Immature Life Stages of a Forensically Important Flesh Fly (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences*, *58*(1), 184–187. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02220.x>
- 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 α -globin pseudogene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, *22*(3), 337–344. <https://doi.org/10.1590/S1415-47571999000300009>
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, *3*(12), e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (n.d.). *The CIPRES Science Gateway: A Community Resource for Phylogenetic Analyses*. 11.
- Milton, K., Lozier, J. D., & Lacey, E. A. (2009). Genetic structure of an isolated population of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. *Conservation Genetics*, *10*(2), 347–358.

<https://doi.org/10.1007/s10592-008-9584-3>

- Minhós, T., Wallace, E., Ferreira da Silva, M. J., Sá, R. M., Carmo, M., Barata, A., & Bruford, M. W. (2013). DNA identification of primate bushmeat from urban markets in Guinea-Bissau and its implications for conservation. *Biological Conservation*, *167*, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.07.018>
- Montagna, M., Mereghetti, V., Lencioni, V., & Rossaro, B. (2016). Integrated Taxonomy and DNA Barcoding of Alpine Midges (Diptera: Chironomidae). *PLOS ONE*, *11*(3), e0149673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149673>
- Moritz, C., & Cicero, C. (2004). DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology*, *2*(10), e354. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>
- Mourthe, I., Trindade, R. A., Aguiar, L. M., Trigo, T. C., Bicca-Marques, J. C., & Bonatto, S. L. (2019). Hybridization Between Neotropical Primates with Contrasting Sexual Dichromatism. *International Journal of Primatology*, *40*(1), 99–113. <https://doi.org/10.1007/s10764-017-0011-9>
- Mudry, M. D., Nieves, M., & Steinberg, E. R. (2015a). Cytogenetics of howler monkeys. In *Howler Monkeys* (pp. 85–105). Springer.
- Mudry, M. D., Nieves, M., & Steinberg, E. R. (2015b). *Cytogenetics of Howler Monkeys - Howler Monkeys: Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (M. M. Kowalewski, P. A. Garber, L. Cortés-Ortiz, B. Urbani, & D. Youlatos (eds.); pp. 85–105). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1957-4_4
- Nascimento, F. F., 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. <https://doi.org/10.1159/000080808>
- 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. <https://doi.org/10.1002/ajp.20507>
- Nidiffer, M. D., & Cortés-Ortiz, L. (2015). Intragroup genetic relatedness in two howler monkey species (*Alouatta pigra* and *A. palliata*): Implications for understanding social systems and dispersal. *American Journal of Primatology*, *77*(12), 1333–1345. <https://doi.org/10.1002/ajp.22487>
- Nijman, V., & Aliabadian, M. (2010). Performance of distance-based DNA barcoding

- in the molecular identification of Primates. *Comptes Rendus - Biologies*, 333(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.10.003>
- Oklander, L., & Corach, D. (2013). *Kinship and Dispersal Patterns in Alouatta caraya Inhabiting Continuous and Fragmented Habitats of Argentina* BT - *Primates in Fragments: Complexity and Resilience* (L. K. Marsh & C. A. Chapman (eds.)); pp. 399–412). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8839-2_26
- Oklander, Luciana Ines, Kowalewski, M. M., & Corach, D. (2010). Genetic Consequences of Habitat Fragmentation in Black-and-Gold Howler (*Alouatta caraya*) Populations from Northern Argentina. *International Journal of Primatology*, 31(5), 813–832. <https://doi.org/10.1007/s10764-010-9430-6>
- Oklander, Luciana Inés, Miño, C. I., Fernández, G., Caputo, M., & Corach, D. (2017a). Genetic structure in the southernmost populations of black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) and its conservation implications. *PLoS ONE*, 12(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185867>
- Oklander, Luciana Inés, Miño, C. I., Fernández, G., Caputo, M., & Corach, D. (2017b). Genetic structure in the southernmost populations of black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) and its conservation implications. *PLoS ONE*, 12(10), e0185867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185867>
- Ota, R. P., Machado, V. N., Andrade, M. C., Collins, R. A., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2020). Integrative taxonomy reveals a new species of pacu (Characiformes: Serrasalminidae: Myloplus) from the Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, 18(1), 1–22. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20190112>
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>
- Perelman, P., Johnson, W. E., Roos, C., Seuánez, H. N., Horvath, J. E., Moreira, M. A. M., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumppler, Y., Schneider, M. P. C., Silva, A., O'Brien, S. J., & Pecon-Slattery, J. (2011). A Molecular Phylogeny of Living Primates. *PLoS Genetics*, 7(3), e1001342. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001342>
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., & Saccone, C. (1999). Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 48(4), 427–434. <https://doi.org/10.1007/PL00006487>
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S.,

- Kamoun, S., Sumlin, W. D., & Vogler, A. P. (2006). Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology*, 55(4), 595–609. <https://doi.org/10.1080/10635150600852011>
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10329-021-00959-x>
- Prates, H. M., & Bicca-Marques, J. C. (2008). Age-Sex Analysis of Activity Budget, Diet, and Positional Behavior in *Alouatta caraya* in an Orchard Forest. *International Journal of Primatology*, 29(3), 703–715. <https://doi.org/10.1007/s10764-008-9257-6>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Puillandre, Nicolas, Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609–620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Ramirez, J. L., Birindelli, J. L., Carvalho, D. C., Affonso, P. R. A. M., Venere, P. C., Ortega, H., Carrillo-Avila, M., Rodríguez-Pulido, J. A., & Galetti, P. M. (2017). Revealing Hidden Diversity of the Underestimated Neotropical Ichthyofauna: DNA Barcoding in the Recently Described Genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Frontiers in Genetics*, 8(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00149>
- Ramirez, J. L., Simbine, L., Marques, C. G., Zelada-Mázmela, E., Reyes-Flores, L. E., López, A. S., Gusmão, J., Tavares, C., Galetti, P. M., & Freitas, P. D. (2021). DNA Barcoding of Penaeidae (Decapoda; Crustacea): Non-Distance-Based Species Delimitation of the Most Economically Important Shrimp Family. *Diversity*, 13(10), 460. <https://doi.org/10.3390/d13100460>
- Reid, N. M., & Carstens, B. C. (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-196>

- Richard-Hansen, C., Vié, J.-C., & de Thoisy, B. (2000). Translocation of red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) in French Guiana. *Biological Conservation*, *93*(2), 247–253. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00136-6)
- Roberto, I. J., Bittencourt, P. S., Muniz, F. L., Hernández-Rangel, S. M., Nóbrega, Y. C., Ávila, R. W., Souza, B. C., Alvarez, G., Miranda-Chumacero, G., Campos, Z., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2020). Unexpected but unsurprising lineage diversity within the most widespread Neotropical crocodylian genus *Caiman* (Crocodylia, Alligatoridae). *Systematics and Biodiversity*, *18*(4), 377–395. <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1769222>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rosen, D. E. (1978). Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Systematic Zoology*, *27*(2), 159–188.
- 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* (pp. 21–54). Springer. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-1957-4_2
- Rossini, B. C., Oliveira, C. A. M., Melo, F. A. G. de, Bertaco, V. de A., Astarloa, J. M. D. de, Rosso, J. J., Foresti, F., & Oliveira, C. (2016). Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding. *PLOS ONE*, *11*(12), e0167203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167203>
- 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*. *Phylogeny, Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology and Conservation of the Neotropical Primates*, 395–434.
- 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. <https://doi.org/10.1159/000480502>

- Ruiz-Garcia, M., Escobar-Armel, P., Alvarez, D., Mudry, M., Ascunce, M., Gutierrez-Espeleta, G., & Shostell, J. M. (2007). Genetic variability in four *Alouatta* species measured by means of nine DNA microsatellite markers: Genetic structure and recent bottlenecks. *Folia Primatologica*, 78(2), 73–87.
<https://doi.org/10.1159/000097058>
- Ruiz-García, M., Luengas-Villamil, K., Leguizamon, N., de Thoisy, B., & Gálvez, H. (2015). Molecular phylogenetics and phylogeography of all the Saimiri taxa (Cebidae, Primates) inferred from mt COI and COII gene sequences. *Primates*, 56(2), 145–161. <https://doi.org/10.1007/s10329-014-0452-0>
- Rylands, A. B., Groves, C. P., Mittermeier, R. A., Cortés-Ortiz, L., & Hines, J. J. H. (2006). Taxonomy and Distributions of Mesoamerican Primates. In *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates* (pp. 29–79).
https://doi.org/10.1007/0-387-25872-8_3
- Rylands, A. B., & Mittermeier, R. A. (2009). The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. In P. A. Garber, A. Estrada, J. C. Bicca-Marques, E. W. Heymann, & K. B. Strier (Eds.), *South American Primates* (pp. 23–54). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78705-3_2
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195–209. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00270-X)
- Saccone, C., Gissi, C., Lanave, C., Larizza, A., Pesole, G., & Reyes, A. (2000). Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene*, 261(1), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00484-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00484-4)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular clon. *Filamin and Muscle Development*, 379.
- Schneider, H., & Sampaio, I. (2015). The systematics and evolution of New World primates – A review. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82(PB), 348–357.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.017>
- 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. <https://doi.org/10.1111/btp.12958>
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial

- pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13486–13491. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803076105>
- Srivathsan, A., & Meier, R. (2012). On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28(2), 190–194. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2011.00370.x>
- Steinberg, E., Nieves, M., & Mudry, M. D. (2014). Multiple sex chromosome systems in howler monkeys (Platyrrhini, *Alouatta*). *Comparative Cytogenetics*, 8(1), 43–69. <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v8i1.6716>
- Steinberg, E. R., Cortés-Ortiz, L., Nieves, M., Bolzán, A. D., García-Orduña, F., Hermida-Lagunes, J., Canales-Espinosa, D., & Mudry, M. D. (2008). The karyotype of *Alouatta pigra* (Primates: Platyrrhini): mitotic and meiotic analyses. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(2), 103–109. <https://doi.org/10.1159/000163087>
- Steinberg, E. R. R., Cortés-Ortiz, L., Nieves, M., Bolzán, A. D. D., García-Orduña, F., Hermida-Lagunes, J., Canales-Espinosa, D., & Mudry, M. D. D. (2008). The karyotype of *Alouatta pigra* (Primates: Platyrrhini): mitotic and meiotic analyses. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(2), 103–109. <https://doi.org/10.1159/000163087>
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*, 53(9), 796–797. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0796:TDATBC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0796:TDATBC]2.0.CO;2)
- Tejedor, M. F., Rosenberger, A. L., & Cartelle, C. (2008). Nueva especie de *Alouatta* (Primates, Atelinae) del Pleistoceno Tardío de Bahía, Brasil. *Ameghiniana*, 45(1), 247–251. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-70142008000100018
- Templeton, A. R. (2021). *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley & Sons.
- Terranova, M. S., Lo Brutto, S., Arculeo, M., & Mitton, J. B. (2007). A mitochondrial phylogeography of *Brachidontes variabilis* (Bivalvia: Mytilidae) reveals three cryptic species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(4), 289–298. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2007.00421.x>
- Thorington, R. W., Ruiz, J. C., & Eisenberg, J. F. (1984). A study of a black howling monkey (*Alouatta caraya*) population in northern Argentina. *American Journal of Primatology*, 6(4), 357–366. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350060405>
- Toffoli, D., Hrbek, T., Araújo, M. L. G. de, Almeida, M. P. de, Charvet-Almeida, P., &

- Farias, I. P. (2008). A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1 suppl), 324–336.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200028>
- Torres, O. M., & Leibovici, M. (2001). Caracterización del cariotipo del Mono Aullador Colorado *Alouatta seniculus* que habita en Colombia. *Caldasia*, 23(2), 537–548.
<http://www.jstor.org/stable/43406037>
- Treves, A. (2001). Reproductive consequences of variation in the composition of howler monkey (*Alouatta* spp.) groups. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50(1), 61–71. <https://doi.org/10.1007/s002650100329>
- Tyagi, K., Kumar, V., Singha, D., Chandra, K., Laskar, B. A., Kundu, S., Chakraborty, R., & Chatterjee, S. (2017). DNA Barcoding studies on Thrips in India: Cryptic species and Species complexes. *Scientific Reports*, 7(1), 4898.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05112-7>
- Van Belle, S., & Di Fiore, A. (2022). Dispersal patterns in black howler monkeys (*Alouatta pigra*): Integrating multiyear demographic and molecular data. *Molecular Ecology*, 31(1), 391–406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.16227>
- Van Belle, S., Estrada, A., Strier, K. B., & Di Fiore, A. (2012). Genetic Structure and Kinship Patterns in a Population of Black Howler Monkeys, *Alouatta pigra*, at Palenque National Park, Mexico. *American Journal of Primatology*, 74(10), 948–957. <https://doi.org/10.1002/ajp.22047>
- Viana, M. C., Bonvicino, C. R., Ferreira, J. G., Jerusalinsky, L., & Langguth, A. (2015). Understanding the relationship between *Alouatta ululata* and *Alouatta belzebul* (Primates: Atelidae) based on cytogenetics and molecular. *Oecologia Australis*, 19(1), 173–182.
- 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.
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300028&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Wiemers, M., & Fiedler, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4(1), 8.
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-8>
- Yoo, H. S., Eah, J.-Y., Kim, J. S., Kim, Y.-J., Min, M.-S., Paek, W. K., Lee, H., & Kim,

- C.-B. (2006). DNA barcoding Korean birds. *Molecules and Cells*, 22(3), 323–327.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202861>
- Yunis, E. J., De Caballero, O. M. T., Ramírez, C., & Ramírez Z., E. (1976). Chromosomal Variations in the Primate *Alouatta seniculus seniculus*. *Folia Primatologica*, 25(2–3), 215–224. <https://doi.org/10.1159/000155714>
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6(2), 143–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1997.tb00082.x>
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869–2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>
- Zimkus, B. M., & Schick, S. (2010). Light at the end of the tunnel: insights into the molecular systematics of East African puddle frogs (Anura: Phrynobatrachidae). *Systematics and Biodiversity*, 8(1), 39–47.
<https://doi.org/10.1080/14772000903543004>

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

S1 Tabela 12. Informações da localidade de coleta ou procedência dos táxons de *Alouatta* sequenciados para marcadores COI e/ou *Cyt b* neste trabalho.

| ID genética | Espécie | Subespécie | Procedência | Município | Estado | País | Coletor(es) | Instituição |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------|--------|------|-----------------------------|-------------|
| AB1 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB10 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB11* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha pimental do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB12* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha do meio do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB13 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha da maravilha do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB14 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha da maravilha do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB15 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha da maravilha do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB16 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha do meio do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB17 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Desconhecida | Desconhecida | (PA) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |
| AB18 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Desconhecida | Desconhecida | (PA) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |
| AB19 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Rio Xingu | Altamira | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |
| AB21* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Rio Xingu | Altamira | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |
| AB25 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Rio Xingu | Altamira | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |
| AB26* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Rio Xingu | Altamira | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |

| | | | | | | | | |
|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------|------|----|------------------------|--------------|
| AB27* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Rio Xingu | Altamira | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |
| AB28 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Rio Xingu | Altamira | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |
| AB29 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Rio Xingu | Altamira | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |
| AB30 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem direita do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB31 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem direita do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB32 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB33 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem direita do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB34 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem direita do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB37 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB4 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha da maravilha do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB40* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB42* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB43 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB44 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB45 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB46 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB47 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem direita do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Equipe Naturae/Arcadis | (UFV) |
| AB48 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Sapé | (PB) | BR | | (CPB/ICMBio) |

| | | | | | | | | |
|---------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------|------|----|---------------------|--------------|
| AB49 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Lucena | (PB) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB5 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha da maravilha | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB50** | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Desconhecida | (PB) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB51* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Desconhecida | (PB) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB52 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB53 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB54 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB55** | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB56 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Desconhecida | Marabá | (PA) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AB6* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul</i> | Ilha da maravilha do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB7 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem esquerda do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB8* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem direita do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| AB9 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Margem direita do Rio Xingu | Vitória do Xingu | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| ABD | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>dicolor</i> | UHE Teles Pires | Paranaíta | (MT) | BR | | (CPRJ) |
| ABU1* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>ululata</i> | CETAS | Teresina | (PI) | BR | Lilian Catenacci | (UFPI) |
| ABU2* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>ululata</i> | Parque Zoobotânico de Teresina | Teresina | (PI) | BR | | (CPRJ) |
| ABU3 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>ululata</i> | Parque Zoobotânico de Teresina | Teresina | (PI) | BR | | (CPRJ) |
| ABU4 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>ululata</i> | Desconhecida | Teresina | (PI) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| ABU5* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>ululata</i> | Desconhecida | Campo Maior | (PI) | BR | | (CPB/ICMBio) |

| | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------|------|----|-----------------------------|--------------|
| ABU6* | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>ululata</i> | Igarapé / Ilha Grande do Piauí | Desconhecida | (PI) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| ABDE012** | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>belzebul/dicolor</i> | Ilha pimental do Rio Xingu | Desconhecida | (PA) | BR | Victor Y. Guimarães | (UFV) |
| ACA1* | <i>Alouatta caraya</i> | | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPRJ) |
| ACA10 | <i>Alouatta caraya</i> | | Desconhecida | Desconhecida | (MG) | BR | | (UFMG) |
| ACA12 | <i>Alouatta caraya</i> | | Desconhecida | Icarai de Minas | (MG) | BR | | (UFMG) |
| ACA13 | <i>Alouatta caraya</i> | | Margem esquerda do Rio Teles Pires | Desconhecida | (MT) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| ACA14 | <i>Alouatta caraya</i> | | Margem esquerda do Rio Teles Pires | Desconhecida | (MT) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| ACA15 | <i>Alouatta caraya</i> | | Margem esquerda do Rio Teles Pires | Desconhecida | (MT) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| ACA17 | <i>Alouatta caraya</i> | | Margem esquerda do Rio Teles Pires | Desconhecida | (MT) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| ACA18 | <i>Alouatta caraya</i> | | Margem esquerda do Rio Teles Pires | Desconhecida | (MT) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| ACA19* | <i>Alouatta caraya</i> | | Margem direita do Rio Teles Pires | Desconhecida | (MT) | BR | Victor Y. Guimarães | (UNESP) |
| ACA20* | <i>Alouatta caraya</i> | | Mata da Embrapa | São Carlos | (SP) | BR | Carla Gestich | (UFSCar) |
| ACA21 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE de Peixe Angical | Peixe | (TO) | BR | | (PZMQB) |
| ACA22 | <i>Alouatta caraya</i> | | Desconhecida | Desconhecida | (MT) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |
| ACA23 | <i>Alouatta caraya</i> | | Desconhecida | Desconhecida | (MT) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |
| ACAE1940 | <i>Alouatta</i> sp | | Desconhecida | São Francisco | (MG) | BR | | (UFMG) |
| ACCPB383* | <i>Alouatta</i> sp | | Desconhecida | Desconhecida | (PI) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AG10* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Congonhal | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AG11* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Rio Doce | (MG) | BR | | (UFMG) |

| | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------|------------------|----------------------------|----------------------|------|----|-----------------|----------|
| AG12* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Rio Doce | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AG2* | <i>Alouatta guariba</i> | | Córrego São Sebastião | Manhuaçu | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AG3* | <i>Alouatta guariba</i> | | Arataca | Sem Peixe | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AG5* | <i>Alouatta guariba</i> | | Cascavel | Santa Rita de Caldas | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AG7 | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Borda da Mata | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AG8 | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Bom Repouso | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AG9* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Além Paraíba | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGACLAM1* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | (PARNASO) | Desconhecida | (RJ) | BR | | (CPRJ) |
| AGACLAM11* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Rua Francisco Urtado, 303 | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM13* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Jardim Botânico | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM15* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | (FPZSP) | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM19* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Av. Cursino | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM2* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPRJ) |
| AGACLAM20* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Rua General Erico Caviglia | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM21* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Jardim Botânico | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM22* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Jardim Botânico | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM25* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | (FPZSP) | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM3* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPRJ) |
| AGACLAM4* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Desconhecida | Cabo Frio | (RJ) | BR | | (CPRJ) |
| AGACLAM6* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Desconhecida | Desconhecida | | BR | | (CPRJ) |

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------|------|----|---------------------|--------------|
| AGACLAM8* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | (FPZSP) | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGACLAM9* | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | (FPZSP) | São Paulo | (SP) | BR | Cauê Monticelli | (CECFAU) |
| AGAFUS1* | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | Desconhecida | (SP) | BR | | (FMVZ) |
| AGAFUS2* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Ituverava | (SP) | BR | | (FMVZ) |
| AGAFUS4* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Desconhecida | (SP) | BR | | (FMVZ) |
| AGAFUS5* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Desconhecida | (SP) | BR | | (FMVZ) |
| AGAFUS6* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Desconhecida | (SP) | BR | | (FMVZ) |
| AGAFUS7* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Sorocaba | (SP) | BR | | (FMVZ) |
| AGAFUS8* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Desconhecida | (SP) | BR | | (FMVZ) |
| AGCPB709* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Vitória da Conquista | (BA) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AGCPB724* | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Congonhas do Norte | (MG) | BR | | (CPB/ICMBio) |
| AGE1249* | <i>Alouatta</i> sp | | Desconhecida | Bom Jardim de Minas | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGE1915* | <i>Alouatta</i> sp | | Desconhecida | Desconhecida | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGE352A* | <i>Alouatta</i> sp | | Desconhecida | Santa Rita de Caldas | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGE366* | <i>Alouatta</i> sp | | Córrego do Coqueiro | Abre Campo | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGE395* | <i>Alouatta</i> sp | | Ponte dos Machados | Bom Jesus do Amparo | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGE605* | <i>Alouatta</i> sp | | Fazenda três Barras, BR 267 | Argirita | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGE905* | <i>Alouatta</i> sp | | Desconhecida | Congonhal | (MG) | BR | | (UFMG) |
| AGES3825* | <i>Alouatta guariba</i> | | Estrada Ipanema | Caratinga | (MG) | BR | Leonora Pires Costa | (UFES) |

| | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------------|------|----|------------------------|-------------------|
| AGES3831* | <i>Alouatta guariba</i> | Estrada Ipanema | Caratinga | (MG) | BR | Leonora Pires Costa | (UFES) |
| AGES4418 | <i>Alouatta guariba</i> | Alto São Sebastião | Santa Maria de Jetibá | (ES) | BR | Equipe Projeto Muriqui | (UFES) |
| AGES4422 | <i>Alouatta guariba</i> | Caldeirão São José | Santa Teresa | (ES) | BR | Equipe Projeto Muriqui | (UFES) |
| AGES4426 | <i>Alouatta guariba</i> | Rio Possmoser | Santa Maria de Jetibá | (ES) | BR | Equipe Projeto Muriqui | (UFES) |
| AGES4435 | <i>Alouatta guariba</i> | Nova Lombardia | Santa Teresa | (ES) | BR | Equipe Projeto Muriqui | (UFES) |
| AGES4653 | <i>Alouatta guariba</i> | California | Santa Leopoldina | (ES) | BR | Equipe Projeto Muriqui | (UFES) |
| AM63 | <i>Alouatta macconnelli</i> | Desconhecida | Rorainópolis | (RR) | BR | Fernanda D. Abra | Projeto Reconecta |
| AS1 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS12 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Jarauá | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS13 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Tefé/estrada da EMADE | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS14 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Médio Solimões - Rio Copeá | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS2 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Comunidade Monte Tabor | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS3 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Comunidade Monte Tabor | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS4 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS5* | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS6 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS7* | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS8 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Jarauá | (AM) | BR | | (IDSM) |
| AS9 | <i>Alouatta seniculus</i> | Desconhecida | Jarauá | (AM) | BR | | (IDSM) |

| | | | | | | | | |
|---------------|---------------------------|------------------|--------------|--------------|------|----|-----------------------------|---------|
| ASJ1 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASJ2 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASJ3 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASJ4* | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASJ5 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Tefê | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASJ6 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Tefê | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASJ7 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Tefê | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASJ8 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>juara</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AM) | BR | | (IDSM) |
| ASP1 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>puruensis</i> | Desconhecida | Desconhecida | (RO) | BR | | (PZMQB) |
| ASP2** | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>puruensis</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AC) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |
| ASP3 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>puruensis</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AC) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |
| ASP4 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>puruensis</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AC) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |
| ASP5 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>puruensis</i> | Desconhecida | Desconhecida | (AC) | BR | Filipe Reis e Zuryp Marques | (FJZB) |

* **Indivíduos analisados apenas pelo marcador Cyt b**

** **Indivíduos analisados apenas pelo marcador COI**

Abreviações: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CPB/ICMBio), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSM), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Conservação de Fauna Silvestre do Estado de São Paulo (CECFAU), Fundação Zoológico de São Paulo (FZSP), Fundação jardim zoológico de Brasília (FJZB).

S2 Tabela 13. Lista das sequências obtidas no banco de dados que foram incluídas nas análises de delimitação de espécies do *Cyt b* e do COI. Descrição por marcador molecular incluindo a identificação utilizada nas análises genéticas, número de acesso GenBank, táxons, localidade e referência bibliográfica responsável pelo depósito das sequências.

| Citocromo b (<i>Cyt b</i>) | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------|---|---------------|-------------|--------------------------|
| ID GENBANK | Espécie | Subespécie | Procedência | Estado | País | Referência |
| AY374357.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374358.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374359.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374360.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374361.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374362.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374363.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374364.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374365.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374366.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374367.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374368.2 | <i>Alouatta caraya</i> | | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |

| | | | | | |
|------------|------------------------|---|------|----|--------------------------|
| AY374369.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374370.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374371.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Manso, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374372.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Manso, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374373.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374374.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374375.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374376.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Ribeirão Palmeiras | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374377.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Ribeirão Palmeiras | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374378.2 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Manso, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| DQ350622.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350623.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350624.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350625.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350626.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350627.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350628.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |

| | | | | | |
|------------|-------------------------|---|------|---------|----------------------------|
| DQ350629.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350630.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350631.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350632.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350633.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350634.1 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350635.1 | <i>Alouatta caraya</i> | Serra da Mesa | (GO) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350636.1 | <i>Alouatta caraya</i> | Serra da Mesa | (GO) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| DQ350637.1 | <i>Alouatta caraya</i> | Padre Bernardo | (GO) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| KT626649.1 | <i>Alouatta caraya</i> | Desconhecida | - | BR | Castilho et al. (2016) |
| KU253513.1 | <i>Alouatta caraya</i> | Desconhecida | - | BR | Castilho et al. (2016) |
| AY065890 | <i>Alouatta caraya</i> | Santa Cruz | - | Bolívia | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065891 | <i>Alouatta caraya</i> | Santa Cruz | - | Bolívia | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| DQ924861 | <i>Alouatta caraya</i> | Desconhecida | - | - | Ascunce et al. (2007) |
| AF289519 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Casca, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Nascimento et al. (2007) |
| AF289516 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE do Manso, Rio Quilombo, Chapada dos Guimarães | (MT) | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AF289517 | <i>Alouatta caraya</i> | Desconhecida | - | - | Bonvicino et al. (2001) |
| AF289518 | <i>Alouatta caraya</i> | UHE Serra da Mesa | (GO) | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AF289986.1 | <i>Alouatta guariba</i> | Desconhecida | - | - | Bonvicino et al. (2001) |

| | | | | | | |
|------------|-------------------------|------------------|-----------------------------|------|----|-------------------------|
| AF289987.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | - | - | Bonvicino et al. (2001) |
| DQ679770.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Poço das Antas | (RJ) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679771.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Seropedica | (RJ) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679772.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Reserva Florestal, Campinas | (SP) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679773.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679774.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679775.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679777.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Blumenau | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679778.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Brusque | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679779.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Jaraguá do Sul | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679780.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Indial | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679781.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | São Bento de Sul | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679782.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Blumenau | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679783.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Indial | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| DQ679784.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Lages | (SC) | BR | Harris et al. (2005) |
| HQ385483.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385484.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385485.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385486.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385487.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385488.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Martins et al. (2011) |

| | | | | | | |
|------------|--------------------------|------------------|---|------|----|----------------------------|
| HQ385489.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Serra da Cantareira | (SP) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385490.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Blumenau | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385491.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Blumenau | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385492.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Rodeio | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385494.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | São Bento do Sul | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385495.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Gaspar | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385496.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Blumenau | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385497.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Jaragua do Sul | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385498.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Ibirama | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385499.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Massaranduba | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385500.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Pomerode | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| HQ385501.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Jaragua do Sul | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| KR528422.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Desconhecida | (SC) | BR | Muniz et al. (2015) |
| AY065898 | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | (RJ) | BR | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| HQ385493 | <i>Alouatta guariba</i> | | Município de Rodeio | (SC) | BR | Martins et al. (2011) |
| AF289511.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | | UHE Tucuruí | (PA) | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AF289512.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | | UHE Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| AF289513.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | | UHE Tucuruí | (PA) | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AF289514.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | | UHE Tucuruí | (PA) | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AF289515.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Sapé | (PB) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374341.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |

| | | | | | |
|------------|--------------------------|---|------|----|--------------------------|
| AY374342.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374343.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374344.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374345.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374346.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374347.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374348.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374349.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374350.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374351.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374352.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374353.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374354.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374355.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| AY374356.2 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2005) |
| DQ387004.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387005.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387006.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387007.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387008.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387009.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |

| | | | | | |
|------------|--------------------------|---|-----------|----|----------------------------|
| DQ387031.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387032.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387033.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387034.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387035.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387036.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387037.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387038.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387039.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387040.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387041.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387042.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387043.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Margem esquerda do Rio Tocantins, Tucuruí | (PA) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ387044.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Desconhecida | (PB) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ398006.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Sapé | (PB) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ398007.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Sapé | (PB) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ398008.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Sapé | (PB) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| DQ398009.1 | <i>Alouatta belzebul</i> | Sapé | (PB) | BR | Nascimento et al. (2008) |
| AY065892 | <i>Alouatta belzebul</i> | Pacatuba ou Rio Tocantins | (PB)/(PA) | BR | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065893 | <i>Alouatta belzebul</i> | Pacatuba ou Rio Tocantins | (PB)/(PA) | BR | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065894 | <i>Alouatta belzebul</i> | Pacatuba ou Rio Tocantins | (PB)/(PA) | BR | Cortés-Ortiz et al. (2003) |

| | | | | | | |
|----------|--------------------------|-----------------|--|-----------|----|----------------------------|
| AY065895 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Pacatuba ou Rio Tocantins | (PB)/(PA) | BR | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065896 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Pacatuba ou Rio Tocantins | (PB)/(PA) | BR | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065897 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Pacatuba ou Rio Tocantins | (PB)/(PA) | BR | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| MW958308 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Altamira - margem direita do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958298 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Altamira - margem direita do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958301 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Altamira - margem direita do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958300 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Altamira - margem direita do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958304 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>discolor</i> | margem esquerda Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958305 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Altamira - margem direita do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958319 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958322 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958321 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958320 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958316 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958315 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958317 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958318 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958307 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Altamira, margem direita do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958309 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Altamira, margem direita do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958312 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958313 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |

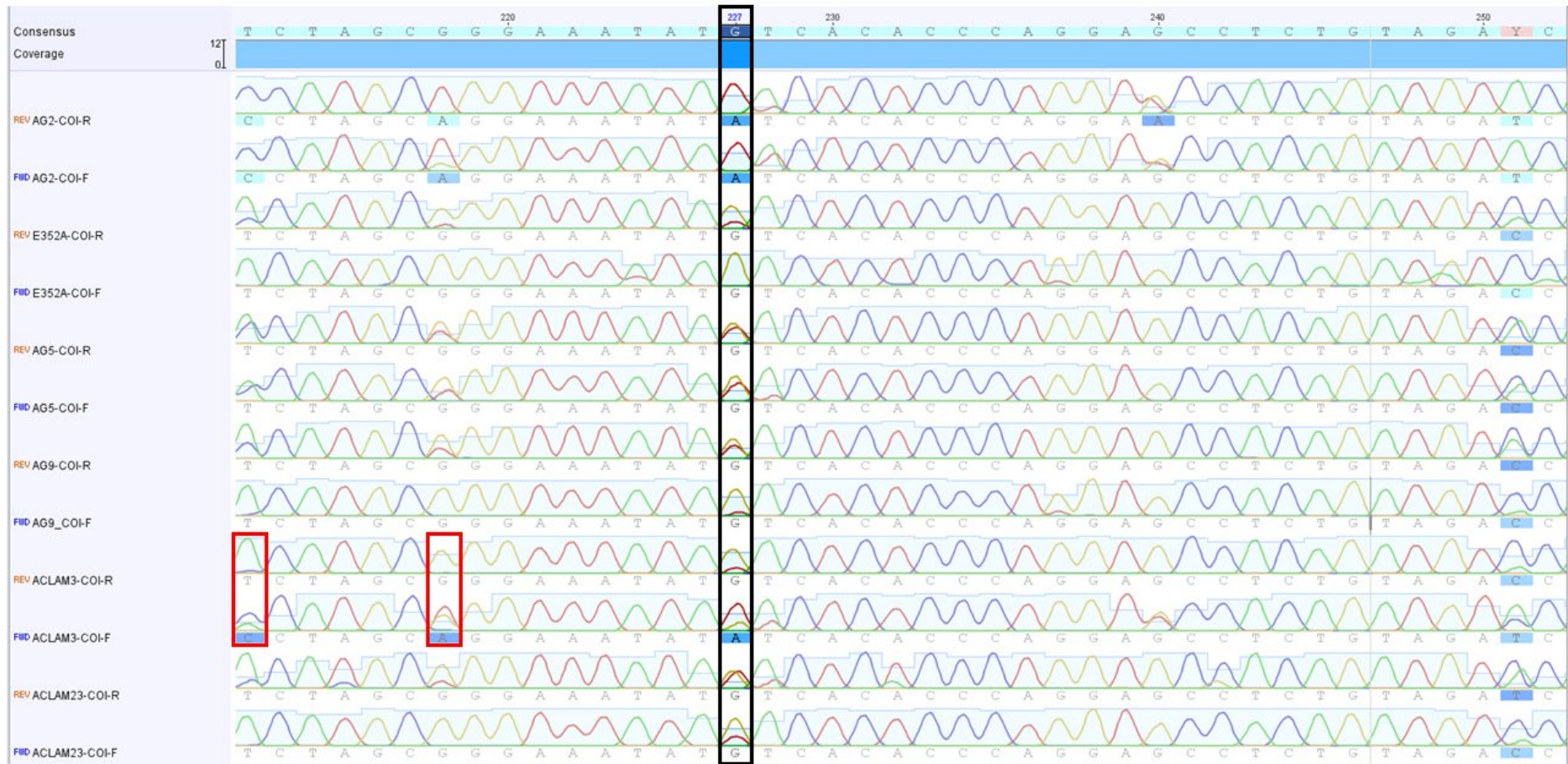
| | | | | | | |
|------------|-----------------------------|--------------------|---|------|-----------------|----------------------------|
| MW958314 | <i>Alouatta belzebul</i> | | Tucuruí, oeste do rio Tocantins | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958286 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>discolor</i> | margem esquerda do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958276 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>discolor</i> | margem esquerda do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958272 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>discolor</i> | margem esquerda do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958274 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>discolor</i> | margem esquerda do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958269 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>discolor</i> | margem esquerda do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| MW958257 | <i>Alouatta belzebul</i> | <i>discolor</i> | margem esquerda do Rio Xingu | (PA) | BR | Povill et al. (2022) |
| AF289982.1 | <i>Alouatta seniculus</i> | | Ilhas Candiru e Maniva, Rio Negro, Barcelos | (AM) | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AF289984.1 | <i>Alouatta macconnelli</i> | | Rio Jari | (AM) | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AJ489759.1 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>macconnelli</i> | Desconhecida | - | Guiana Francesa | Lavergne A, et al. (2010) |
| EU232713.1 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>macconnelli</i> | Desconhecida | - | Guiana Francesa | Lavergne A, et al. (2010) |
| KR902387.1 | <i>Alouatta seniculus</i> | | Zoológico | - | Peru | Gherzi et al. (2015) |
| AY065886.1 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>seniculus</i> | Desconhecida | - | Colombia | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| HQ644333 | <i>Alouatta seniculus</i> | <i>seniculus</i> | Desconhecida | - | BR | Di Fiore et al. (2010) |
| AY065887 | <i>Alouatta sara</i> | | Desconhecida | - | Bolívia | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AF289985.1 | <i>Alouatta nigerrima</i> | | Desconhecida | - | BR | Bonvicino et al. (2001) |
| AY065878.1 | <i>Alouatta palliata</i> | <i>mexicana</i> | Desconhecida | - | México | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065879.1 | <i>Alouatta palliata</i> | <i>mexicana</i> | Desconhecida | - | México | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065880.1 | <i>Alouatta palliata</i> | <i>palliata</i> | Desconhecida | - | Costa Rica | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065881.1 | <i>Alouatta palliata</i> | <i>coibensis</i> | Desconhecida | - | Panamá | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065882.1 | <i>Alouatta palliata</i> | <i>trabeata</i> | Desconhecida | - | Panamá | Cortés-Ortiz et al. (2003) |

| | | | | | |
|------------|--|--------------|---|-----------|----------------------------|
| AY065883.1 | <i>Alouatta palliata aequatorialis</i> | Desconhecida | - | Panamá | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065884.1 | <i>Alouatta pigra</i> | Desconhecida | - | México | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| AY065885.1 | <i>Alouatta pigra</i> | Desconhecida | - | México | Cortés-Ortiz et al. (2003) |
| MN046904 | <i>Alouatta caraya</i> | Desconhecida | - | Argentina | Torosin et al. (2020) |

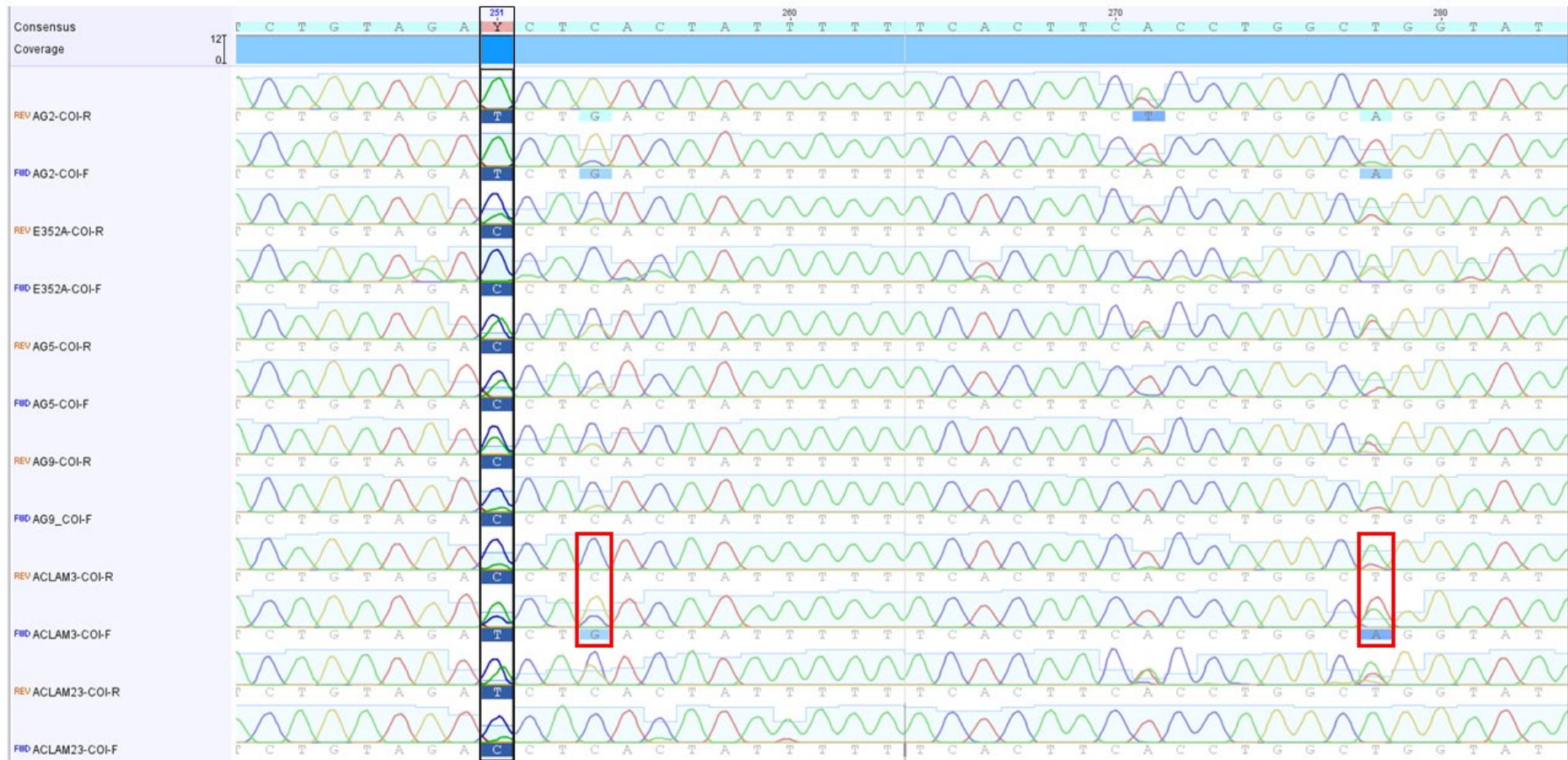
(Continua...)

Citocromo Oxidase subunidade 1 (COI)

| ID GENBANK | Espécie | Subespécie | País | Referência |
|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------|------------------------|
| MN046907 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235783 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235784 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235785 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235786 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235787 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235788 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235789 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235790 | <i>Alouatta caraya</i> | | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235781.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN235782.1 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN045881 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| MN045882 | <i>Alouatta guariba</i> | <i>clamitans</i> | Argentina | Torosin et al. (2020) |
| KY202428.1 | <i>Alouatta guariba</i> | | Desconhecida | Junior et al. (2017) |
| HQ644333 | <i>Alouatta seniculus</i> | | Desconhecida | Di Fiore et al. (2016) |



Material Suplementar S3 Figura 16. Eletroferograma do gene COI para indivíduos da espécie *Aouatta guariba* mostrando a sobreposição de picos (A-G e C-T). Destacado em preto, o sítio 227 apresentou sobreposição de picos para vários indivíduos em ambas as sequências (F e R) ou para pelo menos uma delas. Destacado em vermelho, as sequências F e R de um mesmo indivíduo apresentaram picos de nucleotídeos diferentes entre si.



Material Suplementar S3 Figura 17. Eletroferograma do gene COI para indivíduos da espécie *Alouatta guariba* mostrando a sobreposição de picos (A-G e C-T). Destacado em preto, o sítio 251 apresentou sobreposição de picos para vários indivíduos em ambas as sequências (F e R) ou para pelo menos uma delas. Destacado em vermelho, as sequências F e R de um mesmo indivíduo apresentaram picos de nucleotídeos diferentes entre si.

Material Suplementar S5 Tabela 14. Abordagens de delimitação de espécies do gene COI e *Cyt b* que recuperaram as MOTUs consenso dentro do gênero *Alouatta* e quais táxons, com representantes de quais localidades foram incluídos em cada dessas unidades moleculares.

| MOTUs consenso | Análises COI | Análises <i>Cyt b</i> | Nº de abordagens recuperaram a MOTU/ Nº total | Táxons | Localidades |
|----------------|---------------------------|---------------------------|---|---|--|
| pigra | | TO, ASAP, PTP, bPTP, GMYC | (5/5) | <i>A. pigra</i> | México |
| palliata | | TO, ASAP, PTP | (3/5) | <i>A. palliata palliata</i> , <i>A. p. mexicana</i> , <i>A. p. trabeata</i> , <i>A. p. coibensis</i> , <i>A. p. aequatorialis</i> | México, Panamá e Costa Rica |
| seniculus 1 | OT, ASAP, PTP, bPTP, GMYC | TO, ASAP, PTP, bPTP, GMYC | (10/10) | <i>A. sara</i> , <i>A. seniculus</i> , <i>A. seniculus puruensis</i> | Bolívia, Peru e Brasil (AC e RO) |
| seniculus 2 | OT, ASAP, PTP, bPTP, GMYC | TO, ASAP, PTP, bPTP | (9/10) | <i>A. seniculus</i> , <i>A. s. juara</i> | Colômbia e Brasil (AM) |
| macconnelli | OT, ASAP, PTP, bPTP, GMYC | TO, ASAP, PTP | (8/10) | <i>A. macconnelli</i> , <i>A. nigerrima</i> | Guiana Francesa e Brasil (AM) |
| caraya | OT, ASAP, PTP, bPTP, GMYC | TO, ASAP, PTP | (8/10) | <i>A. caraya</i> | Bolívia, Brasil (MG, GO, PI, SP, MT, TO) |
| guariba 1 | ASAP, PTP, GMYC | PTP, bPTP | (5/10) | <i>A. g. clamitans</i> | Brasil (RJ, SC, SP, noroeste MG) |
| guariba 2 | ASAP, PTP, bPTP, GMYC | PTP, bPTP | (6/10) | <i>A. g. guariba</i> | Brasil (BA, ES, SP, sul e noroeste de MG) |
| guariba 3 | ASAP, GMYC | TO, PTP, bPTP | (5/10) | <i>A. g. clamitans</i> | Brasil (SC e SP) |
| belzebul 1 | OT, ASAP, PTP | PTP, bPTP | (5/10) | <i>A. belzebul discolor</i> | Brasil (margem esquerda do rio Xingu, PA) |
| belzebul 2 | OT, ASAP, PTP | PTP, bPTP | (5/10) | <i>A. belzebul</i> , <i>A. b. ululata</i> | Brasil (PI, PB e margem direita do rio Xingu e margem esquerda e direita do rio Tocantins, PA) |

Abreviações dos estados brasileiros: Acre (AC), Rondônia (RO), Amazonas (AM), Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Piauí (PI), São Paulo (SP), Mato Grosso (MT), Tocantins (TO), Rio de Janeiro (RJ), Santa Catarina (SC), Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Pará (PA), Paraíba (PB)



Material Suplementar S4 Figura 18. Árvore *Neighbour-Joining* (NJ) para o íntron NPAS3.2 apresentando ramos com politomias não distinguindo as diferentes espécies de *Alouatta* (*A. s. juara*, *A. seniculus*, *A. belzebul*, *A. g. clamitans*, *A. caraya*, *A. sara* e *A. palliata*).