

Aportes citogenéticos en el esclarecimiento de la taxonomía del género *Callicebus*

Citogenetical approach to clarify the taxonomy of the genus *Callicebus*

Marta L. Bueno¹, Thomas R. Defler²

¹ Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología-Instituto de Genética, Sede Bogotá.
Email: mlbuena@unal.edu.co

² Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología-Director Reserva OME-Amazonas
Email: thomasdefler@gmail.com

RESUMEN

Los *Callicebus* son primates de tamaño pequeño (800-1.200 g), ampliamente distribuidos en Suramérica. La taxonomía del género ha sido discutida por varios autores. Recientemente Defler (2004), basado en el trabajo de Hershkovitz (1990), reconoce para Colombia dos grupos de especies, *Callicebus cupreus* y *Callicebus torquatus*, con varias subespecies.

Dada la alta variabilidad cariotípica en el género, los cariotipos constituyen un carácter sistemático importante. Amplias diferencias en los números cromosómicos, están bien correlacionadas con los grupos de especies descritos para el género basados en caracteres morfológicos y biogeográficos.

Es característico de las especies del Grupo *cupreus*, números cromosómicos altos $2n=44$, para *C.c. ornatus* y $2n=46$ en *C.c. discolor* y *C.c. caquetensis*, en tanto que las especies del grupo *torquatus* presentan números bajos ($2n=16$) para *C.t. lugens* y $2n=20$ en *C.t. lucifer*, *C.t. torquatus* y posiblemente *C.t. mendemi*, especie muy poco conocida y aun no estudiada genéticamente.

Basados en nuestros hallazgos citogenéticos en cultivos celulares de sangre periférica de 11 ejemplares de diferentes poblaciones de *Callicebus*, encontramos que los estudios cromosómicos son concordantes con los grupos y permiten diferenciar *C. ornatus* y *C. discolor* como especies independientes dentro del grupo *cupreus*. En el grupo *torquatus*, no se encontraron diferencias cromosómicas en ejemplares del trapecio amazónico *C.t. lucifer* y un ejemplar de fenotipo "*lugens*" de Florencia, Caquetá ($2n=20$), ampliando la distribución de esta especie en el territorio colombiano. Aunque inicialmente, se sostuvo que *C. lugens* ($2n=16$) no estaba presente en Colombia, el hallazgo de un ejemplar en el Zoológico de Matecaña, sugiere fuertemente la presencia de esta especie en la cuenca colombiana del Orinoco, aunque esto debe ser confirmado mediante estudios de campo.

Se discute el proceso de evolución cromosómica en los procesos de especiación en este género de primates, monógamos y territoriales, y se proponen algunas hipótesis sobre los procesos de especiación en este grupo.

Palabras Clave: Cariotipo, Evolución cromosómica, *Callicebus*, Cito taxonomía, Colombia.

ABSTRACT

The *Callicebus* are small primates (800-1,200 g) amply distributed in South America. The taxonomy of the genus has been discussed by various authors. Recently Defler (2004), based on work by Hershkovitz (1990) recognized two groups of species in Colombia: *Callicebus cupreus* and *Callicebus torquatus*.

Because of high karyotypic variability in the genus, karyotypes constitute an important systematic character. Wide differences in chromosome number are well-correlated with species groups that have been described for the genus based on morphological and biogeographical characteristics.

Characteristic of the species in the *cupreus* group are high chromosome numbers ($2n=44$ for *C. c. ornatus* and $2n=46$ for *C. c. discolor* and *C. c. caquetensis*). In contrast, the *C. torquatus* species group has low chromosome numbers ($2n=16$ for *C. lugens* and $2n=20$ for *Callicebus torquatus* and *C. t. lucifer* and possibly *C. t. medemi* which has not yet been studied genetically).

Based on our cytogenetic finds from cell cultures from 11 specimens from different populations of *Callicebus*, we have found that our karyological data are concordant with the species groups and permit us to differentiate *C. ornatus*, *C. caquetensis* and *C. discolor* as independent species in the *cupreus* group. In the *torquatus* group there were no detectable differences between a "*lugens*" phenotype from Florencia, Caquetá and a *C. t. lucifer* from the Colombian trapezium (both were $2n=20$), increasing the distribution of the species with that karyotype in the Colombian Amazon.

Although initially we supposed that *C. lugens* ($2n=16$) was not present in the Colombian Amazon, the discovery of a *C. lugens* ($2n=16$) in the Matacaña Zoo strongly suggests the presence of this species in the Colombian Orinoco, although this must be confirmed with field studies.

Based on our results a discussion of the evolutionary process in chromosomes is presented for this monogamous, territorial primate genus and some hypotheses regarding the evolution of this group are proposed.

Key Words: karyotype, chromosome evolution, *Callicebus*, cytotaxonomy.

INTRODUCCIÓN

La taxonomía del género *Callicebus* fue inicialmente definida en base a criterios morfológicos y biogeográficos sin tener en cuenta que en los primates Neotropicales existe gran variabilidad genética en las poblaciones, acompañada de fenotipos muy similares, con polimorfismos intra-poblacionales tanto fenotípicos como genéticos, por

lo que basar la diferenciación específica únicamente en pequeñas diferencias fenotípicas no es evidencia suficiente para definir las de especie y/o subespecies.

El concepto de especie basado en criterios morfológicos, biogeográficos y genéticos es

fundamental en la teoría evolutiva, en la determinación de Unidades evolutivas significativas (ESU) y en la estimación del valor de Conservación de una población. Esto es indispensable para desarrollar estrategias y políticas en la conservación. (Ryde, 1986; Pearman, 2001; Fraser y Bernatchez, 2005).

Dobzhansky (1937) define el concepto de especies biológicas como el estado en el proceso evolutivo en el cual una población reproductiva se divide en varios grupos que son fisiológicamente incapaces de cruzarse entre sí, por la presencia de "barreras reproductivas" entre ellos. Mayr (1963, 1970, 1982, 1997, 2001, 2004) y Dobzhansky (1937) acogieron y difundieron el "concepto biológico", actualmente ampliamente aceptado entre los biólogos basado en el reconocimiento de especies, como entidades poblacionales, que se inter-cruzan. En este aspecto, los cambios en estructura y número cromosómicos en las poblaciones (Navarro y Barton, 2003; Rieseberg, 2001), constituyen sin duda una barrera fisiológica reproductiva por incompatibilidad en meiosis. (Forsdyke, 2004).

El complejo *Callicebus torquatus*. Hershkovitz (1990) realiza completa revisión del género *Callicebus*, con una clave con caracteres diagnósticos para 32 taxones entre los que incluyen los números cromosómicos descritos para *Callicebus* hasta 1990, que muestran una diferencia clara entre los dos grandes grupos: *torquatus* con número muy reducido de cromosomas ($2n = 20$ y el número más bajo conocido en esa fecha entre todos los primates), y las subespecies del grupo *cupreus* con números cromosómicos más altos ($2n = 46-50$). Diferencia 15 especies y 17 subespecies, seis de éstas como subespecies de *C. torquatus* (*C. t. lucifer*, *C. t. lugens*, *C. t. medemi*, *C. t. purinus*, *C. t. regulus* y *C. t. torquatus*). El descubrimiento de un cariotipo muy reducido ($2n=16$) en una población brasilera al este del Río Negro, el cual es el número cromosómico más bajo hasta ahora registrado en primates (Stanyon *et al.*, 2003; Bonvicino *et al.*, 2003), en ejemplares muy cerca de la localidad tipo de *Callicebus lugens*, asignan esta característica inequívoca a esta especie que es claramente diferenciable cariológicamente de los otros

taxa del complejo *torquatus* con complementos cromosómicos de 20-22 cromosomas y es sin duda a una especie diferente.

Van Roosmalen *et al.*, (2002), con un enfoque completamente diferente del "concepto biológico de especie" usado por Hershkovitz (1990), realizan cambios radicales en la taxonomía del género, eliminando todas las subespecies, a las que elevan a especies y con la descripción de dos especies nuevas, reconociendo 28 especies en el género *Callicebus*. Aunque estos autores no son explícitos, utilizan "el concepto filogénico" para distinguir las especies, un concepto operacional que actualmente Groves (2001) y otros primatólogos están defendiendo.

En la tabla 1, se presenta la amplia variación cariológica en el género *Callicebus* ($2n$ entre 16 hasta 50). Actualmente los cariotipos constituyen uno de los argumentos de mayor peso en la taxonomía del grupo y han incidido notablemente en la tendencia actual de elevar las subespecies a nivel de especie. Bueno *et al.* 2006, emplean argumentos citogenéticos para diferenciar *Callicebus ornatus* de *Callicebus discolor* como especies biológicas con barreras reproductivas

Bueno *et al.*, 2006, encuentran en ejemplares cautivos colombianos, identificadas como *Callicebus t. lugens*, por fenotipo y distribución de acuerdo con Defler (2003, 2004), el cariotipo $2n = 20$, muy similar al publicado previamente para *Callicebus torquatus* (Benirschke y Bogart, 1976) pero difiere indudablemente del cariotipo descrito para los *C. lugens* en los márgenes norte y sur del río Negro en la amazonia brasilera (Bonvicino *et al.*, 2003; Stanyon *et al.*, 2003; Casado *et al.*, 2006).

Esta evidencia revela un problema taxonómico pues lo que se ha considerado *lugens* en Colombia, teniendo en cuenta la revisión del género de Hershkovitz (1990), las observaciones en campo (Palacios y Rodríguez 1995, Defler *et al.* 2003), las colecciones de pieles dentro de nuestros museos, la distribución propuesta en Defler (2003) y los cariotipos de ejemplares de fenotipo "*lugens*" (Bueno *et al.*, 2006), evidentemente no pertenecen al taxon *Callicebus lugens* ($2n=16$). Sin embargo el descubrimiento de un ejemplar de *C. lugens* ($2n = 16$), sin procedencia registrada sugiere

Tabla 1. Variación cromosómica publicada para el género *Callicebus* (organizada en orden ascendente de número cromosómico)

Posible nombre del taxón (<i>sensu</i> Hershkovitz, 1990)	2n	Cariotipo				Autor	Taxón referido en la publicación
		Autosomas		Cromosomas Sexuales			
		M+S*	A**	X	Y		
<i>C. torquatus lugens</i>	16	8	6	M	?	Bonvicino <i>et al.</i> , 2003; Stanyon <i>et al.</i> , 2003	<i>C. lugens</i>
<i>C. torquatus lugens</i>	16	8	6	S	A	presente reporte	<i>C. lugens</i>
<i>C. torquatus torquatus</i>	20	8	10	S	?	Egozcuc, 1969	<i>C. torquatus torquatus</i>
<i>C. torquatus torquatus</i>	20	8	10	S	?	Benirschke y Bogart, 1976	<i>C. torquatus torquatus</i>
<i>C. torquatus lucifer</i>	20	8	10	S	?	Bueno y Defler 2009	<i>C. torquatus lucifer</i>
<i>C. torquatus</i> ssp	20	8	10	S	?	Bueno <i>et al.</i> , 2006	<i>C. torquatus</i>
<i>C. torquatus</i> ssp	22	8	12	M	?	Barros <i>et al.</i> , 2000	<i>C. torquatus</i>
<i>C. personatus nigrifrons</i>	42	28	12	S	M	Nagamachi <i>et al.</i> , 2003	<i>C. personatus nigrifrons</i>
<i>C. personatus</i> ssp	44	26	16	S	?	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004	<i>C. personatus</i>
<i>C. cupreus ornatus</i>	44	16	26	M	M	Bueno <i>et al.</i> , 2006	<i>C. cupreus ornatus</i>
<i>C. cupreus</i>	46	16	26	S	A	Bigoni y Stanyon, 2006	<i>C. cupreus</i>
<i>C. caquetensis</i>	46	14	30	S	?	Defler y Bueno, 2010	<i>C. caquetensis</i>
<i>C. cupreus</i> cf <i>discolor</i>	46	16	28	M	M	Bueno <i>et al.</i> , 2006	<i>C. cupreus</i> cf <i>discolor</i>
<i>C. moloch?</i> <i>C. cupreus?</i>	46	20	24	M	?	Bernischke y Bogart, 1976; De Boer, 1974; Egozcuc, 1969	<i>C. moloch cupreus</i>
<i>C. brunneus</i>	48	20	28	S	M	Minezawa <i>et al.</i> , 1989	<i>C. moloch brunneus</i>
<i>C. donacophilus pallescens</i>	50	18	30	S	M	Barros <i>et al.</i> , 2003	<i>C. donacophilus pallescens</i>
<i>C. donacophilus</i>	50	22	26	S	M	Minezawa y Valdivia-Borda, 1984	<i>C. moloch donacophilus</i>

la presencia de esta especie en la Orinoquia Colombiana.

Es necesario reevaluar la distribución geográfica de *C. lugens* (Humboldt 1811) y *C. t. mendemi*, que al parecer no difiere mucho de *C. t. lucifer*, no hay barreras geográficas en la distribución y la diferenciación morfológica está basada en el patrón de color de las manos, es decir no presenta diferencias en un grado

mayor que el observado en las otras subespecies, por lo que no es posible aun distinguirla como especie usando un concepto biológico (Defler, 2003). Por lo tanto hasta no caracterizar cito- genéticamente las poblaciones de *Callicebus* de la Orinoquia y Amazonía colombiana formando posiblemente por complejos de especies crípticas, aún no completamente estudiados, no es posible esclarecer la sistemática de este grupo.

El complejo *Callicebus cupreus*. En Colombia se encuentran tres formas nominales del Grupo *cupeus* números cromosómicos altos $2n=44$, para *C.c.ornatus*, y $2n=46$ en *C.c. discolor*, *C caquetensis*, reconocidas como subespecies (Defler, 2003; Hershkovitz, 1963, 1990) pero, basado en trabajo en los últimos años de nuestro laboratorio, como especies por Defler (2010) y como especies por van Roosmalen *et al.*, (2002). Una tercera especie endémica de este complejo para el país, fue descrita recientemente para el Caquetá (*Callicebus caquetensis*, Defler *et al*, 2010), cariologicamente similar al cariotipo de *Callicebus*

cupreus de Bigoni y Stanyon en O'Brien *et al.* (2006:125). Este grupo está muy ligado al piedemonte andino, en la región oriental, por lo cual se encuentra sometido a una gran presión antropogénica, por el avance de la colonización de esta área, que viene acompañada de una extensa tasa de tala y reducción del hábitat a pequeñas manchas de bosque aisladas. Por lo que *Callicebus ornatus* y *Callicebus discolor* pueden ser consideradas como EN (en peligro). (Defler, 2003; Rodríguez *et al*, 2006) y CR (críticamente amenazada) para *Callicebus caquetensis* (Defler *et al.* 2010).

METODOLOGÍA

Durante los últimos años hemos estudiado tanto desde el punto de vista fenotípico como cariológico 11 ejemplares (8 hembras y 3 machos) del género *Callicebus* en el laboratorio de cariología del Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Los ejemplares fueron muestreados a partir de las colecciones vivas que se encuentran en los Zoológicos de Pereira, Matecaña, Bioparque los Ocarros, Pisilago; ejemplares decomisados por CARs, que se encontraban con secuestres como el ejemplar de Corpoamazonía en la ciudad de Florencia (Caquetá), o en Centros de Rescate de fauna en Bogotá (URRAS-Universidad Nacional y Centro de Rescate de fauna, DAMA, Engativá). Dos ejemplares fueron colectados en campo. (Tabla 2)

Para la toma de muestra sanguínea requerida para los estudios cariológicos, los ejemplares fueron sedados con Ketamina-Xilacina y se extrajeron 2- 2.5 ml de sangre de la vena femoral con una jeringa de 3 ml empleando como anticoagulante 0.01 ml de Lique mine (ROCHE). Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio de Citogenética del

Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, en Bogotá. Se realizaron dos cultivos de linfocitos siguiendo el protocolo clásico de Moorhead *et al.*, 1960, modificado por nosotros con el uso de extracto crudo de favina (lectina extraída del haba *Vicia faba*, a una concentración final entre 5-20 $\mu\text{g/ml}$ para 0.04 ml de sangre) como mitógeno. En los cromosomas obtenidos fueron evaluados los patrones de bandas; GTG (Seabright, 1971); CBG (Arrighi y Hsu 1971; Sumner 1972) y NOR (Goodpasture y Bloom 1975; Howell y Black, 1980). Adicionalmente, cuando la muestra lo permitió, se realizaron cultivos para Bandas de replicación tardía (RBH-FPG) con pulso terminal de BrUd (50 $\mu\text{g/ml}$) en las últimas 7 horas de cultivo (Willard y Latt, 1976). En las láminas obtenidas se aplicaron las técnicas de bandeado para identificación cromosómica RBHG-FPG (Goto *et al.*, 1975)

Imágenes digitales y en fotografía de papel fueron tomadas empleando un foto-microscopio Zeiss, Axophot y para la elaboración de los cariotipos el programa Lucia (Software Lucia Karyotyping, Laboratory Imagin Ltd).

RESULTADOS

Grupo *torquatus*

Se estudiaron cuatro ejemplares, de los cuales solo dos tienen localidad conocida. (Tabla 2).

Una hembra, adulta, estudiada en 1997, remitida como *Callicebus torquatus* por el zoológico de

Pereira, de la que no se tiene datos fenotípicos ni existe un espécimen de referencia, una hembra adulta estudiada en el 2004, que presentó un fenotipo concordante con los caracteres diagnósticos de *C. lugens* (fig.1) de acuerdo con

Tabla 2. Ejemplares estudiados del genero *Callicebus*

Grupo torquatus					
Procedencia	Determinacion		Sexo	2n=	Nº Ejemplares
Zoologico de pereira	<i>C. torquatus</i>	ND	H	20	1
Muestra en campo	<i>C. torquatus lucifer</i>	Macedonia, Amazonas	H	20	1
Corpoamazonia- Cautivo	<i>C. torquatus</i>	Florencia -Caquetá	H	20	1
Zoologico Matecaña	<i>C. lugens</i>	ND	M	16	1
Total					4
Grupo cupreus					
Procedencia	Determinacion	localidad	Sexo	2n=	Nº Ejemplares
Dama	<i>C. c ornatus</i>	ND	H	44	1
URRAS	<i>C. c discolor</i>	ND/posible Villavicencio	H	46	1
Zoo. Pisilago	<i>C. c discolor</i>	ND	M	46	1
Zoo. Pisilago	<i>C. c ornatus</i>	ND/posible Villavicencio	H	44	1
Colecta en campo	<i>C. caquetensis</i>	Valparaiso, Caquetá	H	46	1
Zoo Ocarros	<i>C. c ornatus</i>	San Martin,Meta	M / H	44	2
Total					7

Defler (2003), que se encontraba con un secuestre depositario de Corpoamazonía en Florencia, Caquetá, y en el 2007, y una hembra procedente de Macedonia (Amazonas), con fenotipo de *Callicebus torquatus lucifer*, de acuerdo con los criterios de Hershkovitz (1990) y capturado en la distribución del mismo taxón. Para estos tres ejemplares, se encontró un cariotipo compuesto por 20 cromosomas (Fig. 2), muy similar a los publicados previamente para un *Callicebus torquatus* (Benirschke & Bogart 1976; Bueno *et al.*

2006). Se encuentra conformado por cuatro pares de cromosomas grandes, submetacéntricos los pares 1 al 3 y metacéntricos el par 4 y cinco pares acrocéntricos pequeños. Los cromosomas X, son medianos y metacéntricos, con patrón característico para este cromosoma en casi todos los mamíferos incluyendo al humano. Se confirmó la replicación tardía de uno de los cromosomas X en los cultivos para Bandas de replicación tardía (RBH-FPG) con pulso terminal de BrUd (Fig.2 recuadro)

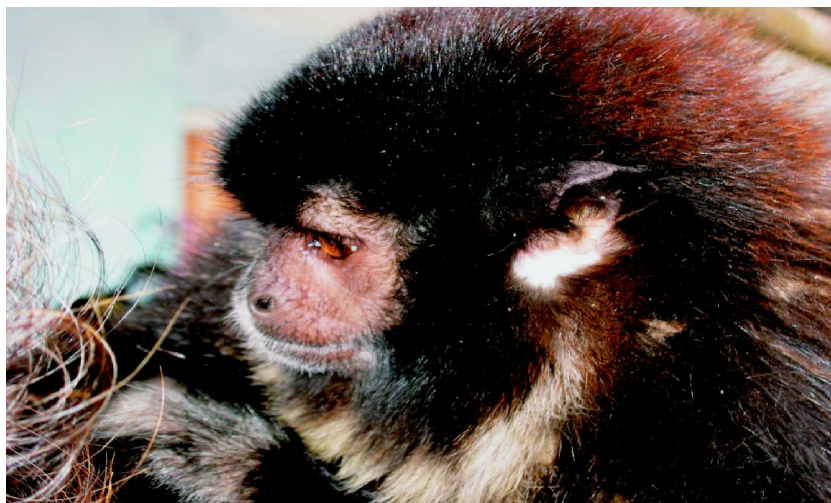


Figura 1. Fenotipo de la Hembra de *Callicebus torquatus* (2n=20). Procedente de Florencia, Caquetá. Presenta Coloración oscura, característica de ambientes con poca luz., y adquiere tonos rojizos con el sol, siendo estos más conspicuos en la región dorsal. Notar los pelos blancos de las manos y collar ventral



Figura 2. Cariotipo en bandas G (GTG) de la hembra de Florencia, *Callicebus torquatus*. En el recuadro se muestra la replicación tardía de uno de los cromosomas X con pulso tardío de Brud (RBHG = Bandas R con Brud, Hoechst y Giemsa) Notar el tamaño mediano del cromosoma X y la replicación tardía de uno de los X

En estos ejemplares se observó con bandas C , algunos polimorfismos en la heterocromatina constitutiva en seis pares del complemento, incluyendo polimorfismos centroméricos, teloméricos, que evidencia la presencia de variaciones heterocromáticas individuales o en poblaciones que deben ser confirmadas con un mayor número de ejemplares y no pueden considerarse como diferencias especie-específica.

No se encontraron diferencias entre los cariotipos del ejemplar decomisado en Florencia, Caquetá, Colombia, con fenotipo “*lugens*” y el de la hembra de *C. t. lucifer* (*sensu* Hershkovitz 1990) procedente de Macedonia, Amazonas, por lo que nos parece adecuado considerarlos como una sola especie en vez de dos especies diferentes como sostiene van Roosmalen 2002.

Posteriormente, se encontró, en un ejemplar cautivo, sin datos de origen, en el Zoológico de Matecaña, un ejemplar con 16 cromosomas, cariotipo idéntico a población brasilera de *Callicebus lugens*. (Bonvicino *et al.*, 2003; Stanyon *et al.*, 2003) En el cariotipo, se observan dos grupos bien diferenciados en los autosomas, un grupo de autosomas biarmados de

gran tamaño (pares 1-4) y los acrocentricos.(5-7). El cromosoma Y, es un acrocéntrico notoriamente grande para el tamaño usual de este cromosoma en otros primates. En los cultivos para Bandas de replicación tardía (RBH-FPG) con pulso terminal de BrUd, se evidencia la presencia de un extenso bloque de cromatina de replicación tardía en el brazo largo. (Fig.3)

Grupo *cupreus*

Dos ejemplares de *Callicebus cupreus discolor* (Fig.4), un macho del Zoológico de Pisilago (Sin origen conocido) y una hembra decomisada a su llegada a Bogotá y entregada a la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Fauna Silvestre, de la Universidad Nacional, presentaron un cariotipo conformado por 46 cromosomas, muy similar al descrito por Egozcue *et al.*, 1969 y Benirschke y Bogart, 1976, para un macho de “*Callicebus moloch = cupreus*” Este cariotipo se caracteriza por presentar 46 cromosomas (Fig. 4), con 8 pares de cromosomas medianos con dos brazos (pares 1-8) y 14 pares de acrocéntricos (pares 9-22). El X es metacéntrico y el Y, es el cromosoma más pequeño, en la mayoría de las metafases solamente es identificable como un punto, posiblemente metacéntrico.

Cuatro ejemplares (tres hembras y un macho) fueron determinados como *Callicebus cupreus ornatus* (= *C. ornatus*,) (Fig. 5) de los cuales, dos tenían como origen probable Villavicencio y dos provenían de San Martín, Meta, que se encuentran dentro del área de distribución propuesta por Defler (2003, 2004, 2010).

Desde el punto de vista cariológico, estos ejemplares presentaron un número diploide $2n = 44$ (Fig.6), conformado por dieciséis cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y 26 pares de acrocéntricos. El cromosoma X es submetacéntrico y el Y metacéntrico muy pequeño (*Bueno et al.*, 2006).

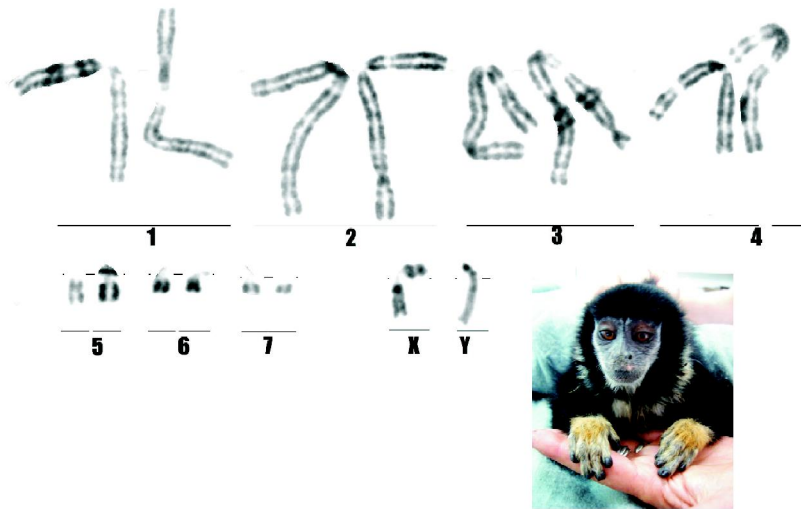


Figura 3. Cariotipo en bandas R (RBH-FPG) y fenotipo del ejemplar de *C. lugens* ($2n= 16$) del Zoológico de Matecaña. Notar la coloración amarilla de las manos y la presencia de un estrecho collar blanco en la parte ventral. En el cariotipo, la gran diferencia en tamaño entre los autosomas de dos brazos (1-4) y los acrocéntricos.(5-7). El cromosoma Y sobresale por su gran tamaño y la presencia de un extenso bloque de cromatina de replicación tardía en el brazo largo



Figura 4. *Callicebus cupreus cf discolors*, Macho, $2n=46$. Zoológico de Pisilago, Notar la coloración rojiza de las manos y la ausencia de una banda negra en la frente, característica de esta especie pero ausente en los dos ejemplares examinados cariologicamente en este trabajo

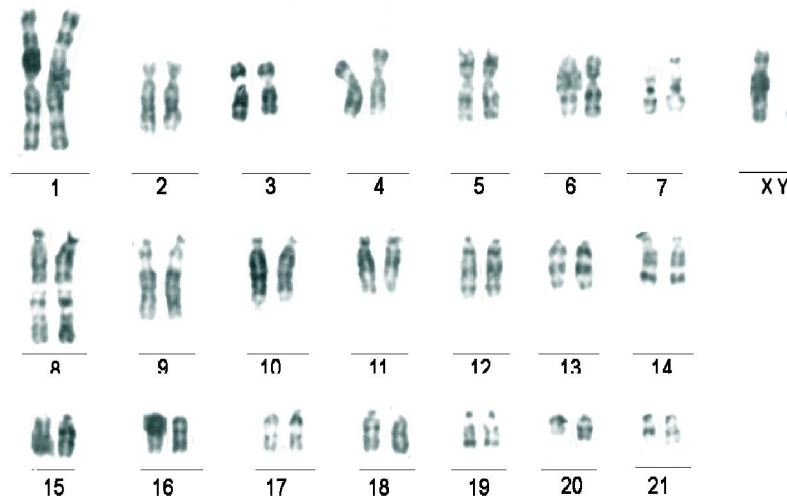


Figura 5. Fenotipo de ejemplar silvestre de *Callicebus ornatus*, San Martin Meta. (Foto de Xiomara carretero)

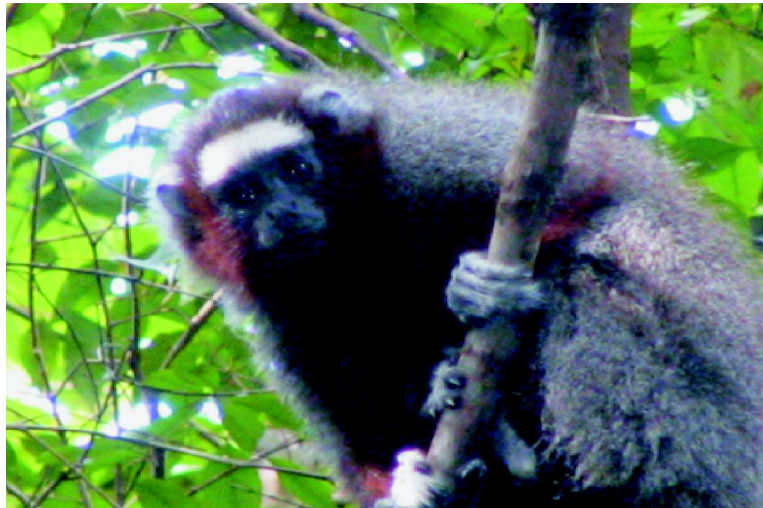


Figura 6. Cariotipo bandas G (GTG) de macho de *Callicebus c ornatus* ($2n=44$), en el que se observan las características cromosómicas de las especies del grupo *cupreus* en los que predominan los cromosomas acrocéntricos. El cromosoma 1 metacéntrico es característico de esta especie y posiblemente originado de una fusión telomérica con uno de los acrocéntricos pequeños del cariotipo de *C. c discolors*, ($2n=44$). Esta función sería el origen de la reducción numérica que diferencia estos dos cariotipos

Una hembra de este grupo, fue colectada por J. García en Valparaiso, Caquetá y fue descrita como nueva especie, *Callicebus caquetensis* por Defler *et al.*, (sometido 2010.). Esta especie tiene un número diploide de 46 cromosomas, conformado por 7 pares de metacéntricos y 15 pares de acrocéntricos. El cromosoma X es submetacéntrico y conserva el patrón de bandas característico de

este cromosoma en varios grupos de primates incluyendo al humano. No se conoce la morfología del Y. Se encontró mucha similitud entre este cariotipo y el reportado para "*Callicebus cupreus*" por Bigoni & Stanyon en O'Brien, Menninger & Nash (2006). Este cariotipo tiene una amplia homología con el de *C. c discolor* ($2n=46$) compartiendo 21 de los 22 pares cromosómicos

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como resultado del estudio de los fenotipos del género *Callicebus* en 6 de las principales colecciones del mundo por DeFler (sin publicar), nos hace sospechar que la taxonomía del género y especialmente de los complejos *Callicebus torquatus* y *Callicebus cupreus* está por esclarecer para Colombia y para otros países, dado que las revisiones recientes se ha hecho basadas en diferencias fenotípicas, sin mucha consideración del genotipo de los animales (Hershkovitz, 1990; Groves, 2001; Van Roosmalen *et al.*, 2002).

Las diferencias cariológicas entre grupos cercanos, implican la presencia de rearrreglos cromosómicos (simples o complejos) que en algunos casos contribuyen a la diversificación, divergencia y aislamiento reproductivo (White, 1968, 1978; King, 1993; Sites y Moritz, 1987).

La variabilidad que estamos identificando en los cariotipos en estos dos complejos de *Callicebus* y en todo el género, permite concluir que la evolución cromosómica sin duda ha incidido mucho sobre la evolución y especiación de este género.

En algunos grupos de roedores (*vgr. Holochirus, Mus*) y primates (*Aotus*) se han reportado rearrreglos cromosómicos que involucran translocaciones de brazos cromosómicos completos y/o adiciones heterocromáticas que no tienen efectos significativos en la fertilidad o tamaño de camada, por lo que constituyen polimorfismos intra- poblacionales. (Nachman y Myeres, 1989, Giraldo *et al.*, 1986). En situaciones como esta, los cambios cromosómicos pueden acompañar, pero probablemente no causan especiación.

Sin embargo, en otros grupos como en las cabras, *Sorex araneus* (Searle, 1986); la oveja doméstica *Ovis aries*, (Stewart-Scott y Bruere, 1987) y el ganado *Bos taurus*, *Bos indicus*, (Maurer y Vogot, 1988; Sánchez *et al.*, 2007), con el mismo tipo de rearrreglo cromosómico (translocaciones de cromosomas completos) presentan diferentes y significativos efectos en la eficiencia biológica de estas especies.

Para el complejo *Callicebus torquatus* el descubrimiento de dos cariotipos en Colombia sugiere la presencia de dos especies en el país: *Callicebus lugens* y *Callicebus torquatus*, con dos subespecies, *lucifer* y *medemi*. Aunque es verdad que no hemos podido estudiar el cariotipo de *medemi* todavía, es importante resaltar que es un taxón que es parapátrico con *C. t. lucifer* (sensu Hershkovitz, 1990), y probablemente no hay barreras reproductivas entre ellos (por confirmar cariotípicamente). El único rasgo descubierto hasta ahora para distinguir *lucifer* de *medemi* es la ausencia de manos blancas en *medemi*, el pelaje es muy similar entre los dos taxones.

Otro problema en este complejo es la dificultad en distinguir *lugens* y *lucifer* según lo definido por Hershkovitz (1990). Hershkovitz (1990) no fue explícito en los caracteres diagnósticos empleados para separar estas dos especies. Adicionalmente, el descubrimiento de dos cariotipos entre los "*lugens*" colombianos, demuestra que en este taxón hay dos taxa: *lugens* (bien definido por el cariotipo de $2n=16$, pero no por un fenotipo) y otro taxón que no es distinguible fenotípicamente de "*lugens*" sensu Hershkovitz, 1990, con $2n=20$. Además, la división de *Callicebus torquatus* en *lucifer* (hasta el río Caquetá) y *lugens* (al norte del río Caquetá) no parece ser sostenible. En la población boreal hay muchos individuos que son iguales a los *lucifer* del sur del país, aunque los porcentajes de ejemplares más oscuros varían de sur a norte. La única defensa de esta división propuesta por Hershkovitz (1990) había seguido la regla sugerida por Mayr y Ashlock (1991) de que porcentajes distintos de dos rasgos similares entre dos poblaciones pueden ser utilizados para describir subespecies distintas.

Para solucionar este problema, se requiere de una investigación mucho más detallada de los dos taxa (*lucifer* y *lugens*), para establecer las posibles diferencias entre *lugens* de $2n=16$, "*lugens*" de $2n=20$ (al norte del río Caquetá) y *lucifer* de $2n=20$ (Amazonia) para reubicar los límites entre las especies. Con estos estudios, probablemente

aumenta la distribución de *Lucifer* en el país, limitando *Lucifer* únicamente a las poblaciones con un cariotipo $2n=16$. Si últimamente, se puede distinguir *Lucifer* de los animales al norte del río Caquetá, esa población requiere un nombre nuevo.

El complejo *Callicebus cupreus* realmente es mucho más claro en términos de su taxonomía. Actualmente nuestro conocimiento de las distribuciones de *Callicebus ornatus*, *C. caquetensis*, y *C. discolor* sugieren que estos taxones están aislados uno del otro, garantizando su condición de unidades evolutivas independientes. Los cariotípicos han demostrado algunas diferencias en términos de números y morfología cromosómica originados por fusiones e inversiones que diferencian cada una de las especies de este grupo. (Bueno et al., 2006)

Realmente, *Callicebus* tiene mucho en común con *Aotus* en términos de la rápida evolución del grupo y uso de los cariotipos como herramientas para esclarecer la sistemática. En estos dos géneros de primates, se presenta un sistema social muy similar, ampliamente descrito (Fernandez-Duque, 2006;

Milozzic et al., 2008; Kinzey, 1977, 1981), que comprenden parejas monógamas que viven y defienden territorios pequeños con las crías de los últimos 1-3 años. Según Bush (1975), Bush et al., (1977), Lande (1979), Wilson et al., (1975), Marks (1987), Ridley (1996) entre otros, altas tasas de evolución cariotípica pueden verse favorecidas por ciertas estructuras sociales y de apareamiento que permiten una mayor posibilidad de fijación de los cambios cromosómicos en una población. Estas estructuras sociales facilitan la subdivisión de la población en demes o subpoblaciones locales, endogámicas que dan la oportunidad para la fijación de las mutaciones cromosómicas alcanzando el estado homocigótico. Probablemente la deriva genética en poblaciones con tamaño efectivo pequeños es el principal mecanismo responsable para la acumulación de variabilidad cromosómica de estos dos géneros (Galbreath, 1983). Otros autores identifican características como movilidad limitada en adultos (territorios pequeños, dispersión limitada en juveniles), distribución en parches y territorialidad fuerte como características de tales poblaciones sujetas a una evolución rápida.

AGRADECIMIENTOS

A Carolina Franco, del Hogar de paso y a Alexander Velásquez profesor de la Universidad de la Amazonía, Florencia, por su apoyo en las visitas y contactos con la familia asignada como secuestre depositario del ejemplar de Florencia; a los Zoológicos de Pisilago, Santa Cruz y Matecaña, Bioparque los Ocarros, quienes nos dieron acceso a los ejemplares allí depositados. A URRAS (Unidad de Rescate y Rehabilitación de Fauna Silvestre, de la Universidad Nacional), particularmente a la profesora Claudia Brievar, quien siempre nos ha apoyado tanto en la

asesoría, anestesia y toma de muestras de los ejemplares, como en el mantenimiento hasta su muerte del ejemplar procedente del Caquetá.

Al personal de apoyo del laboratorio de Citogenética en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional, Carolina Arango y Laura Y. Rengifo siempre dispuestas a brindarme su apoyo con estos cultivos de primates. A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia que financió esta investigación dentro del proyecto.

REFERENCIAS

Arrighi F, Hsu TC. Localization of the heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 1971; 10: 81-86.

Barros RMS, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Rodrigues LRR, Neusser M, Oliveira EF, Wienberg J, Muniz JAPC,

Muller S, Rissino JD. Chromosomal studies in *Callicebus donacophilus pallelescens*, with classic and molecular cytogenetic approaches: Multicolour FISH using human and *Saguinus oedipus* painting probes. *Chromosome Res* 2003; (11): 327-334.

- Barros RMS, Pieczarka JC, Brigido MDCO, Muniz JAPC, Rodrigues LR, Nagamachi CY. A new karyotype in *Callicebus torquatus* (Cebidae, Primates). *Hereditas*, 2000; 133:55-58.
- Benirschke K, Bogart MH. Chromosomes of the tan-handed Titi (*Callicebus torquatus*, Hoffmannsegg, 1807). *Folia Primatologica*, 1976; 25:25-34.
- Bonvicino CR, Penna-Fieme V, do Nascimento F, Lemos B, Stanyon R, Seuánez HN. The lowest diploid number ($2n=16$) yet found in any primates: *Callicebus lugens* (Humboldt, 1811). *Folia Primatologica*, 2003; 74:141-149.
- Bueno MI, Defler TR. Esta presente *Callicebus lugens* en Colombia? En *Primates de Colombia*, Pereira et al editores. Sociedad Prinatológica de Colombia. 2009. En prensa.
- Bueno ML, Torres OM, Ramírez- Orjuela C, Leibovici M. Información cariológica del género *Callicebus* en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 2006; 30(114):109-115.
- Bush GL, Case SM, Wilson AC, Patton JL. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74: 3942-3946.
- Bush GL. Modes of animal speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1975, 6:339-364.
- Casado F, Bonvicino, CR, Seuánez, HN. Phylogenetic analyses of *Callicebus lugens* (Platyrrhini, Primates). *Journal of Heredity*, 2006; 98(1):88-92.
- Caspersson T, Zeach L & Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental Cell Research*, 1970; 60: 315-319.
- De Boer LEM. Cytotaxonomy of the Platyrrhini (Primates). *Genen Phaenen* 1974; 17: 1-115.
- Defler TR. Primates de Colombia. *Conservación Internacional Colombia. Serie de Guías Tropicales de Campo*. 2003; 543p.
- Defler TR, Bueno ML, Garcia J. *Callicebus caquetensis*: a new and critically endangered primate from southern Caquetá, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*. Sometido Enero 2010.
- Dobzhansky Th. *Genetic and the origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York, (1937) 2ª Ed. 1941, 3ª ed. 1951.
- Egozcue J. Primates En: Benirschke K, (Ed.) *Comparative Mammalian Cytogenetics*. New York: Springer-Verlag, 1969; 357-389 pp.
- Fernandez-Duque E. Aotinae: Social Monogamy in the Only Nocturnal Haplorhines. In: *Primates in Perspective*. (Ed. Bearder S). Oxford University Press, 2006; 1: 139-154.
- Forsdyke DR Chromosomal speciation: a reply, *Journal of Theoretical Biology*. 2004, 230: 189-196.
- Fraser DJ, Bernatchez L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*. 2005; 10: 2741-2752.
- Galbreath, GJ. Karyotypic evolution in *Aotus*. *American Journal of Primatology*. 1983; 4:245-251.
- Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975; 53:37-50.
- Goto K, Akematsu T, Schimazu H, Sugiyama T. Simple differential giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma*. 1975; 53: 223-230.
- Groves C. Primate taxonomy. *Smithsonian series in comparative evolutionary Biology*. Smithsonian Institution Press. Washington, London 2001; 170-178 pp.

- Giraldo A, Bueno ML, Silva E, Ramirez J, Umaña J, Espinal C. Estudio Citogenético de 288 *Aotus* Colombianos. *Biomedica* 1986; 6: 5-13.
- Hershkovitz P. A systematic and zoogeographic account of the monkeys of the genus *Callicebus* (Cebidae) of the Amazonas and Orinoco river basins. *Mammalia*; 1963; 27(1):1-80.
- Hershkovitz P. Titis, New World of the genus *Callicebus* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary taxonomic review. *Fieldiana Zoology, New Series*, 1990; 55: 1-109.
- Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 1980; 36:1014-1015.
- Kinzey WG, Rosenberger AL, Heisler PS, Prowse D, Trilling J. A preliminary field investigation of the yellow-handed titi monkey, *Callicebus torquatus torquatus*, in Northern Peru. *Primates* 1977; 18: 159-181.
- Kinzey WG. Dietary correlates of molar morphology in *Callicebus* and *Aotus*. *American Journal of Physical Anthropology* 1977; 47:142.
- Kinzey WG. The titi monkeys, genus *Callicebus*. Pp. 241-276. En: Coimbra-Filho F, Mittermeier A, *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 1981.
- Lande R. The fixation of chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and recolonization. *Heredity*, 1985; 54: 323-332.
- Marks J. Social and ecological aspects of primate cytogenetics. Pp. 139-151. En: Kinzey, WG, *Primate models: the evolution of human behavior*. State University of New York Press, Albany. 1987.
- Maurer RR, Vogt DW. Decreased fertility in related females heterozygous for the 1/29 chromosome translocation. *Theriogenology*, 1988; 30 (6): 1149-1157.
- Mayr E. *Animal Species and Evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1963.
- Mayr E. *Populations, species, and evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1970.
- Mayr E. *The growth of biological thought*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1982.
- Mayr E. *This is biology: the science of the living world*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1997.
- Mayr E. *What evolution is*. Basic Books, New York. 2001.
- Mayr, E. *What makes biology unique?* Cambridge University Press, Cambridge. 2004.
- Mayr E, Ashlock PD. *Principles of Systematic Zoology*. Second Edition. McGraw-Hill, Inc., New York. 1991.
- Milozzi C, Steinberg ER, Mudry MD. Behavioral analysis and cytogenetic confirmation of night monkeys, *Aotus azarae* (Cebidae, Platyrrhini) in captivity. *International Journal of Primatology* 2008; (cof).
- Minezawa M, Jordan OC, Valdivia-Borda CJ. Karyotypic study of Titi monkeys *Callicebus moloch brunneus*. *Primates*. 1989; 30: 81-88.
- Minezawa M, Valdivia-Borda CJ. Cytogenetic study of the Bolivian Titi and revision of its cytotaxonomic states. *Reports of New World Monkeys-Kyoto University Overseas Research* 1984; 4: 39-45.
- Moorhead PS, Norwell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA.. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 1960; 20(3): 613-616.
- Nachman MW, Myres P. Exceptional chromosomal mutation in a rodent population are not strongly underdominant, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989; 86: 6666-6670.

- Nagamachi CY, Rodrigues LR, Galetti jr PM, Mantovani M, Pissinati A, Rissino JD, Barros RMS, Pieczarka JC. Cytogenetic studies in *Callicebus personatus nigrifrons* (Platyrrhini, Primates). *Caryologia*; 2003; 56 (1): 47-52.
- Navarro A, Barton NH. Chromosomal speciation and molecular divergence - Accelerated Evolution in rearranged Chromosomes, *Science* 2003, 300: 321-324.
- O'Brien SJ, Menninger JC, Nash WG. Atlas of Mamalian Chromosomes. Wiley-Liss, New York. 2006; 125pp.
- Palacios-Acevedo E, Rodríguez-Rodríguez A. 1995. Caracterización de la dieta y comportamiento alimentario de *Callicebus torquatus lugens*. Trabajo de Grado, Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Pearman PB. Conservation Value of Independently Evolving Units: Sacred Cow or Testable Hypothesis? *Conservation Biology*, 2001; 15: 780-783.
- Ridley M. *Evolution*, 2nd Ed. Blackwell Science, Cambridge, Mass 1996; 258 p.
- Rieseberg LH. Chromosomal rearrangements and speciation, *Trend in Ecology and Evolution (TREE)*, 2001; 16: 351-357.
- Rodrigues LR, Barros RMS, Pissinati A, Pieczarka JC, Nagamachi CY. A new karyotype of an endangered primate species (*Callicebus personatus*) from the Brazilian Atlantic forests. *Heredity*, 2004; 140: 87-91.
- Rodriguez-Maecha JV, Alberico M, Trujillo F, Jorgenson J. *Libro Rojo de los Mamíferos Colombianos*. Conservación Internacional Colombia & Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Bogotá 2006.
- Ryder OA. Species conservation and systematics: The dilemma of subspecies. *Trends Ecology Evolution (TREE)*, 1986; 1: 9-10.
- Sánchez CA, Jiménez LM, Bueno ML. Traslocación Robertsoniana (1:29) en bovinos criollos Colombianos. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2007; 53: 75-85.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 1971; 2: 971-972.
- Searle JB. Meiotic studies of Robertsonian heterozygotes from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus* L. *Cytogenetic and Cell Genetic*. 1986; 41:154-162.
- Stanyon R, Bonvicino CR, Svartman M, Seuánez HN. Chromosome painting in *Callicebus lugens*, the species with the lowest diploid number ($2n=16$) know primates. *Chromosoma*, 2003; 112:201-206.
- Stewart-Scott IA, Bruère AN. Distribution of heterozygous translocations and aneuploid spermatocyte frequency in domestic sheep. *Journal of Heredity*, 1987; 78: 37-40.
- Summer AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 1972; 75: 304-306.
- Van Roosmalen MGM, Van Roosmalen T, Mittermeier RA. A Taxonomic Review of the Titi Monkeys, Genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the Description of Two New Species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashi*, from Brazilian Amazonia. *Neotropical Primates*. 2002;10:1-52.
- Willard H, Latt S. Analyses of deoxyribonucleic acid replication in human X chromosomes by microscopy fluorescence. *American Journal of Human Genetic*. 1976; 28:213-227.
- Wilson AC, Bush GL, Case SM, King M-C. Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975; 72:5061-5065.