

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
ANIMAL**

Thomas Dickel Dias

**ANÁLISE GENÉTICA EM GRUPOS MISTOS DE BUGIO-RUIVO E
BUGIO-PRETO (*Alouatta guariba clamitans* E *Alouatta caraya*) EM
UMA ZONA DE CONTATO EM SÃO VICENTE DO SUL, RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL**

Santa Maria, RS
2017

Thomas Dickel Dias

Análise genética em grupos mistos de bugio-ruivo e bugio-preto (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) em uma zona de contato em São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Orientador: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

Coorientadora: Vanessa Barbisan Fortes

Santa Maria, RS

2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dias, Thomas Dickel

Análise genética em grupos mistos de bugio-ruivo e bugio-preto (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) em uma zona de contato em São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil / Thomas Dickel Dias.- 2017.
47 p. ; 30 cm

Orientador: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen
Coorientadora: Vanessa Barbisan Fortes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, RS, 2017

1. Híbridos 2. *Alouatta* 3. Genética 4. Primatas I. Sganzerla Graichen, Daniel Ângelo II. Barbisan Fortes, Vanessa III. Título.

Thomas Dickel Dias


Análise genética em grupos mistos de bugio-ruivo e bugio-preto (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) em uma zona de contato em São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

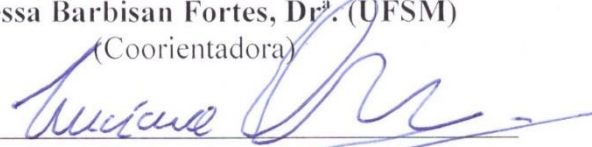
Aprovado em 03 de outubro de 2017:



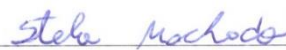
Daniel Ângelo Sganzerla Graichen, Dr. (UFSM)
(Presidente/ Orientador)



Vanessa Barbisan Fortes, Dr.^a (UFSM)
(Coorientadora)



Luciana Ines Oklander, Dr.^a (IBS/ARG)
(Examinadora)



Stela Machado, Dr.^a (Autônoma)
(Examinadora)

Santa Maria, RS

2017

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de auxílio.

Agradeço meus orientadores, professores Daniel Graichen e Vanessa Fortes pela paciência, dedicação e comprometimento. Sem vocês este trabalho não teria sido possível.

A Marícia D'Ávila pela grande ajuda e dicas no desenvolvimento do trabalho e os colegas do Laboratório de Genética Evolutiva (GenEvo), Jéssyca Schwantes, Sabrina Ferreira, Manoela Getelina, Fábio (Binho) Limberger, Carolina Rangel pela ajuda em campo e laboratório.

Ao amigo, Felipe Benchimol e colegas do Laboratório de Primatologia Camila Barrios, Jerônimo Schmidt e Tainara Sobroza pela grande ajuda no esforço de campo.

Aos meus sogros Celso e Terezinha Conceição, juntamente com os avós Fábio e Tereza Conceição por sempre me receber muito bem na Defesa.

Aos meus pais, Sinval e Valmi Dias que sempre me apoiaram e incentivaram, devo tudo a vocês.

Especialmente ao meu amor e companheira Martha Silva Conceição por todo carinho e dedicação.

E ao meu cachorro Mumu, que é marrom.

I think

(Charles Robert Darwin)

RESUMO

Análise genética em grupos mistos de bugio-ruivo e bugio-preto (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) em uma zona de contato em São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul

AUTOR: Thomas Dickel Dias

ORIENTADOR: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen

COORDINADORA: Vanessa Barbisan Fortes

Existem diversos relatos de zonas de contato entre duas espécies de primatas do gênero *Alouatta*, em alguns poucos casos, formando grupos mistos. A variação morfológica causada pelo fluxo gênico em primatas híbridos ainda não foi bem compreendida. Sendo assim, é importante a realização de estudos para determinar a presença de indivíduos híbridos. Uma zona de contato descrita no sul do Brasil, conta com a presença de possíveis híbridos de *A. caraya* e *A. g. clamitans*. Com isso, o objetivo deste estudo foi: verificar a frequência de grupos mistos de *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*; com o auxílio de marcadores moleculares (fragmento do *Cytb*) comparar geneticamente indivíduos puros com os que possuam características morfológicas descritas para possíveis híbridos; com marcadores maternos e nucleares de indivíduos híbridos, determinar a direção preferencial da fertilidade; e realizar a análise de fragmentos nucleares (Íntron 3 do gene *MECP2*) clivados com a enzima de restrição BspLI - CAPS comparando os fragmentos correspondentes para cada espécie com os resultados obtidos com as análises do DNA mitocondrial e o fenótipo. A área de estudo é composta pela mata ciliar do rio Ibicuí e seus afluentes que fazem parte do bioma Pampa. As amostragens de campo ocorreram mensalmente no ano de 2016. As buscas foram realizadas com base no levantamento extensivo em fragmentos de mata e trechos de mata ciliar previamente definidos. Os indivíduos localizados foram fotografados sempre que possível e tiveram suas fezes coletadas para a realização das análises moleculares. Foram identificados 22 grupos, sendo quatro grupos contendo apenas indivíduos com fenótipo de *A. caraya*; 12 grupos contendo apenas indivíduos com fenótipo de *A. g. clamitans* e seis grupos de composição mista. O DNA mitocondrial foi amplificado em 22 amostras e 18 amostras amplificaram DNA nuclear, sendo que 16 amostras amplificaram os dois marcadores. Os marcadores de DNA nuclear, após serem submetidos ao procedimento de clivagem (CAPS), demonstrou que sete amostras correspondem com *A. caraya*, destas seis possuíam o genótipo mitocondrial de *A. caraya*. Cinco amostras apresentaram o genótipo nuclear de *A. g. clamitans*, sendo três com genótipo mitocondrial de *A. caraya*, uma com genótipo mitocondrial de *A. guariba*, e em outra o genótipo mitocondrial não foi acessado. Cinco amostras foram identificadas como pertencentes a indivíduos heterozigotos e correspondiam a padrões de coloração identificados como híbridos. A análise do polimorfismo do Íntron 3 do gene *MECP2*, em indivíduos heterozigotos, apresentou sítios de clivagem esperados tanto para *A. caraya* quanto *A. g. clamitans*. Indivíduos com marcadores nucleares de *A. g. clamitans* juntamente com marcadores mitocondriais de *A. caraya*, indica que em certo grau há viabilidade dos indivíduos híbridos. Este estudo fornece novas evidências: geneticamente a hibridação entre *Alouatta caraya* e *A. g. clamitans*, este resultado irá favorecer novos ramos de estudo (ecológicos, genético/evolutivos, comportamentais, conservação, etc.) com as espécies envolvidas; a viabilidade de fêmeas híbridas; e a direção preferencial do cruzamento entre as espécies parentais.

Palavras-chave: Bugio. Grupos mistos. Híbridos. Marcadores moleculares. Zona híbrida.

ABSTRACT**Genetic analysis in mixed groups of southern brown howler monkey and black-and-gold howler monkey (*Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*) in a contact zone in São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul**

AUTHOR: Thomas Dickel Dias
ADVISOR: Daniel Ângelo Sganzerla Graichen
CO-ADVISOR: Vanessa Barbisan Fortes

There are several reports of contact zones between two species of primates of the genus *Alouatta*, in a few cases, forming mixed groups. The morphological variation caused by the gene flow in hybrid primates has not yet been well understood. Therefore, it is important to conduct studies to determine the presence of hybrid individuals. A contact zone described in southern Brazil has the presence of possible hybrids of *A. caraya* and *A. g. clamitans*. The objective of this study was: to verify the frequency of mixed groups of *Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans*; by mean of molecular markers (*Cytb* fragment) to genetically compare pure individuals with those already described with morphological characteristics for possible hybrids; with maternal and nuclear markers of hybrid individuals, determine the preferred direction of the crossing; and execute the analysis of nuclear fragments (Intron 3 of the *MECP2* gene) cleaved with the restriction enzyme BspLI-CAPS by comparing the corresponding fragments for each species with the results obtained with mitochondrial DNA and phenotype analyzes. The study area is composed by riparian vegetation of the Ibicuí river and his tributaries located in the Pampa biome. Field surveys occurred monthly in 2016. Searches were conducted based on the extensive survey of previously defined forest fragments and riparian vegetation. Once located, the individuals were photographed whenever as possible and their feces collected for molecular analysis. Were identified 22 groups, 4 groups containing only individuals with *A. caraya* phenotype; 12 groups containing only individuals with *A. g. clamitans* phenotype and 6 mixed groups. Mitochondrial DNA was amplified in 22 samples and 18 samples amplified nuclear DNA, and 16 samples amplified both markers. The markers of Nuclear DNA, after being submitted to the cleavage procedure (CAPS), showed that 7 samples corresponded to *A. caraya*, of which 6 had the mitochondrial genotype of *A. caraya*. In three of five samples showed mitochondrial genotypes of *A. caraya*, in the other two: one show mitochondrial genotype of *A. guariba* and in another one the mitochondrial genotype was not accessed, in all of these five samples the nuclear genotype showed to be of *A. g. clamitans*. Five samples were identified as belonging to heterozygous individuals and corresponded to staining patterns identified as hybrids. Intron polymorphism analysis of the *MECP2* gene in heterozygous individuals showed cleavage sites expected for both *A. caraya* and *A. g. clamitans*. Individuals with nuclear markers of *A. g. clamitans* and mitochondrial markers of *A. caraya* indicates that to some point there is viability of the hybrid individuals. This study provides new evidences of: genetically the hybridization between *Alouatta caraya* and *A. g. clamitans* the viability of hybrid females; and the preferential fertility direction of the cross between the parent species. These results will favor new branches of study – i. e. ecological, genetic/evolutionary, behavioral, conservation, etc.

Keywords: CAPS. Mixed groups. Molecular markers. Howler monkey. Hybrids. Hybrid zone.

SUMÁRIO

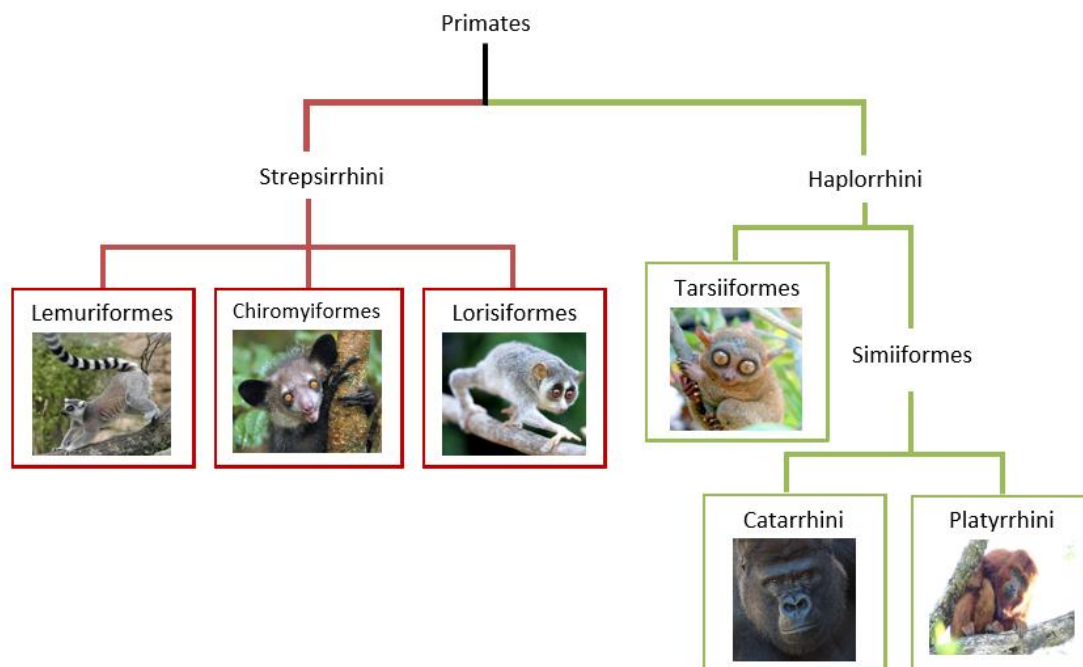
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 APRESENTAÇÃO	01
1.1 PRIMATAS DO NOVO MUNDO	01
1.2 TAXONOMIA	02
1.3 ECOLOGIA <i>ALOUATTA</i> SPP.	03
1.3.1 <i>Alouatta caraya</i> (bugio preto).....	04
1.3.2 <i>Alouatta guariba clamitans</i> (bugio ruivo).....	05
1.4 ZONAS DE CONTATO E EVENTOS DE HIBRIDAÇÃO	06
1.5 OBJETIVOS.....	08
1.5.1 Objetivo geral.....	08
1.5.2 Objetivos específicos.....	09
2 ARTIGO – “HIBRIDAÇÃO NATURAL EM PRIMATAS DO NOVO MUNDO: NOVA EVIDENCIA DE HIBRIDAÇÃO NO GRUPO DOS BUGIOS”	10
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS	30
APÊNDICE A - Alinhamento das sequencias do gene mitocondrial Citocromo B (Cyt b) obtidas a partir das amostras de fezes de <i>Alouatta caraya</i> e <i>A. guariba clamitans</i>.	37
APÊNDICE B - Alinhamento das sequencias do Íntron 3 do gene nuclear MECP2 obtidas a partir das amostras de fezes de <i>Alouatta caraya</i> e <i>A. guariba clamitans</i>.	41
APÊNDICE C - Gel de agarose 2% demonstrando a clivagem diferencial no Íntron 3 do gene MECP2 entre <i>A. caraya</i> e <i>A. guariba clamitans</i>.	45
APÊNDICE D - Tabela contendo informações de fenótipo e genótipo obtido através do CAPS.	46

1 APRESENTAÇÃO

1.1 PRIMATAS DO NOVO MUNDO

Grande parte das espécies de primatas podem ser encontrados habitando florestas tropicais (ver REED e BIDNER, 2004). A ordem Primates teve origem no período Cretáceo Superior, algo em torno de 65 milhões de anos atrás (NORONHA e CAMPISTA, 2015). Atualmente são reconhecidas as subordens de primatas: Strepsirrhini (prossímios) e Haplorrhini (símios). Os Strepsirrhini são divididos em três infraordens: Lemuriformes (lêmures), Chiromyiformes (aye-ayes) e Lorisiformes (lórises e gálagos). A subordem Haplorrhini possui duas infraordens: Tarsiiforme (gênero *Tarsius*) e Siimiformes (macacos, grandes macacos e o homem). Já Siimiformes, é dividida em duas parvordens: Catarrhini (primatas do velho mundo) e Platyrrhini (primatas do novo mundo; Figura 1; NORONHA e CAMPISTA, 2015).

Figura 1 – Cladograma da ordem Primates, subordens e infraordens com seus principais representantes.



Fonte: Noronha e Campista (2015, p. 32; modificado).

Os primatas do novo mundo possuem um focinho curto, nariz achatado e narinas voltados para os lados, no focinho existem membranas que aquecem e umedecem o ar antes de chegar aos pulmões. Normalmente vivem em grupos e os machos apresentam tamanho superior ao das fêmeas (dos REIS et al., 2015). O grupo dos primatas do Novo Mundo (Platyrrhini) é composto por 204 espécies e subespécies de 20 gêneros e cinco famílias (Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae; RYLANDS et al., 2012).

No Brasil ocorrem 139 espécies e subespécies com representantes nas cinco famílias do Novo Mundo (IUCN, 2015; dos REIS et al., 2015; RYLANDS et al., 2012). A família Atelidae (Lacépède 1799) possui cinco gêneros, quatro ocorrem no Brasil: *Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles* e *Lagothrix*. São os maiores primatas das Américas e os únicos com cauda preênsil (dos REIS et al., 2015; YOULATOS e GUILLOT, 2015).

São cinco as espécies que possuem distribuição austral em relação ao trópico de capricórnio, e podem ser encontradas nos estados que compreendem a região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (CHIARELLO, 2003; FERNANDEZ-DUQUE et al., 2008; MENDES et al., 2008; MELO et al., 2009; PASSOS et al. 2007; RYLANDS e ANZENBERGER, 2012), são elas: *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940), *Brachyteles arachnoides* (Geoffroy, 1806), *Sapajus nigritus* (Goldfuss, 1809) e *Leontopithecus caissara* (Lorini e Persson, 1990).

1.2 TAXONOMIA

O gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 possui de 10-14 espécies; são cerca de 22 táxons com espécies e subespécies (ver CORTÉS-ORTIZ et al., 2014, RYLANDS e MITTERMEIER, 2009), as quais ocorrem no extremo sul da América do Norte, América Central e América do Sul (IUCN, 2015). São dez as espécies com ocorrência no Brasil: *A. belzebul* (Linnaeus, 1766), *A. caraya* (Humboldt, 1812), *A. discolor* (Spix, 1823), *A. guariba* (Humboldt, 1812), *A. juara* (Elliot, 1910), *A. macconnelli* (Elliot, 1910), *A. nigerrima* (Lönnerberg, 1941), *A. puruensis* (Lönnerberg, 1941), *A. seniculus* (Linnaeus, 1766) e *A. ululata* (Elliot, 1912).

Por meio de análises de dados biogeográficos (papel desempenhado pela orogenia Andina, o surgimento do istmo do Panamá, rios e refúgios florestais) e filogenéticos que o gênero *Alouatta* fornece, Cortés-Ortiz (2003) conseguiu estimar que *A. caraya* e *A. g. clamitans* foram separadas há pelo menos cerca de 5,1 milhões de anos. Porém, Martins et al. (2011), por meio da análise de coalescência do DNA mitocondrial, apresentou novas

evidências de que a divergência do grupo formado por *A. caraya* e os grupos formados por *A. belzebul* e *A. g. clamitans* ocorreu a 3,83 milhões de anos. Apesar disso, o comportamento e a ecologia entre *A. caraya* e *A. g. clamitans* ainda são semelhantes (BICCA-MARQUES, 2003), até mesmo em zonas de contato com grupos vivendo em simpatria (SILVA, 2010).

1.3 ECOLOGIA DE *ALOUATTA* SPP.

Os bugios (*howler monkeys*) são grandes folívoros e se destacam dos demais primatas neotropicais por terem sua dieta basicamente à base de folhas (BEHIE e PAVELKA, 2014), sendo que frutos, flores e invertebrados complementam sua alimentação (DIAS e RANGEL-NEGRÍN, 2015; BEHIE e PAVELKA, 2014; MIRANDA e PASSOS, 2004; dos REIS et al., 2015). O uso do hábitat ocorre principalmente com a exploração do dossel da floresta, compartilhando suas atividades de deslocamento e alimentação entre as camadas média e superior (ALMEIDA-SILVA et al., 2005; GARBER e JELINEK, 2006; YOULATOS, 2004).

Ainda, os bugios são animais que vivem em grupos sociais formados em média por dez indivíduos que em geral incluem um macho, fêmeas e proles. A vocalização territorial é um fator importante no gênero *Alouatta*, a vocalização é amplificada graças ao osso hióide bastante proeminente nos machos, funcionando como uma caixa de ressonância (dos REIS et al., 2015).

O dicromatismo na coloração da pelagem é raro e está presente em duas espécies do gênero, *A. caraya* e *A. g. clamitans* (ver CROCKETT, 1987; GREGORIN, 2006). Os filhotes de ambas as espécies nascem com a cor muito semelhante com à das fêmeas adultas, nos machos ocorre a mudança de coloração durante o desenvolvimento (PORTO et al., 2015).

A maturidade sexual nas fêmeas ocorre em média aos três anos e meio e em machos em aproximadamente três anos. O tempo gestacional é de seis meses e um filhote é gerado por ano, o filhote é carregado na região ventral da fêmea até os dois meses, em seguida passa para o dorso. Após dois meses os filhotes podem ser carregados por outros membros do grupo e no caso de *A. caraya* podem ser amamentados por outras fêmeas do grupo, o desmame ocorre em cerca de um ano de idade (PORTO et al., 2015).

1.3.1 *Alouatta caraya* Humboldt, 1812 (bugio preto)

Este táxon é reconhecido pelo fato de haver o dicromatismo sexual (GROVES 2001) e principalmente um reforço para esta teoria se deu através de análises morfológicas do osso hióide (i. e. a abertura hióidea apresenta-se de forma quadrangular e ampla, sendo mais longa que larga, em *A. g. clamitans*, por exemplo, a abertura é tão larga quanto longa, resultando em uma forma quadrada ou levemente ovalada) dos machos e da ausência do tentório (i. e. está ausente ou é rudimentar; GREGORIN, 2006). Os machos desta espécie (Figura 2 – esquerda) possuem coloração negra em todo corpo (podem apresentar pelos castanho-avermelhados na barba, dorso e cauda), atingem cerca de 120 cm de comprimento (da cabeça até a cauda) e pesam cerca de 7,1 kg. As fêmeas possuem coloração amarelada (podem possuir uma linha sagital, com coloração mais escura, se estendendo da cabeça à base da cauda; Figura 2 - direita), chegam a medir cerca de 100 cm de comprimento (da cabeça até a cauda) e pesam em torno de 4,1 kg (PORTO et al., 2015).

Figura 2 – Indivíduos macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Alouatta caraya* fotografados na área do estudo, São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul – Brasil.



Fonte: imagem do autor.

Alouatta caraya é espécie do gênero que apresenta a maior área de distribuição geográfica no Brasil. Conhecido popularmente por habitar ambientes predominantemente abertos (Cerrado, Pantanal e Pampa), pode ser avistado em matas ripárias e capões de mata na região central do Brasil e ambientes de mata semidecídua nos estados de São Paulo e Minas Gerais, bem como Paraguai (GREGORIN, 2006).

1.3.2 *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940 (bugio ruivo)

Dois tipos distintos podem ser reconhecidos tendo como base a coloração da pelagem; ao norte, com coloração mais escura e tons de marrom, é encontrado o *A. g. guariba*; ao sul, com coloração mais viva e tons de vermelho (ruivo), reside o *A. g. clamitans* (CORTÉS-ORTIZ, 2015). Os machos atingem cerca de 115 cm (da cabeça até a cauda) e chegam a pesar em média 6,2 kg (Figura 3 – esquerda). As fêmeas medem cerca de 100 cm (da cabeça até a cauda) e pesam aproximadamente 4,2 kg (Figura 3 – direita).

Autores como de Oliveira et al. (2002) e Harris et al. (2005), apresentaram evidências de que os indivíduos do sul e norte, são na verdade duas espécies ou ainda duas subespécies habitando o centro e o norte da distribuição de *A. guariba* e uma espécie habitando o sul da distribuição. No ano de 2011, Martins et al. com base em dados genéticos, apresentaram evidências da existência de duas espécies/subespécies (norte e sul). Semelhante ao que propôs Gregorin (2006), que ambos os tipos (do norte e do sul) deveriam ser consideradas espécies plenas, tendo como base a coloração, e o importante fato de apenas *A. g. clamitans* possuir dicromatismo sexual; e ainda, estudos morfológicos do crânio e do osso hióide.

Figura 3 - Indivíduos macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Alouatta guariba clamitans* fotografados na área do estudo, São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul – Brasil.



Fonte: imagem do autor.

No gênero *Alouatta*, os estudos cariotípicos auxiliaram em novas avaliações taxonômicas de táxons anteriormente classificados como subespécies que por fim, vieram

a ser classificadas como espécie (CONSIGLIERE et al., 1996, 1998; de OLIVEIRA et al., 2002; STANYON et al., 1995). Para *A. guariba* ssp., existem múltiplos rearranjos envolvendo diferenças no número diplóide e cromossomos sexuais, fato que reforça *A. g. guariba* e *A. g. clamitans* como espécies plenas (de OLIVEIRA et al., 2000). Recentemente, Steinberg et al. (2017) realizaram a caracterização citogenética de *A. g. clamitans* e verificaram a presença de uma sistema de cromossomos sexuais pentavalente (o primeiro descrito para primatas), desta forma foi possível separar a subespécie *A. g. clamitans* em populações do norte (no Brasil: estado do Rio de Janeiro, GIFALLI-IUGHETTI, 2008; de OLIVEIRA et al., 1995, 1998; e estado do Espírito Santo, de OLIVEIRA et al., 1995) e sul (no Brasil: estado do Paraná, de OLIVEIRA et al., 2002; estado de Santa Catarina GIFALLI-IUGHETTI, 2008; COIMBRA, 2015; e na Argentina: Província de Misiones, STEINBERG, 2011).

1.4 ZONAS DE CONTATO E EVENTOS DE HIBRIDAÇÃO

Um indivíduo híbrido é definido como um organismo com ancestralidade mista (MALLET, 2005), ou seja, é fruto do cruzamento entre indivíduos de espécies distintas. Entre os animais, o valor adaptativo dos híbridos é considerado inferior em relação aos parentais (BARTON, 2001; MAYR, 1963), embora existam exceções (ver FITZPATRICK e SHAFFER, 2007; GRANT, 2003; MOORE, 1977).

O cruzamento entre indivíduos de duas espécies geneticamente diferenciadas (hibridação) na natureza é tradicionalmente considerado como um processo contra-adaptativo e efêmero (AGOSTINI et al., 2008), porém Arnold e Mayer (2006) juntamente com Mallet (2005) descrevem a hibridação natural como um mecanismo evolucionário. Zonas híbridas têm sido descritas para uma grande variedade de táxons e a hibridação é relativamente comum entre os primatas do velho mundo (ver ARNOLD e MAYER, 2006). Arnold (1997, 2006) demonstra que raramente os híbridos são totalmente inviáveis ou estéreis, e que por muito tempo têm-se subestimado e até mesmo negligenciado a importância de eventos raros, como a reprodução destes indivíduos, no processo evolutivo.

As zonas híbridas podem possuir certa mobilidade, podendo ser diretamente relacionadas a aspectos demográficos, comportamentais e ecológicos (BRONSON et al., 2003; BUGGS et al., 2007; DASMAHAPATRA et al., 2002). Mudanças na densidade populacional de uma espécie, devido a fenômenos climáticos ou ecológicos, por exemplo,

podem promover a expansão ou retração da outra espécie e, em decorrência, aumentar a taxa de introgressão (BARTON e HEWITT, 1985).

Segundo Agostini et al. (2010) existe a sobreposição de nicho para as espécies de *A. caraya* e *A. g. clamitans*, porém não há evidências que corroborem a competição interespecífica das espécies envolvidas, o que pode ser um importante preditor da distribuição parapátrica das espécies de *Alouatta* nos neotrópicos. Desde meados de 1940 existem relatos de zonas híbridas entre espécies do gênero *Alouatta* (ver CORTÉS-ORTIZ et al., 2015b). Segundo, CORTÉS-ORTIZ et al. (2015) embora a zona de contato entre *A. caraya* e *A. clamitans* seja potencialmente extensa, registros de simpatria são raros, mas mais comuns do que se imaginava.

Atualmente estão descritas 14 zonas de contato para o gênero *Alouatta*, porém somente em dois pares de espécies a hibridação parece estar ocorrendo (AGOSTINI et al., 2008; AGUIAR et al., 2007, 2014; BICCA-MARQUES et al., 2008; BÜNTGE e PYRITZ, 2007; CORTÉS-ORTIZ et al., 2009; CRUZ LIMA, 1945; DEFLER, 1994; DIAS et al., 2015; DI BITETTI, 2005; GREGORIN, 2006; HERNÁNDEZ-CAMACHO e COOPER, 1976; HORWICH e JOHNSON, 1986; IWANAGA e FERRARI, 2002; KINZEY, 1982; NAPIER, 1976; PINTO e SETZ, 2000; SMITH, 1970; WALLACE et al., 2000).

Casos de hibridação foram geneticamente comprovados para populações selvagens de *A. palliata* e *A. pigra* no México. Cortés-Ortiz et al. (2007) utilizou genes específicos (mitocondrial, locus microssatélite e o gene *Sry* do cromossomo-Y) de cada espécie para verificar a existência de híbridos em uma população de 36 indivíduos, dos quais 30, revelaram ser híbridos. Foi observado que a hibridização e subsequentes cruzamentos são tendenciosos e que o único cruzamento possível entre as espécies parentais gera fêmeas híbridas férteis, mas não produz machos viáveis ou férteis. Demonstrando que estas espécies ainda não atingiram o completo isolamento reprodutivo, o que pode ser explicado pela regra de Haldane (1922).

Para *A. caraya* e *A. g. clamitans* foram descritos três possíveis casos de hibridação na natureza (AGOSTINI et al., 2008; AGUIAR et al., 2007, 2008; BICCA-MARQUES et al., 2008) e um caso de hibridação em cativeiro (de JESUS et al., 2010). Agostini et al. (2008) descreveu um grupo misto de *A. caraya* e *A. g. clamitans* (um macho e uma fêmea de *A. g. clamitans* adultos e uma fêmea adulta de *A. caraya*), nesta descrição a autora fala na imigração da fêmea *A. caraya* para um grupo até então puro de *A. g. clamitans*. Durante o período em que o grupo foi observado a fêmea *A. caraya* teve dois filhotes (com a

pelagem apresentando um mosaico com as colorações esperadas para as duas espécies). Ambos os filhotes morreram antes de atingir a idade adulta, o primeiro foi perdido durante o período em que o grupo não estava sendo observado e o segundo morreu juntamente com o restante do grupo devido a um surto de febre amarela (mais detalhes sobre epizootia de febre amarela, ver BICCA-MARQUES e FREITAS, 2010). Porém, Mallet (2005) afirma que a identificação morfológica de indivíduos híbridos é difícil devido ao polimorfismo ancestral, à plasticidade fenotípica, às tendências evolutivas, convergências evolutivas ou até mesmo casos de mutação em genes que expressam os padrões de coloração, podendo dar a aparência de híbridos a indivíduos puros. Uma nova localidade foi descrita por Dias et al. (2015) como zona de contato, que conta com grupos de *A. caraya* e *A. g. clamitans*, o estudo detalha um grupo composto por indivíduos de ambas as espécies e acrescenta a presença de possíveis indivíduos híbridos.

As zonas de contato entre duas espécies muitas vezes acabam gerando indivíduos híbridos, o estudo destes indivíduos é necessário para um melhor entendimento das pressões exercidas por processos evolutivos (e.g. surgimento de uma nova espécie) e da manutenção das zonas híbridas de forma temporal/espacial.

Aguiar (2008) afirma que a existência de híbridos e grupos mistos de *A. caraya* e *A. g. clamitans* indica isolamento reprodutivo incompleto entre as espécies. Com a possibilidade destes mecanismos de isolamento reprodutivo serem diluídos por hibridização e introgressão (ARNOLD e MEYER, 2006), o que a longo termo pode gerar a extinção local de uma ou ambas as espécies (DETWILER et al., 2005). Pode haver a perda intrínseca do fitness em indivíduos híbridos, a zona híbrida passa então a ser uma barreira que detém o fluxo gênico entre as espécies parentais. Entretanto, adaptações a diferentes ambientes, nos quais os híbridos podem ser mais adaptados, podem ajudar a manter a zona híbrida (CORTÉS-ORTIZ et. al., 2015).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi fornecer evidências quanto à presença de indivíduos híbridos em grupos mistos de *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*, em uma área de mata ciliar recentemente descrita no município de São Vicente do Sul, RS - Brasil.

1.5.2 Objetivos específicos

- i. Verificar a frequência de grupos mistos na região;
- ii. Utilizando de marcadores moleculares (fragmento do *Cytb*) comparar geneticamente indivíduos considerados puros com indivíduos de bandos mistos que possuam características morfológicas descritas como sendo de híbridos;
- iii. Por meio da análise dos marcadores maternos e nucleares nos indivíduos híbridos, determinar a direção preferencial da fertilidade no cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes;
- iv. Analisar de fragmentos nucleares clivados com a enzima de restrição BspLI (CAPS - *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), comparando os fragmentos correspondentes (esperados) para cada espécie com os resultados obtidos com as análises do DNA mitocondrial e ainda o fenótipo do indivíduo que forneceu a amostra.

2 ARTIGO - “HIBRIDAÇÃO NATURAL EM PRIMATAS DO NOVO MUNDO: NOVA EVIDENCIA DE HIBRIDAÇÃO NO GRUPO DOS BUGIOS”

Natural hybridization in new world primates: new evidence of hybridization in howler monkeys group

^{1*}DIAS, T.D., ^{1,2}GRAICHEN, D.A.S., ^{1,3}FORTES, V.B.

1. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. Laboratório de Genética Evolutiva, Universidade Federal de Santa Maria, Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul, Brasil.

3. Laboratório de Primatologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

* Corresponding Author: Thomas Dickel Dias (thomas.ddias@gmail.com)

Palavras-chave: Mixed groups. Hybrid. Howler monkey. Hybrid zone. New world primates.

Acknowledgment: We would like to thank everyone who made this work possible. The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial aid. Finally, our thanks to all members of the laboratories of: Evolutionary Ecology and Primatology who helped in some way.

ABSTRACT

There are several reports of contact zones between two species of primates of the genus *Alouatta*, in a few cases, forming mixed groups. The morphological variation caused by the gene flow in hybrid primates still has not been well understood. Therefore, it is important to conduct studies to determine the presence of hybrid individuals. A contact zone described in southern Brazil has the presence of possible hybrids of *A. caraya* and *A. g. clamitans*. Our goal in was: by mean of molecular markers (*Cytb* fragment) genetically compare pure individuals with those already described with morphological characteristics for possible hybrids; and execute the analysis of nuclear fragments by comparing the corresponding fragments for each species with the results obtained with mitochondrial DNA and phenotype analyzes. Once located, the individuals were photographed and their feces collected for molecular analysis. We identified 22 groups, 6 of these are mixed groups. In 3 of 5 samples showed mitochondrial genotypes of *A. caraya*, in the other two: one show mitochondrial genotype of *A. guariba* and in the other one the mitochondrial genotype was not accessed, in all of these five samples the nuclear genotype showed to be of *A. g. clamitans*. In 5 samples we identified as belonging to heterozygous individuals with staining patterns identified as hybrids. Individuals with nuclear markers of *A. g. clamitans* and mitochondrial markers of *A. caraya* could indicate that to some point there is viability of the hybrid. Our study provides new evidences of genetically the hybridization between *Alouatta caraya* and *A. g. clamitans*; the viability of hybrid females; and the potential direction of the cross between the species. These results will favor new branches of study.

Keywords: CAPS. Mixed groups. Hybrids. Howler monkey. Hybrid zone. New world primates.

Introduction

The genus *Alouatta* is considered by most of primatologists the most successful genus of all New World primates, largely due by the ecological dominance, but it is notable the habit (unusual for neotropical primates) to be mainly folivore (Kowalewski et al., 2015). Representatives of the genus can be found inhabiting forest environments from southern Mexico to northern Argentina (Cortés-Ortiz et al., 2015a). The wide distribution of the *Alouatta* species in the Neotropical region, in many cases, ended up forming contact zones within the geographic distribution of some species of the genus. To this date, 14 contact zones are described for *Alouatta* species (*A. palliata* x *A. pigra*, *A. palliata* x *A. seniculus*, *A. caraya* x *A. guariba clamitans*, *A. g. guariba* x *A. g. clamitans*, *A. discolor* x *A. sara purensis*, *A. caraya* x *A. sara* and *A. macconelli* x *A. nigerrima*, Cortés-Ortiz et al., 2015b). However, few are the studies exploring ecological, behavioral and genetic aspects in the distribution limits of the *Alouatta* species. However, available studies have reported that cases of sympatry and potential hybridization are rare (Cortés-Ortiz et al., 2015b).

Hybridization cases were genetically demonstrated for wild populations of *A. palliata* and *A. pigra* in Mexico (Cortés-Ortiz et al., 2007). The authors used specific molecular markers (mitochondrial, microsatellite locus and *Sry* gene of the Y chromosome) of each species to verify the existence of hybridization in a population of 36 individuals, of which 30 showed to be hybrids. It was been observed that hybridization and subsequent crosses are biased and that the only possible cross between parent species generates fertile hybrid females, but does not produce viable or fertile males. Evidencing that these two species have not yet reached full reproductive isolation, this is explained by Haldane's rule (1922).

In the case of *A. caraya* and *A. g. clamitans* were described four possible cases of hybridization in the wild, the use of hybridization in captivity (Agostini et al. 2008;

Aguiar et al. 2007, 2008; Bicca-Marques et al., 2008; Dias et al. 2015), and one case of hybridization in captivity (de Jesus et al. 2010). However, in none of these cases molecular markers were used to demonstrate the occurrence of hybridization. Agostini et al. (2008) described a mixed group of *A. caraya* and *A. g. clamitans* (one adult male and one female of *A. g. clamitans* and one adult female of *A. caraya*). The authors report the copulation between the female of *A. caraya* with the male of *A. g. clamitans*, in two different occasions the female gave birth, both offspring died before reaching maturity.

A contact zone (a probable extension of the contact zone described by Silva 2010 and Bicca-Marques et al. 2008), with groups of *A. caraya* and *A. g. clamitans*, has been described by Dias et al. (2015). The area counts on the presence of one mixed group composed by individuals of both species and individuals with different staining patterns than expected for *A. caraya* or *A. g. clamitans* (possible hybrids).

Nevertheless, the morphological identification of hybrid individuals may be difficult due to ancestral polymorphism or even mutations in genes expressing the staining patterns, which may give the appearance of hybrids to pure individuals (Mallet 2005). Contact zones between species often end up generating hybrid individuals (hybrid zones); the study of these individuals is necessary for a better understanding of the pressures exerted by evolutionary processes (e.g. the emergence of a new species) and the maintenance of hybrid zones in a temporal/spatial manner.

Implications

The existence of hybrids and mixed groups of *A. caraya* and *A. g. clamitans* may indicate incomplete reproductive isolation among the species (Aguiar et al. 2008). With the possibility that these mechanisms of reproductive isolation be diluted by hybridization and introgression (Arnold and Meyer 2006), which in the long term can generate the local extinction of one or both species (Detwiler et al., 2005).

In general, molecular markers have led to numerous findings of hybridization cases, sometimes confirming hybrid zones of suspicions raised by morphological studies, and other times revealing cases of cryptic hybridization (Cortés-Ortiz et al. 2007). Mitochondrial DNA, because it possesses uniparental inheritance, absence of recombination and mutation rate greater than nuclear DNA, is the most used genetic marker (Charlesworth 2009; Whitworth et al., 2007). On the other hand, the exclusive use of mitochondrial DNA does not allow to analyze the presence of heterozygotes nor to infer possible cases of introgression. In this sense, DNA fragments from non-coding nuclear regions are important for evolutionary studies, because they have high evolutionary rates, and have a biparental inheritance allowing the analysis of heterozygotes.

Thus, the objective of this study was to provide evidence regarding the presence of hybrid individuals between *Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans* in pure and mixed groups, in a contact zone described in the municipality of São Vicente do Sul, state of Rio Grande do Sul, south of Brazil. As well as: (1) to verify the frequency of mixed groups in the region; (2) to genetically compare individuals considered pure with individuals from mixed groups that have morphological characteristics described as being of hybrids; (3) to determine the preferred direction of the crossing between individuals of different species.

Methods

Study site

The study area is located in the city of São Vicente do Sul (Fig. 1), located in the Central Depression of Rio Grande do Sul (29°46 "S, 54°44" W), in the Pampa biome (IBGE 2004). The study area comprises field-forest mosaics, where: approximately 500

ha of riparian forest of the Ibicuí River and small tributaries composed of deciduous tree species (IBGE 2004). The riparian forests form a canopy of medium height, between 7 and 15 m, with few individuals standing out due to the high stem diameter and some specimens of *Syagrus romanzoffiana* (Arecacea) rising above the crowns (Giongo and Waechter 2004).

Data collection

Field sampling (data collection) was carried out for 10 days/month from January to December in the year 2016. Initially, visual searches were carried out with the purpose of locating the groups and identifying their composition (i. e. mixed group, composed of *A. caraya* and *A. g. clamitans*, a pure group composed of *A. caraya* or *A. g. clamitans*). During the search, all the individuals visualized and their geographical coordinates were registered, with the aid of: binoculars 20x180x100, camera SONY® mod. DSC-HX400v and Garmin® Monterra 650 GPS device.

In a second step, stool specimens were collected from the environment, whenever possible with visual identification at the time of defecation and packed in sterile Falcon® tubes with a capacity of 30 ml containing 15 ml absolute alcohol (99.3%). The same amount of feces was placed in each flask (15 ml) and then kept under refrigeration (-20° C) until analysis (Stoner and Di Pierro 2006).

Molecular Analyzes

We performed the extraction of the total DNA samples from 180-220 mg of stool using the QIAmp® DNA Stool Mini kit (QIAGEN®) and following the manufacturer's recommendations. The mitochondrial DNA (maternal lineage) was analyzed from a fragment of the Cytochrome b gene (with 876 base pairs). The PCR

followed the protocol described in Palumbi (1996) and the fragment was sequenced automatically using the Sanger method in the ABI3500 equipment.

The nuclear genome was accessed from the PCR amplification of a fragment of the Intron 3 of the MECP2 gene. For this amplification, we use the primers Intron 3F (5' - CAC GGA AGC TTA AGC AAA GG - 3') and Intron 3R (5'- CTG GGG ACT GTG AGG ACA AA - 3'), designed for this study, in a volume of 25 µl containing the following reagents: 2 µL DNA + 1 µL MgCl₂ + 0,1 µL *Platinum[®] TaqDNA Polymerase High Fidelity* + 0,25 µL Primer Intron 3F (20µM) + 0,25 µL Primer Intron 3R (20µM) + 0,5 µL dNTP's + 2,5 µL Buffer + 18,4 µL Milli-Q[®] water). In the thermocycler, 35 replicates were performed (initial hold of 94 °C for 3 min and final hold of 72 °C for 5 min) of the following cycles: 94 °C for 45 sec, 55 °C for 45 sec, and 72 °C for 90 sec.

The PCR amplification products with Intron 3 primers were purified and then an enzymatic digestion was performed to access the differential cleavage sites between *A. caraya* and *A. g. clamitans*. In CAPS markers, the genotype is identified by the differential cleavage of an amplified fragment. For the accomplishment of this work, we made the search for a differential site among the studied species. For this, using the GenBank platform, the available nuclear marker sequences were accessed for both species. Then the sequences were analyzed in the BioEdit software in the attempt to verify the presence of differential cleavage sites. After this analysis, the BspLI enzyme was cleaved three times for *A. caraya* intronic fragment yielding four fragments (389bp, 235bp, 106bp and 17bp) and cleaved twice the fragment of *A. g. clamitans* generating three fragments (624bp, 106bp, and 17bp). For validation purposes, samples of the nuclear gene PCR products were sequenced.

In order for the amount of amplified DNA to be satisfactory, in some cases, we made reamplifications from PCR products purified from band cutting of the agarose gel.

The procedures performed in our laboratory were performed in a restricted environment and samples manipulated by only one of the researchers. The reagents were often tested for contamination and the disposable materials used were always new. As well as, the agarose gels and the scalpel blades used to cut each band for purification.

The sequence quality analysis was performed on Staden Package Gap 4 software (version 2.0.0) and alignment was performed using ClustalW, implemented in Mega 7 software (version 7.0.26), with all polymorphic positions were confirmed by visual inspection of the chromatograms.

The identification of the mitochondrial marker was done using Blastn, and identification of the nuclear marker was performed by means of 2% agarose gel electrophoresis after cleavage. The diversity indexes (number of haplotypes, haplotype diversity and nucleotide diversity) were calculated only for the mitochondrial marker, using the program DNAsp 5.0 (Librado and Rozas 2009). In parallel to the generation of data in our laboratory, DNA sequences of the mitochondrial DNA markers of the *A. caraya* and *A. g. clamitans* species were obtained from the GenBank database for comparison with the sequences generated in this study. Comparisons of mitochondrial and nuclear genotypes and phenotype were performed for each individual, the molecular data generated in this study was deposited in the GenBank database.

Ethical Note

Non-invasive collection procedures (collection of feces from the environment) were used in this study. The collections only started after obtaining a biological sampling license for scientific purposes, provided by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) / Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

(SisBio), linked to the Ministério do Meio Ambiente - MMA); registration number: 54542-1, ICMBio; and authentication code number: 83526967, SisBio.

Results

Groups

We covered 590.1 km in 97 days from January 2016 to December 2016 (except July and November). We identified 22 groups: 4 groups containing only individuals with *Alouatta caraya* phenotype, 12 groups containing only individuals with *Alouatta guariba clamitans* phenotype and 6 groups of mixed composition.

The mean number of individuals per group of *A. caraya* was 6.25 (\pm SD 3.1); for *A. g. clamitans*, despite having the largest number of groups in the study area ($n = 12$) their mean was slightly lower, with 5.08 (\pm SD 2.4) individuals per group; mixed groups showed the highest number of individuals ($n = 6$) with the mean of 6.5 (\pm SD 2.7) individuals per group (Table 1).

Individuals with the phenotype different from that described in the literature, like pure individuals of *A. caraya* or *A. g. clamitans* were previously classified in this study as possible hybrids, 14 in total. Two adult males with a similar pattern of coloration to *A. caraya*, but both with reddish tones in the head / neck and back region and tail with copper orange color, one male in mixed group and one in a pure group of *A. caraya*. And the other individuals ($n = 12$) were all adult females with the phenotype similar to *A. g. clamitans*, but all of them with coloring mosaics that ranged from yellow to reddish color (for details of morphotypes, Fig. 2).

Samples and analysis

We collected 39 stool samples from which we extracted the DNA samples. Due to the presence of numerous factors that influenced the PCR (presence of inhibitors, degraded DNA, etc.), only a portion of the collected samples presented viability to perform the procedures required for this research: 22 samples amplified mitochondrial DNA and 18 samples amplified nuclear DNA, (Appendices A and B), 16 samples amplified both markers.

After Blastn analysis, we found that mitochondrial DNA sequences correspond to the *A. caraya* genotype, even for those individuals with different staining patterns (including females with colorations very close to those expected for *A. g. clamitans*). Except for one sample (sequence) showing the genotype (mitochondrial and nuclear) compatible with *A. guariba* (unfortunately, we were unable to record the phenotype of this individual during field samplings).

The polymorphism analysis of mitochondrial DNA sequences (only the corresponding sequences for *A. caraya*, 501 base pairs) evidenced the presence of four haplotypes ($h = 4$) with three polymorphic sites ($S = 3$), the haplotypic diversity (Hd) was 0.625 ± 0.012 and nucleotide diversity (π) was 0.0014 ± 0.001 . We based the pairwise distance analysis performed in this study on a series of previous studies obtained through GenBank. The sequences from previous studies showed the distance between *A. guariba* x *A. caraya* as 4 % and between *A. guariba* x *A. g. clamitans* as 1 %; between *A. g. clamitans* x *A. caraya* as 5 %. The analysis performed in this study showed the distance between *A. g. clamitans* x *A. caraya* as 5.9 %.

The analysis of the nuclear DNA marker, after submitted to the CAPS procedure, evidenced that 7 samples corresponded to *A. caraya* pattern, 6 of these, presented the mitochondrial genotype also of *A. caraya* and in 2 samples it was not

possible to access the mitochondrial genome. The nuclear genotype of *A. g. clamitans* was found in 5 samples, 3 of these, with mitochondrial genotypes of *A. caraya* and 1 with mitochondrial genotype of *A. guariba*, in just one sample the mitochondrial genotype was not accessed. Interestingly, 5 samples belonged to heterozygous individuals, 4 of which were photographed (Fig. 3A, B, C and D), and corresponded to staining patterns identified as hybrids. These heterozygous individuals, in the analysis of the Intron 3 polymorphism of the MECP2 gene, showed cleavage sites present in both *A. caraya* and *A. g. clamitans* (Appendix C). A young male with *A. caraya* phenotype and mitochondrial genotype showed *A. g. clamitans* (sample 20), evidencing a case of cryptic hybridization, possibly backcrossing result.

Discussion

Mixed groups formation

The mixed groups of this study always presented a dominant *A. caraya* male (in one case with the hybrid staining pattern) and despite the number of females of *A. g. clamitans* in mixed groups be expressive ($n = 13$), no competition was observed. This may be related to males of *A. g. clamitans* are showing a lower dispersion rate when compared to females of the same species. The dispersion rates for *A. caraya* individuals could be influenced by environmental pressures, and could be differentiated rates between males and females (Oklander et al. 2010). In the case of *A. g. clamitans* habitat fragmentation may be restricting migration, favoring inbreeding (Fortes and Biccamarques, 2008).

Despite that observed by Cortés-Ortiz et al. (2007, 2014), the occurrence of hybrid zones in primates and especially in the *Alouatta* genus can be promoted by environmental changes of anthropic origin. Such as forest fragmentation that confines few individuals to small fragments and reduce the chances of finding co-specific partners or increase the need for them to move between fragments to find food, which can lead to more frequent contact with groups of other species and interspecific crosses.

The hybrid zone, in this case, appears to be a natural event since the landscape of this region is naturally fragmented (ecotone between Atlantic Forest biome and Pampa biome). The wellspring of the Ibicuí river is located in Decidual Seasonal Forest area (less than 56 km from the study area), typically inhabited by *A. g. clamitans* from which the expansion of the geographic distribution of the species seems to be occurring. Since, we can only find purebred groups of *A. g. clamitans* in the gallery forest of the Ibicuí river. We think, at least in part, that this fact corroborates the hypothesis presented by Bicca-Marques (2008) that the expansion of the gallery forests containing natural elements of the Atlantic Forest would have favored the contact between species.

Hybrid individuals

Surprisingly, all heterozygous individuals (samples: 03, 17, 23, 34, 35, 38) showed the mitochondrial genotype of *A. caraya*, which may indicate the preferential cross between males of *A. g. clamitans* with *A. caraya* females. Dias et al. (2015) observed the presence of satellite males of *A. g. clamitans* surrounding both mixed and purebred groups of *A. caraya*. This reinforces the hypothesis that males of *A. g. clamitans* would be crossing with *A. caraya* females, however, we did not observe any kind of copulation event in this or previous studies of the same study area.

In addition, genetic analyzes show that although males of mixed groups are predominantly *A. caraya* there is a considerable rate of nuclear markers of *A. g. clamitans* associated with *A. caraya* mitochondrial markers, indicating that heterozygous females with *A. caraya* mitochondrial genotype are, at least in part, fertile. In previously studies fertile hybrid females has already been observed, between *A. pigra* x *A. palliata*, by Cortés-Ortiz et al. (2007).

We did not measured the fitness of hybrid individuals in this study, however during the field-sampling period we do not observed hybrid-stained females with offspring's. However, the presence of individuals with nuclear markers of *A. g. clamitans* and mitochondrial markers of *A. caraya* indicate the existence of a certain degree of viability of the hybrids, as evidenced by Cortés-Ortiz et al. (2007), in Mexico in populations of a hybrid zone of *A. pigra* x *A. palliata*. In the case of males, one apparently hybrid is dominant in a mixed group; and the second, which was confirmed in this study as a hybrid, was seen only once with an *A. caraya* female. In the mixed group with a dominant hybrid male, there was one female of *A. caraya* with one infant and two juveniles (without sex identification) from two different *A. caraya* females.

Conclusion

In this study, we provide new (genetic) evidences of the hybridization between *Alouatta caraya* and *A. guariba clamitans*, the viability of hybrid females and the potential fertility direction of crossbreeding among parental species. With these results, we hope to promote new fields of study (e.g. ecological, genetic / evolutionary, behavioral, conservational, etc.).

The CAPS analysis showed to be a good alternative technique and cheap when compared with microsatellite markers, taking due care in the handling and reproduction

of the samples, this technique can easily identify hybrid individuals in a given population.

For a better understanding of the functioning of the hybridization mechanism between *A. caraya* and *A. g. clamitans*, it is still necessary to clarify how the hybridization patterns influences the fitness of hybrid individuals through genetic data. This kind of data will allow the maintenance/alteration of taxonomic data, in what way the behavior of mixed groups and hybrid individuals are affected in this hybrid zone. With those information presented in this work, together with these outstanding issues, described above, may in the future help researchers to develop strategies for the conservation not only of the target species of our study, but may even help other species of primates.

Table 1 Mean by sex/age: adult male (AM), adult female (AF), immature = subadults + juveniles (IM) and infants (INF), for mixed and purebred groups of *Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans*. Mean and standard deviation (SD) of individuals per group for mixed and purebred.

Mixed				Purebred							
				<i>Alouatta caraya</i>				<i>Alouatta guariba clamitans</i>			
AM	AF	IM	INF	AM	AF	IM	INF	AM	AF	IM	INF
0.83	4	0.83	0.83	1	2.75	1.25	1.25	1.58	2.33	0.75	0.41
±	±	±	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD
SD	SD	SD	0.98	0.0	1.5	1.41	0.95	0.67	1.49	1.16	0.51
0.40	1.26	0.75									
6.5 ± SD 2.7				6.25 ± SD 3.09				5.08 ± SD 2.43			

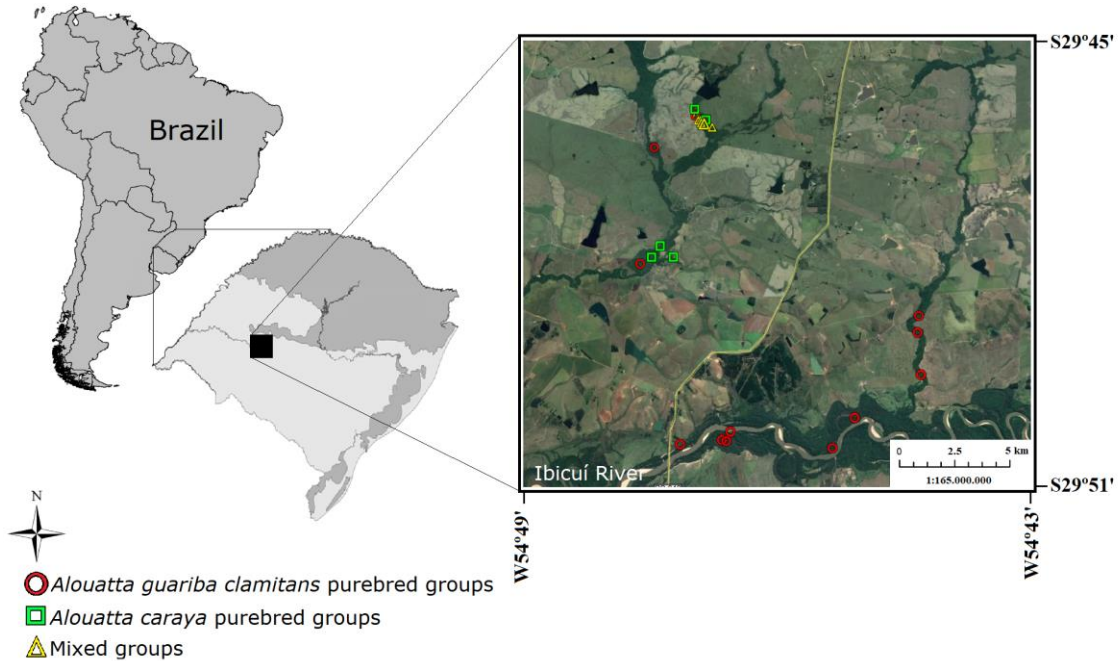


Fig. 1 Location of the study area in São Vicente do Sul, state of Rio Grande do Sul, Brazil. Circles indicates the location of *Alouatta guariba clamitans* purebred groups, squares indicates the location of *Alouatta caraya* purebred groups and triangles indicates the location of mixed groups.

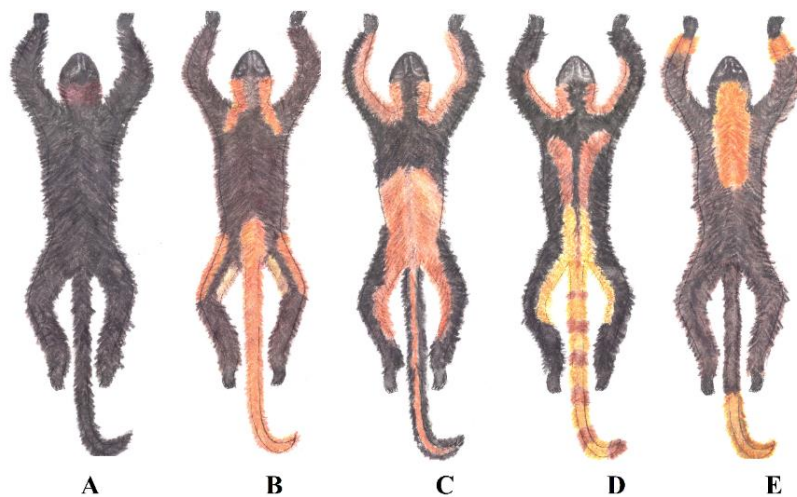


Fig. 2 Hybrid morphotypes of *Alouatta caraya* x *A. guariba clamitans* identified in the study area. A - Young male with predominant coloration of *A. caraya*. B - Adult female with mosaic of female and male colors of *A. g. clamitans*. C - Adult female with predominant staining of *A. g. clamitans* male with mosaics of the black coloration of the male of *A. caraya*. D - Adult female with predominant staining of *A. caraya* male and mosaics with *A. caraya* female staining on back and staining of *A. g. clamitans* in the anterior part. E - Adult female with predominant staining of *A. g. clamitans* and mosaics of the coloring of the female of *A. caraya* on the tip of the tail and mosaics with copper coloration on the anterior part.



Fig. 3 Hybrid individuals of mixed groups of *Alouatta caraya* x *A. guariba clamitans* (A = adult female, B = adult female, C = adult female, D = young male) photographed in the study area, São Vicente do Sul, Rio Grande do Sul - Brazil.

References

- Agostini, I., Holzmann, I., Di Bitetti, M. S. (2008). Infant hybrids in a newly formed mixed-species group of howler monkey (*Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. *Primates*, 49, 304-307.
- Aguiar, L. M., Pie, M. R., Passos, F. C. (2008). Wild mixed groups of howler species (*Alouatta caraya* and *Alouatta clamitans*) and new evidence for their hybridization. *Primates*, 49, 149-152.
- Aguiar, L. M., Mellek, D. M., Abreu, K.C., Boscarato, T. G., Bernardi, I.P., Miranda, J. M. D., Passos, F. C. (2007). Sympatry of *Alouatta caraya* and *Alouatta clamitans* and the rediscovery of free-ranging potential hybrids in Southern Brazil. *Primates*, 48, 245–248.
- Arnold, M. L., & Meyer, A. (2006). Natural hybridization in primates: one evolutionary mechanism. *Zoology*, 109, 261–276.
- Bicca-Marques, J. C., Prates, H. M., Aguiar, F. R. C., & Jones, C. B. (2008). Survey of *Alouatta caraya*, the black-and-gold howler monkey, and *Alouatta guariba clamitans*, the brown howler monkey, in a contact zone, State of Rio Grande do Sul, Brazil: evidence for hybridization. *Primates*, 49, 246-252.
- Charlesworth, B. (2009). Effective variation size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews*, 10, 195-205.
- Cortés-Ortiz, L., Rylands, A.B., & Mittermeier, R.A. (2015a). *The Taxonomy of Howler Monkeys: Integrating Old and New Knowledge from Morphological and Genetic Studies*. Chap 3 In: Kowalewski, M., Garber, P., Cortés-Ortiz, L., Urbani, B., & Youlatos D. (Ed.) *Howler Monkeys: Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* (pp. 55-84). New York, Springer.
- Cortés-Ortiz, L., Agostini, I., Aguiar, L. M., Kelaita, M., Silva, F. E., & Bicca-Marques, J. C. (2015b). Hybridization in Howler Monkeys: Current Understanding and Future Directions. Cap 5 In: Kowalewski, M., Garber, P., Cortés-Ortiz, L., Urbani, B., & Youlatos D. (Ed.) *Howler Monkeys: Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology* New York, Springer, 107-131.
- Cortés-Ortiz, L., Rylands, A. B., & Mittermeier, R.A. (2014) Howler monkeys: adaptive radiation, systematics, and morphology. In: M. Kowalewski, P. Garber, L. Cortés-Ortiz, B. Urbani, & D. Youlatos. (Ed.) *Howler monkeys: examining the adaptive radiation, systematics and morphology of the most widely distributed genus of Neotropical primate*. New York, Springer.
- Cortés-Ortiz, L., Duda, T. F. J., Canales-Espinosa, D., García-Orduña, F., Rodríguez-Luna, E., & Bermingham, E. (2007). Hybridization in large bodied New World primates. *Genetics*, 176, 2421–2425.
- Detwiler, K. M., Burrell, A.S., & Jolly, C.J. (2005). Conservation implications of hybridization in African cercopithecine monkeys. *International Journal of Primatology*, 26, 661–684.
- Dias, T. D., Conceição, M. S., Murer, L. & Fortes, V. B. (2015). Extension of the contact zone and probable hybridization between brown howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) and black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) (Primates, Atelidae) in southern Brazil. *Mastozoología Neotropical*, Mendoza, 22 (2), 303-310

- Fortes, V. B., & Bicca-Marques, J.C. (2008). Abnormal pelage color in a isolated population of *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940 in south Brazil. *International Journal of Primatology*, 29, 717-722.
- Giongo, C., & Waechter, J. L. (2004). Composição florística e estrutura comunitária de epífitos vasculares em uma floresta de galeria na Depressão Central do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Botânica*, 27, (3), 563-572.
- Haldane, J. B. S. (1922). Sex-ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics*, 12, 101-109.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004). Mapa da vegetação do Brasil e Mapa de Biomas do Brasil. <http://ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm> Accessed 02 december 2015.
- de Jesus, A. S., Schunemann H.E., Müller, J., da Silva, M.A., & Bicca-Marques, J.C. (2010). Hybridization between *Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans* in captivity. *Primates*, 51, 227-230.
- Kowalewski, M. M., Garber, P. A., Cortés-Ortiz, L, Urbani, B., Youlatos, D. (Ed.) (2015). *Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation*. Springer, New York.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v.5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 2496-2597.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229-237.
- Oklander, L. I., 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, 813-832.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic Acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA, 205-247.
- Silva, F. E. (2010). Extensão da zona de contato e potencial hibridação entre *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* na região de São Francisco de Assis, RS. M.Sc. dissertation. Porto Alegre, Brasil
- Stoner, E. K., & Di Pierro, A. M. G. (2006). Intestinal parasitic infections in *Alouatta pigra* in tropical rainforest in Lacandona, Chiapas, Mexico: Implications for behavioral ecology and conservation. In: A. Estrada; P. A. Garber; M. Pavelka & L. Luecke (Ed.), *New perspectives in the study of Mesoamerican primates. Distribution, ecology and conservation*. New York, Springer, 215-240.
- Whitworth, T., Dawson, R. D., Magalon, H., & Baudri, E. (2007). DNA barcoding reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora*. *Proceedings of the Royal Society*, 274, 1731-1739, doi: [10.1098/rspb.2007.0062](https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0062)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de amostragem não invasivo (amostra de fezes) é um método de coleta relativamente fácil de ser empregado, pois a equipe de coleta pode ter seu número reduzido (facilitando o encontro dos grupos) e apresenta risco nulo favorecendo o bem-estar animal. Por outro lado, o processamento das amostras é longo e trabalhoso, os kits e reagentes utilizados para a extração, amplificação e purificação dos DNAs possuem alto custo e não há garantia de sucesso.

Análises realizadas com amostras de tecido (sanguíneo, muscular, etc.) podem ser feitas utilizando kits e reagentes genéricos que possuem baixo custo e entregam resultados excelentes. Mas neste caso, os esforços e custos de campo dobram ou até mesmo triplicam, para a contenção química dos animais são necessários equipamentos específicos (rifle projetor de dardos, dardos, agulhas, estabilizadores, anestésicos, rede de contenção, etc.) além da supervisão de ao menos um profissional da medicina veterinária.

A experiência em laboratório evidenciou que: ao trabalhar com amostras fecais, em alguns casos, os protocolos precisam ser adaptados ou até mesmo criados. Mesmo com a presença de substâncias anti-inibidores, à amplificação das amostras de DNA se mostrou desafiadora e apenas 24 de 39 amostras foram amplificadas com sucesso, em alguns casos foram necessárias reamplificações.

Em relação ao trabalho de campo, neste trabalho o ideal teria sido identificar fenotipicamente todos os indivíduos que geraram as amostras de fezes, mas o tempo necessário para desempenhar esta tarefa impossibilitaria a execução deste trabalho em tempo hábil (2 anos ou menos). Além disso, é comum que os bugios, de grupos não habituados, defiquem com a presença do pesquisador. Em muitos casos mais de um indivíduo acaba defecando simultaneamente, dificultando a identificação (visual/fotográfica) pelo pesquisador no momento da coleta.

Em função destas dificuldades, em geral existem poucos estudos genéticos com espécies de *Alouatta*, isto significa que há pouco material de referência e muito precisa ser criado para que o trabalho possa ser realizado, foi o caso dos marcadores nucleares (Íntron 3) que precisaram ser desenhados especificamente para este trabalho.

Em conclusão, com este trabalho foi possível: i) fornecer novas evidências genéticas da hibridação entre *Alouatta caraya* e *A. guariba clamitans*, este resultado irá favorecer novos ramos de estudo (ecológicos, genético/evolutivos, comportamentais,

conservação, etc.) com as espécies envolvidas; ii) a viabilidade de fêmeas híbridas entre estas duas espécies; iii) a direção preferencial da fertilidade entre as espécies parentais. Mas ainda é preciso: i) saber até que ponto a hibridação influencia o fitness dos indivíduos híbridos, ii) obter novos dados genéticos que possibilitem a manutenção ou alteração de dados taxonômicos, iii) coletar dados comportamentais dos grupos mistos e indivíduos híbridos. Desta forma, estaria disponível um leque de informações que futuramente podem auxiliar pesquisadores a traçar estratégias de conservação de ambas as espécies de primatas.

REFERENCIAS

- AGOSTINI, I.; HOLZMANN, I.; DI BITETTI, M.S. **Ranging patterns of two syntopic howler monkey species (*Alouatta guariba* and *A. caraya*) in Northeastern Argentina.** International Journal of Primatology, v. 31, p. 363–381, 2010.
- AGOSTINI, I.; HOLZMANN, I.; DI BITETTI, M. S. **Infant hybrids in a newly formed mixed-species group of howler monkey (*Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*) in northeastern Argentina.** Primates, v. 49, p. 304-307, 2008.
- AGUIAR, L. M.; TONETTO, J.; BICCA-MARQUES, J. C. **Novas zonas de contato entre *Alouatta caraya* e *A. guariba clamitans* no sul do Brasil.** In: Miranda JMD, Passos FC (Ed.) A primatologia no Brasil. Sociedade Brasileira de Primatologia, Curitiba, v. 13. 2014.
- AGUIAR, L. M. **Sistema social de grupos mistos de espécies de bugios (*Alouatta caraya* e *A. clamitans*) e potenciais híbridos no Alto Rio Paraná, sul do Brasil.** 2010, 253 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.
- AGUIAR, L. M.; PIE, M. R.; PASSOS, F. C. **Wild mixed groups of howler species (*Alouatta caraya* and *Alouatta clamitans*) and new evidence for their hybridization.** Primates, v. 49, p. 149-152, 2008.
- AGUIAR, L. M. et al. **Sympatry of *Alouatta caraya* and *Alouatta clamitans* and the rediscovery of free-ranging potential hybrids in Southern Brazil.** Primates, v. 48, p. 245–248, 2007.
- ALMEIDA-SILVA, B. et al. **Deslocamento terrestre e o comportamento de beber em um grupo de barbados (*Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940) em Minas Gerais, Brasil.** Neotropical Primates, v. 13, n. 1, p. 1-3, 2005.
- ARNOLD, M. L.; MEYER, A. **Natural hybridization in primates: one evolutionary mechanism.** Zoology, v. 109, p. 261–276, 2006.
- ARNOLD, M. L. **Evolution through genetic exchange.** Oxford University Press, USA, 2006.
- ARNOLD, M. L. **Natural hybridization and evolution.** Oxford University Press, 1997.
- BARTON, N. H. **The role of hybridization in evolution.** Molecular Ecology, v. 10, p. 551-568, 2001.
- BARTON, N. H.; HEWITT, G. M. **Analysis of hybrid zones.** Annual Review of Ecology and Systematics, v. 16, p. 113-148, 1985.

BEHIE, A. M.; PAVELKA, M. S. M. **Fruit as a Key Factor in Howler Monkeys Population Density: Conservation Implications** Cap 13 In: KOWALEWSKI, M. M.; GARBER, P. A.; CORTES-ORTIZ, L.; URBANI, B.; YOULATOS, D. *Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation*. Nova York, Springer. p. 440, 2014.

BICCA-MARQUES, J. C.; FREITAS, D. S. **The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: protecting howler monkeys is a matter of public health**. *Tropical Conservation Science*, v. 3, n. 1, p. 31-42, 2010.

BICCA-MARQUES, J. C. How Do Howler Monkeys Cope With Habitat Fragmentation? In: **Primates in Fragments: Ecology and Conservation**. Kluwer Academic/Plenum Publishers. p. 283-303.

BICCA-MARQUES, J. C. et al. **Survey of *Alouatta caraya*, the black-and-gold howler monkey, and *Alouatta guariba clamitans*, the brown howler monkey, in a contact zone, State of Rio Grande do Sul, Brazil: evidence for hybridization**. *Primates*, v. 49, p. 246-252, 2008.

BRONSON, C. L. et al. **Mate preference: a possible causal mechanism for a moving hybrid zone**. *Animal Behaviour*, v. 65, p. 489- 500, 2003.

BUGGS, R. J. A., FARM, C., CAPEL, T.; KENT, U. K. **Empirical study of hybrid zone movement**. *Heredity*, v. 99, p. 301-312, 2007.

BÜNTGE, A. B. S.; PYRITZ, L. W. **Sympatric occurrence of *Alouatta caraya* and *Alouatta sara* at the Río Yacuma in the Beni Department, Northern Bolivia**. *Neotropical Primates*, v. 14, p. 82–83, 2007.

COIMBRA, A. A. C. **Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em *Alouatta clamitans* (Primates, Platyrrhini): análise da variabilidade cromossômica dos bugios das regiões sul e sudeste do Brasil**. 2015, 239 p. Tese (Doutorado em Biologia/Genética), Universidade de São Paulo, SP, 2015.

CHIARELLO, A. G. **Primates of the Brazilian Atlantic Forest: The Influence Of Forest Fragmentation On Survival**. In: MARSH, L. K. *Primates in Fragments: Ecology and Conservation*. Nova York, Springer, p. 99-118, 2003.

CONSIGLIERE, S. et al. **Chromosome painting defines genomic rearrangements between red howler monkey subspecies**. *Chromosome Research*, v. 4, p. 264–270, 1996.

CONSIGLIERE, S. et al. **In situ hybridization (FISH) maps chromosomal homologies between *Alouatta belzebul* (Platyrrhini, Cebidae) and other primates and reveals extensive interchromosomal rearrangements between howler monkey genomes**. *American Journal of Primatology*, v. 46, p. 119–133, 1998.

CORTÉS-ORTIZ, L. et al. **Hybridization in Howler Monkeys: Current Understanding and Future Directions.** Cap 5 In: KOWALEWSKI, M. M. et al. (Ed.) *Howler Monkeys: Adaptive Radiation, Systematics, and Morphology.* Nova York, Springer, p. 107-131, 2015.

CORTÉS-ORTIZ, L.; RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R.A. **Howler monkeys: adaptive radiation, systematics, and morphology.** In: KOWALEWSKI M. M. et al. (Ed.) *Howler monkeys: examining the adaptive radiation, systematics and morphology of the most widely distributed genus of Neotropical primate.* Springer, New York, 2014.

CORTÉS-ORTIZ, L.; MONDRADÓN, E.; CABOTAGE, J. **Isolation and characterization of microsatellite loci for the study of Mexican howler monkeys, their natural hybrids, and other Neotropical primates.** *Conservation Genetic Resources*, v. 2, p. 21-26, 2010.

CORTÉS-ORTIZ, L. et al. **Hybridization in large bodied New World primates.** *Genetics*, v. 176, p. 2421–2425, 2007.

CORTÉS-ORTIZ, L. et al. **Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 26, p. 64–81, 2003.

CROCKETT, C. M. Diet, dimorphism and demography: perspectives from howlers to hominids. In: KINZEY, W. G. (Ed.) **The Evolution of Human Behavior: primate models.** New York: State University of New York Press, p. 115-135, 1987.

CRUZ LIMA, E. **Mammals of Amazônia. I. General Introduction and Primates.** *Contrib. Museu Paraense Emílio Goeldi Hist. Nat., Ethnogr., Belém do Pará, Rio de Janeiro*, 1945.

DASMAHAPATRA, K. K. et al. **Inferences from a rapidly moving hybrid zone.** *Evolution*, v. 56, p. 741-753, 2002.

DEFLER, T. R. **La conservación de primates en Colombia. Trianea** (*Act Cien INDERENA*), v. 5, p. 255–287, 1994.

DETWILER, K. M.; BURRELL, A.S.; JOLLY, C.J. **Conservation implications of hybridization in African cercopithecine monkeys.** *International Journal of Primatology*, v. 26, p. 661–684, 2005.

DIAS, T. D. et al. **Extension of the contact zone and probable hybridization between brown howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) and black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) (Primates, *Atelidae*) in southern Brazil.** *Mastozoología Neotropical, Mendoza*, v. 22, n.2, p. 303-310, 2015.

DIAS, P.A.D.; RANGEL-NEGRIN, A. Diets of howler monkeys. In: KOWALEWSKI, M. et al. (Ed.) **Howler monkeys: behavior, ecology and conservation.** Springer, New York. p. 21-56, 2014.

DI BITETTI, M. S. **Perspectivas para a conservação de primatas em Misiones.** In: GALINDO-LEAL, C.; CAMARA I. G. (Ed.) *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas.* Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, Conservação Internacional, Belo Horizonte, 2005.

FERNANDEZ-DUQUE, E., WALLACE, R. B.; RYLANDS, A. B. *Alouatta caraya.* **The IUCN Red List of Threatened Species.** 2008. Disponível em: e.T41545A10496784.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T41545A10496784.en> . Acesso em: 02 de Novembro 2015.

FITZPATRICK, B. M.; SHAFFER, H. B. **Hybrid vigor between native and introduced salamanders raises new challenges for conservation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, v. 104, p. 15793-15798, 2007.

GARBER, P.A.; JELINEK, P.E. **Travel patterns and spatial mapping in Nicaraguan mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*).** In: ESTRADA, A.; GRABER, P. A.; PAVELKA, M. S. M.; LUCKE, L. (Ed.) *New perspectives in the study of Mesoamerican primates: distribution, ecology, behavior and conservation.* Springer, New York, 2006.

GIFALLI-IUGHETTI, C. **Evolução Cromossômica: Estudo da Variabilidade Cariotípica em Platyrrhini e das Homeologias e Sintenias com Cromossomos Humanos.** 2008, 149 p. Tese (Doutorado em Biologia/Genética) – Universidade de São Paulo, SP, 2008.

GRANT, P. R. et al. **Inbreeding and interbreeding in Darwin's finches.** *Evolution*, v. 57, p. 2911-2916, 2003.

GREGORIN, R. **Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil.*** *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, p. 64–144, 2006.

GROVES C. P. **Primate taxonomy.** Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 2001.

HARRIS, E. E. et al. **Cytochrome b sequences show subdivision between populations of the brown howler monkey *Alouatta guariba* from Rio de Janeiro and Santa Catarina, Brazil.** *Neotropical Primates*, v. 13, p. 16–17, 2005.

HERNÁNDEZ-CAMACHO, J.; COOPER, R. **The nonhuman primates of Colombia.** In: THORINGTON, R. JR.; HELTNE, P. (Ed.) *Neotropical primates.* National Academy of Sciences, Washington, DC, 1976.

HORWICH, R. H.; JOHNSON, E. W. **Geographic distribution of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) in Central America.** *Primates*, v. 27, p. 53–62, 1986.

IUCN. **Red List of Threatened Species.** Version 2015-3. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 02 November 2015.

- IWANAGA, S.; FERRARI, S. F. **Geographic distribution of red howlers (*Alouatta seniculus*) in Southwestern Brazilian Amazonia, with notes on *Alouatta caraya*.** *International Journal of Primatology* 23:1245–1256, 2002.
- de JESUS, A. S. et al. **Hybridization between *Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans* in captivity.** *Primates*, v. 51, p. 227–230, 2010.
- JUAN, S.; ESTRADA, A.; COATES-ESTRADA, R. **Contrastes y similitudes en el uso de recursos y patrón general de actividades en tropas de monos aulladores (*Alouatta palliata*) en fragmentos de selva en Los Tuxtlas.** México, *Neotropical Primates*, v.8, p. 131–135, 2000.
- KINZEY, W. G. **Distribution of primates and forest refuges.** In: PRANCE, G. T. (Ed.) *Biological diversification in the tropics.* Columbia University Press, New York, 1982.
- MALLET, J. **Hybridization as an invasion of the genome.** *Trends in Ecology and Evolution*, v. 20, p. 229-237, 2005.
- MARTINS, F. M. et al. **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*, -v.52, p. 77-87, 2011.
- MAYR, E. **Animal species and evolution.** Belknap Press, Cambridge, MA, 1963.
- MELO, F. R. et al. **Primatologia no Brasil: 15 anos de retrospecto e perspectivas futuras.** In: DA ROCHA, R. M.; BOEGER, W. A. *Estado da arte e perspectivas para a Zoologia no Brasil.* Curitiba, UFPR, p.249-270, 2009.
- MENDES, S. L., et al. 2008. ***Alouatta guariba ssp. clamitans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008:** e.T39918A10285929. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39918A10285929.en>> . Acesso em: 02 Nov. 2015.
- MIRANDA, J. M. D.; PASSOS, F. **Hábito alimentar de *Alouatta guariba* (Humboldt) (Primates, Atelidae) em Floresta de Araucária, Paraná, Brasil.** *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, n. 4, p. 821–826, 2004.
- MOORE, W. S. **An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates.** *Quarterly Review of Biology*, v. 52, p. 263-277, 1977.
- NAPIER, P. H. **Catalogue of primates in the British Museum (Natural History), part 1: families Callitrichidae and Cebidae.** British Museum (Natural History), London, 1976.
- NORONHA, M.; CAMPISTA, D. **Sauim de coleira: a história de uma espécie ameaçada de extinção.** 1. ed. Camirim Editorial, Manaus, p.17-35, 2015.

- de OLIVEIRA, E. H. C. et al. **The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, *Platyrrhini*): reconstruction by multi-color cross-species chromosome painting.** Chromosome Research, v. 10, p. 669–683, 2002.
- de OLIVEIRA, E. H. C. et al. **Geographical variation of chromosomal number in *Alouatta fusca clamitans* (Primates, Atelidae).** Caryologia, v. 53, p. 163–168, 2000.
- de OLIVEIRA, E. H. C. et al. **The karyotype of *Alouatta fusca clamitans* from Rio de Janeiro, Brazil: evidence for a y-autosome translocation.** Genetics and Molecular Biology, v. 21, n. 3, p.361–364, 1998.
- de OLIVEIRA E. H. C. **Chromosomal variation in *Alouatta*.** Neotropical Primates, v. 3, p. 181–182, 1995.
- PASSOS, F.C. et al. **Ocorrência e distribuição de primatas no estado do Paraná, sul do Brasil.** p. 119-150. In: J.C. BICCAMARQUES (Ed.). A Primatologia no Brasil. EDIPUCRS, Porto Alegre, v. 10, p. 547, 2007.
- PINTO, L.P.; SETZ, E. Z. F. **Sympatry and new locality for *Alouatta belzebul discolor* and *Alouatta seniculus* in the Southern Amazon.** Neotropical Primates, v. 8, p. 150–151, 2000.
- PORTO, G. S. et al. **Subfamília Alouattinae.** In: dos REIS, N. R. et al. (Org.) **Primates do Brasil: Guia de Campo.** 1. ed. Technical Books, Rio de Janeiro, p. 258–295, 2015.
- REED, K. E.; BIDNER, I. R. **Primates Communities: Past, Present, and Possible Future.** American Journal of Physical Anthropology, v. 47, p. 2-39, 2004.
- dos REIS, N. R. et al. (Org.) **Primates do Brasil: Guia de Campo.** 1. ed. Technical Books, Rio de Janeiro, p. 328, 2015.
- RYLANDS, A. B. e ANZENBERGER G. **Introduction: New World Primates.** International Zoo Yearbook, v. 46, p. 04–10, 2012.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA JR, J. S. **Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies.** International Zoo Yearbook, v. 46, p. 11–24, 2012.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. **The diversity of the New World Primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy.** In: GARBER, P.A. et al. (Ed.). South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology and Conservation. New York, Springer, p. 23-54, 2009.
- SILVA, F. E. **Extensão da zona de contato e potencial hibridação entre *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* na região de São Francisco de Assis, RS.** 2010, 76 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontífice Universidade Católica, Porto Alegre, RS, 2010.

STANYON, R. et al. **Cytogenetic analysis shows extensive genomic rearrangements between red howler (*Alouatta seniculus*, Linnaeus) subspecies.** American Journal of Primatology, v. 35, p.171–183, 1995.

STEINBERG, E. R. et al. **Cytogenetic Characterization of Brown Howler Monkeys, *Alouatta guariba clamitans* (Atelidae, Platyrrhini): Meiotic Confirmation of na X₁ X₁ X₂ X₂ X₃ X₃/X₁ X₂ X₃ Y₁ Y₂ Sex Chromosome System.** Cytogenetic and Genome Research, v. 151, n. 3, p. 10, 2017.

STEINBERG, E. R. **Determinacion sexual en primates neotropicales: el caso de los monos aulladores.** 2011, 242 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de Buenos Aires, 2011.

SMITH, J. D. **The systematic status of the black howler monkey, *Alouatta pigra* Lawrence.** Journal of Mammalogy, v. 51, p.358–369, 1970.

WALLACE, R. B. et al. **Primate diversity, distribution and relative abundances in the Rios Blanco y Negro Wildlife Reserve, Santa Cruz Department, Bolivia.** Neotropical Primates, v. 8, p. 24–28, 2000.

YOULATOS, D.; GUILLOT, D.. **Positional behavior of howler monkeys.** In: KOWALEWSKI, M.et al. (Ed.) Howler monkeys: behavior, ecology and conservation. Springer, New York, p. 191–218, 2014.

YOULATOS, D. **Multivariate analysis of organismal and habitat parameters in two neotropical primate communities.** American Journal of Physical Anthropology, v. 123, p. 181–194, 2004.

APÊNDICE A – Alinhamento das sequencias do gene mitocondrial Citocromo B (*Cyt b*) obtidas a partir das amostras de fezes de *Alouatta caraya* e *A. guariba clamitans*.

```

*      20      *      40      *      60      *
sample 03 : CTTAATGACTACCCCGCAAGACACATCCACTAACAAAAATCATTAAACAACCTCATTGATCTCCCCACA : 73
sample 4  : ..... : 73
sample 5  : ..... : 73
sample 6  : ..... : 73
sample 7  : ..... : 73
sample_08 : ..... : 73
sample_09 : ..... : 73
sample 10 : ..... : 73
sample 12 : ..... : 73
sample_17 : ..... : 73
sample 18 : ..... : 73
sample 21 : TAATTG.....T.....A.....G.....C.....T.....T... : 73
sample 24 : ..... : 73
sample 34 : ..... : 73
sample 35 : ..... : 73
sample 36 : ..... : 73
sample 37 : ..... : 73
sample 39 : ..... : 73

      80      *      100      *      120      *      140
sample 03 : CCATCCAACATTTCCGCGCTGATGAAACTTCGGCTCACTCCTAGGTATTTGCCTAATTATCCAAAATCACTACAG : 146
sample 4  : .....T..... : 146
sample_5  : .....T..... : 146
sample 6  : ..... : 146
sample 7  : ..... : 146
sample_08 : .....T..... : 146
sample_09 : .....T..... : 146
sample 10 : .....T..... : 146
sample 12 : .....T..... : 146
sample_17 : .....T..... : 146
sample 18 : .....T..... : 146
sample 21 : .....C.....T.....T..... : 146
sample_24 : .....T..... : 146
sample 34 : .....T..... : 146
sample 35 : .....T..... : 146
sample_36 : .....T..... : 146
sample 37 : .....T..... : 146
sample 39 : .....T..... : 146

*      160      *      180      *      200      *      22
sample 03 : GTCTATTCCCTAGCCATACATTATACACCAGACACTTCAACTGCCTTTTCCTCAGTCGCCACATCACCCGAGA : 219
sample 4  : .....A..... : 219
sample_5  : ..... : 219
sample 6  : ..... : 219
sample 7  : ..... : 219
sample_08 : ..... : 219
sample_09 : ..... : 219
sample 10 : ..... : 219
sample 12 : ..... : 219
sample_17 : .....A..... : 219
sample 18 : ..... : 219
sample 21 : .....T.....C.....C..... : 219
sample_24 : .....A..... : 219
sample 34 : ..... : 219
sample 35 : ..... : 219
sample_36 : ..... : 219
sample 37 : ..... : 219
sample 39 : ..... : 219

```

APÊNDICE A – *Continuação...*

```

0          *          240          *          260          *          280          *
sample 03 : CGTCAACTACGGCTGAATAATCCGCTACCTACACGCCAACGGCGGCTCCCATATTCTTCATCTGCCTATTCCCTC : 292
sample 4  : ..... : 292
sample_5 : ..... : 292
sample 6  : ..... : 292
sample 7  : ..... : 292
sample_08 : ..... : 292
sample_09 : ..... : 292
sample_10 : ..... : 292
sample_12 : ..... : 292
sample_17 : ..... : 292
sample_18 : ..... : 292
sample 21 : .....T.....C.....C.....T : 292
sample_24 : ..... : 292
sample 34 : ..... : 292
sample 35 : ..... : 292
sample_36 : ..... : 292
sample 37 : ..... : 292
          300          *          320          *          340          *          360
sample 03 : CACATTGGCCGAGGCTTATATTATGGGTCATTCCCTTTTCTGAAGACCTGAAACGTCGGTATTATCCTCCTAC : 365
sample 4  : ..... : 365
sample_5 : ..... : 365
sample 6  : ..... : 365
sample 7  : ..... : 365
sample_08 : ..... : 365
sample_09 : ..... : 365
sample 10 : ..... : 365
sample_12 : ..... : 365
sample_17 : ..... : 365
sample 18 : ..... : 365
sample 21 : .....C.....A.....T..... : 365
sample_24 : ..... : 365
sample 34 : ..... : 365
sample 35 : ..... : 365
sample_36 : ..... : 365
sample 37 : ..... : 365
sample 39 : ..... : 365
          *          380          *          400          *          420          *          4
sample 03 : TCACAACCATAGCCACAGCATTTCATAGGCTACGTCCTCCCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGT : 438
sample 4  : ..... : 438
sample_5 : ..... : 438
sample 6  : ..... : 438
sample 7  : ..... : 438
sample_08 : ..... : 438
sample_09 : ..... : 438
sample 10 : ..... : 438
sample_12 : ..... : 438
sample_17 : ..... : 438
sample 18 : ..... : 438
sample 21 : .....T.....T..... : 438
sample_24 : ..... : 438
sample 34 : ..... : 438
sample 35 : ..... : 438
sample_36 : ..... : 438
sample 37 : ..... : 438
sample 39 : ..... : 438

```

APÊNDICE A – Continuação...

```

40      *      460      *      480      *      500      *
sample 03 : AATTACAAACCTTCTGTGTCAGCCATCCCATACATCGGATCTGACCTCGTACAATGAATCTGAGGTGGGTCTCA : 511
sample 4 : .....----- : 501
sample_5 : ..... : 511
sample 6 : ..... : 511
sample 7 : ..... : 511
sample_08 : ..... : 511
sample_09 : ..... : 511
sample 10 : ..... : 511
sample_12 : .....G..... : 511
sample_17 : ..... : 511
sample 18 : ..... : 511
sample 21 : .....C..... : 500
sample_24 : ..... : 511
sample 34 : ..... : 508
sample 35 : ..... : 511
sample_36 : ..... : 511
sample 37 : ..... : 511
sample 39 : ..... : 511

520      *      540      *      560      *      580
sample 03 : GTAGATAAAGCCACCCTCACACGATTTTTTCACCTTTCACCTTTATTTTACCCTTTATCATTGCTGCCCTAGCAA : 584
sample 4 : ..... : -
sample_5 : ..... : 584
sample 6 : ..... : 584
sample 7 : ..... : 584
sample_08 : ..... : 584
sample_09 : ..... : 584
sample 10 : ..... : 584
sample_12 : ..... : 530
sample_17 : ..... : 584
sample 18 : ..... : 520
sample 21 : ..... : -
sample_24 : ..... : 584
sample 34 : ..... : -
sample 35 : ..... : 584
sample_36 : ..... : 584
sample 37 : ..... : 526
sample 39 : ..... : 567

*      600      *      620      *      640      *
sample 03 : CTATCCACCTCTTGTCTTCTGCATGAGACAGGATCAAGTAACCCATCAGGAATGGCATCAGACCTCGACAAAAT : 657
sample 4 : ..... : -
sample_5 : .....C..... : 657
sample 6 : ..... : 657
sample 7 : ..... : 657
sample_08 : ..... : 657
sample_09 : ..... : 657
sample 10 : ..... : 633
sample_12 : ..... : -
sample_17 : .....A..... : 657
sample 18 : ..... : -
sample 21 : ..... : -
sample_24 : ..... : 657
sample 34 : ..... : -
sample 35 : ..... : 657
sample_36 : ..... : 657
sample 37 : ..... : -

```


APÊNDICE A – Continuação...

```

660          *          680          *          700          *          720          *
sample 03 : CACATTTACCCCTACTACACAACCAAGACATCCTAGGCCTAATTATTCTCCTCCTATGTCTAATAAGCCTA : 730
sample 4  : ----- : -
sample_5  : ----- : 694
sample_6  : ----- : 730
sample_7  : ----- : 730
sample_08 : ----- : 730
sample_09 : ----- : 730
sample_10 : ----- : -
sample_12 : ----- : -
sample_17 : ----- : 730
sample_18 : ----- : -
sample_21 : ----- : -
sample_24 : ----- : 730
sample_34 : ----- : -
sample_35 : ----- : 730
sample_36 : ----- : 730
sample_37 : ----- : -
sample 39 : ----- : -

740          *          760          *          780          *          800
sample 03 : ACCCTATTTTTCACCTGACCTTCTAACCGACCCAGATAATTACACACTAGCTAACCCCTCAACACCCACCCC : 803
sample 4  : ----- : -
sample_5  : ----- : -
sample_6  : ----- : 787
sample_7  : ----- : 787
sample_08 : ----- : 796
sample_09 : ----- : 800
sample_10 : ----- : -
sample_12 : ----- : -
sample_17 : ----- : 799
sample_18 : ----- : -
sample_21 : ----- : -
sample_24 : ----- : 763
sample_34 : ----- : -
sample_35 : ----- : 768
sample_36 : ----- : 756
sample_37 : ----- : -
sample 39 : ----- : -

*          820          *          840
sample 03 : ACATTAACCAGAAATGATACTTTCCTATTTTGCCAG : 840
sample 4  : ----- : -
sample_5  : ----- : -
sample_6  : ----- : -
sample_7  : ----- : -
sample_08 : ----- : -
sample_09 : ----- : -
sample_10 : ----- : -
sample_12 : ----- : -
sample_17 : ----- : -
sample_18 : ----- : -
sample_21 : ----- : -
sample_24 : ----- : -
sample_34 : ----- : -
sample_35 : ----- : -
sample_36 : ----- : -
sample_37 : ----- : -
sample 39 : ----- : -

```

APÊNDICE B - Alinhamento das sequencias do Íntron 3 do gene nuclear MECP2 obtidas a partir das amostras de fezes de *Alouatta caraya* e *A. guariba clamitans*. Em cinza está destacada a região de clivagem diferencial entre *A. caraya* e *A. guariba clamitans*, sendo que em cinza escuro está indicada a substituição presente em *A. clamitans* e ausente em *A. caraya*. A “sample mb” é uma amostra controle, originária do tecido muscular de *A. g. clamitans*, coletada em Santa Maria, RS.

```

sample 03 : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- : 29
sample 05 : -----TGTGAGGACAAATGGAAAGACACAAAAA : 29
sample_07 : ----- : 29
sample_10 : ----- : 19
sample_38 : ----- : 19
sample_13 : ----- : 8
sample_17 : ----- : 20
sample_20 : ----- : 29
sample_24 : -----A.GA. : 24
sample_23 : ----- : -
sample_33 : ---CAATCAATTCACTTTAGAGCGAAAGGCTTTCCCTGGGGAC : 69
sample_34 : ----- : -
sample_35 : -----AAAGGCTTTCCCTGGGGAC : 49
sample_36 : ----- : -
sample_08 : ----- : 27
sample_39 : ----- : 19
sample_21 : GCAATCAAATTTCACTTTAGAGCGAAAGGCTTTCCCTGGGGAC : 73
sample mb : -----GAAAGGCTTTCCCTGGGGAC : 50

sample 03 : CAATTAGAGGCTCCCCATGGCAATGTCAGAGATAGGGCAGAGCGGATGGTGGTGACAACACTCTGATAAATGT : 102
sample 05 : ----- : 102
sample_07 : ----- : 102
sample_10 : ----- : 92
sample_38 : ----- : 92
sample_13 : ----- : 81
sample_17 : ----- : 93
sample_20 : ----- : 102
sample_24 : ----- : 97
sample_23 : ----- : -
sample_33 : ----- : 142
sample_34 : ----- : -
sample_35 : ----- : 122
sample_36 : ----- : -
sample_08 : ----- : 100
sample_39 : ----- : 92
sample_21 : ----- : 146
sample mb : ----- : 123

sample 03 : *-----160-----*-----180-----*-----200-----*-----22 : 175
sample 05 : TACTGTTGAATAAGAGTCCACTGCCTGGCTGCCCTGAGGATCTGTCTGTCCACAAAGCCACCCGCTCGTCT : 175
sample_07 : ----- : 175
sample_10 : ----- : 165
sample_38 : ----- : 165
sample_13 : ----- : 154
sample_17 : ----- : 166
sample_20 : ----- : 175
sample_24 : ----- : 170
sample_23 : ----- : -
sample_33 : ----- : 215
sample_34 : ----- : -
sample_35 : ----- : 195
sample_36 : ----- : -
sample_08 : ...A. : 173
sample_39 : ...A. : 165
sample_21 : ...A. : 219
sample mb : ...A. : 196

```

APÊNDICE B – Continuação...

```

0          *          240          *          260          *          280          *
sample 03 : GCCTGCCCCCTGACTCCCCAGGCCTCTCCAAAGTCCAGCAACCGAAGAGTCGGGCCTGGTACAGAGGGGCTGTT : 248
sample 05 : ..... : 248
sample_07 : ..... : 248
sample 10 : ..... : 238
sample 38 : ..... : 238
sample_13 : ..... : 227
sample_17 : ..... : 239
sample 20 : ..... : 248
sample_24 : ..... : 243
sample_23 : ----- : -
sample 33 : ..... : 288
sample 34 : ----- : -
sample 35 : ..... : 268
sample 36 : ----- : -
sample 08 : ..... : 246
sample 39 : ..... : 238
sample 21 : ..... : 292
sample mb : ..... : 269

300          *          320          *          340          *          360
sample 03 : GGACTGAGGCCCATTTCTGCTGCTTGGTGCCTGGGTCTGAGTCACCATCTGGAACGTTCCCTGGACCTGAGTCAC : 321
sample 05 : ..... : 321
sample_07 : ..... : 321
sample 10 : ..... : 311
sample 38 : ..... : 311
sample_13 : ..... : 300
sample_17 : ..... : 312
sample 20 : ..... : 321
sample_24 : ..... : 316
sample_23 : ----- : -
sample 33 : ..... : 361
sample 34 : ----- : 32
sample 35 : ..... : 341
sample 36 : ----- : -
sample 08 : ..... : 319
sample 39 : ..... : 311
sample 21 : ..... : 365
sample mb : ..... : 342

*          380          *          400          *          420          *          4
sample 03 : CATCTCGAACATTCCTAATTCTGAACTTGGGGATGGTGCTCAGACTCTCTGGGAATCAGTTTCAACAAGATAA : 394
sample 05 : ..... : 394
sample_07 : ..... : 394
sample 10 : ..... : 384
sample 38 : ..... : 384
sample_13 : ..... : 373
sample_17 : ..... : 385
sample 20 : ..... : 394
sample_24 : ..... : 371
sample_23 : ----- : -
sample 33 : ..... : 434
sample 34 : ..... : 105
sample 35 : ..... : 414
sample 36 : ----- : -
sample 08 : ..... : 392
sample 39 : ..... : 384
sample 21 : ..... : 438
sample mb : ..... : 415

```

APÊNDICE B – Continuação...

```

40      *      460      *      480      *      500      *
sample 03 : TCTTTTGCTTACCCCTTCTCAGGGTTATGGAATTAATGAGGCTATCTGCCAATTTTATGTGAAAACCTGCTAAC : 467
sample 05 : ..... : 467
sample_07 : ..... : 467
sample 10 : ..... : 457
sample 38 : ..... : 457
sample_13 : ..... : 446
sample_17 : .....T..... : 415
sample 20 : .....C..... : 423
sample_24 : ..... : -
sample_23 : ..... : -
sample 33 : ..... : 507
sample 34 : ..... : 178
sample_35 : .....C..... : 487
sample 36 : ..... : -
sample 08 : .....C..... : 465
sample 39 : .....C..... : 457
sample 21 : .....C..... : 511
sample mb : .....C..... : 488

520      *      540      *      560      *      580
sample 03 : CTTTTTGGGATCATTTAAGGGGTACAACAGAAACATGCTTCTTCACTCCTCCTCAGAACCCCGGCTCTGCAA : 540
sample 05 : ..... : 540
sample 07 : ..... : 540
sample 10 : ..... : 530
sample 38 : ..... : 530
sample_13 : ..... : 519
sample_17 : ..... : -
sample 20 : ..... : -
sample_24 : ..... : -
sample_23 : .....G..... : 51
sample 33 : ..... : 580
sample 34 : ..... : 251
sample_35 : ..... : 560
sample 36 : ..... : 5
sample 08 : ..... : 538
sample 39 : ..... : 530
sample 21 : ..... : 584
sample mb : ..... : 561

*      600      *      620      *      640      *
sample 03 : GTTCTCTGTTTCCGCAGCTATTCCATCTCCAGATAAGAAGCTCGAGGCGGGAGAGGATAGAGGACATCGACC : 613
sample 05 : ..... : 613
sample 07 : ..... : 613
sample 10 : ..... : 603
sample 38 : ..... : 603
sample_13 : ..... : 549
sample_17 : ..... : -
sample 20 : ..... : -
sample_24 : ..... : -
sample_23 : ..... : 124
sample 33 : ..... : 653
sample 34 : ..... : 324
sample_35 : ..... : 633
sample 36 : ..... : 78
sample 08 : ..... : 611
sample_39 : .....T..... : 603
sample 21 : ..... : 657
sample mb : ..... : 634

```

APÊNDICE B – Continuação...

```

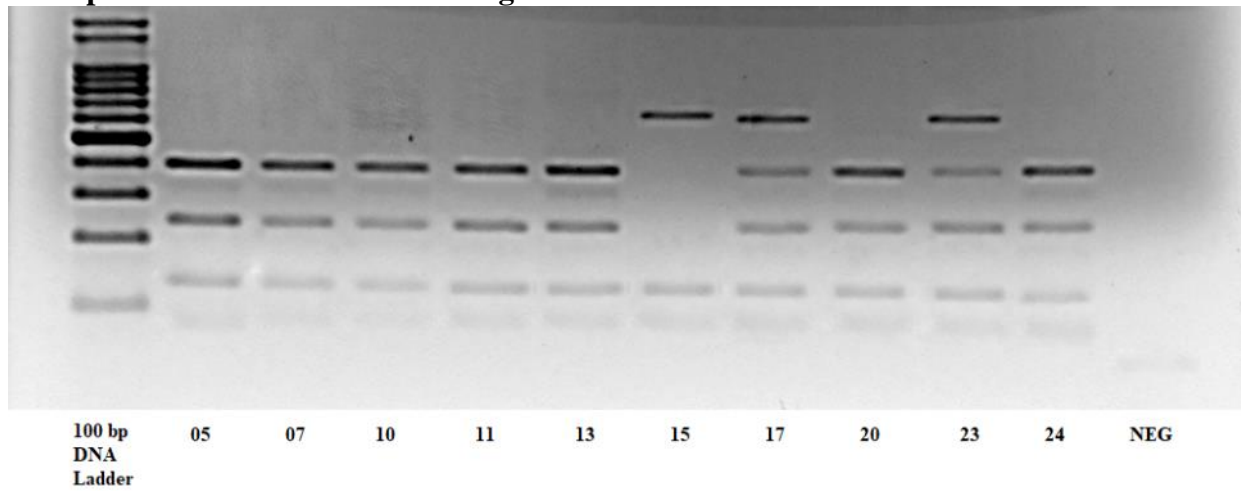
660          *          680          *          700          *          720          *
sample 03 : TCTGTACAGTCATTTCAAGCATACCTGGTCTTGGTGTTCACGTGTTTATGGTCCCCCGCCCCCGCTGTGGGGT : 686
sample 05 : ..... : 686
sample_07 : ..... : 686
sample 10 : ..... : 676
sample 38 : ..... : 676
sample_13 : ..... : -
sample_17 : ..... : -
sample 20 : ..... : -
sample_24 : ..... : -
sample_23 : ..... : 197
sample 33 : ..... : 726
sample 34 : ..... : 397
sample 35 : ..... : 706
sample 36 : .....C..... : 151
sample 08 : ..... : 674
sample 39 : ..... : 676
sample 21 : ..... : 730
sample mb : ..... : 707

740          *          760          *          780          *          800
sample 03 : TAGGCACATACATTTTCCTACTCCATGAGA----- : 716
sample 05 : .....GATCCCTGTCTCTGCCCTCCCTGCCCTGTAGAGACAGGAGTTG : 759
sample_07 : .....A..... : 716
sample 10 : .....A.....ATCCCTGTTCTCTGCCCTCCCTGCCCT----- : 733
sample 38 : ..... : 690
sample_13 : ..... : -
sample_17 : ..... : -
sample 20 : ..... : -
sample_24 : ..... : -
sample_23 : .....GATCCCTGTCTCTGCCCTCCCTGCCCTGTAGAGACAGGAGTTG : 270
sample 33 : .....GATCCCTGTCTCTGCCCTCCCTGCCCTGTAGAGACAGGAGTTG : 799
sample 34 : .....GATCCCTGTATCTGCCCTCCCTGCCCTGTAGAGACAGGAGTTG : 470
sample 35 : .....GATCCCTGTCTCTGCCCTCCCTGCCCTGTAGAGACAGGAGTTG : 779
sample 36 : ..... : 175
sample 08 : ..... : -
sample 39 : .....GATCCCTGTCTCTGCCCTCCCT----- : 729
sample 21 : .....GATCCCTGTCTCTGCCCTCCCTGCCCTGTAGAGACAGGAGTTG : 803
sample mb : .....GATCCCTGTCTCTGCCCTCCCTGCCCTGTAGAGACAGGAGTTG : 780

*          820          *          840          *          860          *
sample 03 : ..... : -
sample 05 : CTC----- : 762
sample_07 : ..... : -
sample 10 : ..... : -
sample 38 : ..... : -
sample_13 : ..... : -
sample_17 : ..... : -
sample 20 : ..... : -
sample_24 : ..... : -
sample_23 : CTCTTACTTACTTAATCAAATAC----- : 293
sample 33 : CTCTTACTTACTTAATCAAATACACATCATA----- : 830
sample 34 : CTCTTACTTACTTAATCAAATACACATC----- : 498
sample 35 : CTCTTACTTACTTAATCAAATACACATCAT----- : 809
sample 36 : ..... : -
sample 08 : ..... : -
sample 39 : ..... : -
sample 21 : CTCTTACTTACTTAATCAAATACACATC----- : 831
sample mb : CTCTTACTTACTTAATCAAATACACATCATA----- : 811

```

APÊNDICE C - Gel de agarose 2% demonstrando a clivagem diferencial no Íntron 3 do gene MECP2 entre *A. caraya* e *A. guariba clamitans*. As amostras 05, 07, 10, 11, 13, 20 e 24 representam o padrão de bandas esperado para *A. caraya*, a amostra 15 representa o padrão de bandas esperado para *A. g. clamitans* e as amostras 17 e 23 representam indivíduos heterozigotos.



APÊNDICE D - Número da amostra de fezes de bugios pertencentes a grupos mistos (*Alouatta caraya* x *A. guariba clamitans*), coordenadas geográficas do ponto de coleta, tamanho da sequência de DNA mitocondrial sequenciada, código (GenBank) correspondente à sequência, espécie correspondente à sequência, qualidade do alinhamento (e-value), o fenótipo do bugio que produziu a amostra, número de fragmentos de DNA nuclear gerado através da técnica CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) e espécie correspondente ao número de fragmentos CAPS.

Amostra	Coordenadas do ponto de coleta	Mitocondrial				Fenótipo	Nuclear	
		Tamanho da sequência (pb)	Código correspondente	Espécie correspondente	E-value		Padrão CAPS	
							Nº Fragmentos	Espécie correspondente
03	29°45'58.80"S 54°47'57.12"O	835	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	5	Heterozigoto
04	29°45'58.68"S 54°47'57.24"O	510	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	-	-
05	29°45'58.74"S 54°47'57.30"O	666	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	4	<i>A. caraya</i>
06	29°45'58.98"S 54°47'57.42"O	789	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	<i>A. caraya</i>	-	-
07	29°45'59.22"S 54°47'57.78"O	785	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	<i>A. caraya</i>	4	<i>A. caraya</i>
08	29°45'58.80"S 54°47'57.66"O	778	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	3	<i>A. g. clamitans</i>
09	29°45'58.98"S 54°47'57.72"O	801	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	-	-
10	29°45'58.80"S 54°47'57.66"O	701	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	<i>A. caraya</i>	4	<i>A. caraya</i>
12	29°46'5.76"S 54°47'54.06"O	835	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	-	-
13	29°46'6.00"S 54°47'53.58"O	748	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	4	<i>A. caraya</i>

APÊNDICE D - *Continuação...*

17	29°46'6.54"S 54°47'53.28"O	835	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	<i>*A. g. clamitans</i>	5	Heterozigoto
18	29°46'6.66"S 54°47'52.38"O	540	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	-	-
19	29°46'7.32"S 54°47'53.16"O	-	-	-	-	<i>*A. caraya</i>	3	<i>A. g. clamitans</i>
20	29°46'6.54"S 54°47'52.74"O	223	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	5e-102	<i>A. caraya</i>	3	<i>A. g. clamitans</i>
21	29°46'6.78"S 54°47'52.26"O	504	DQ679781.1	<i>A. guariba</i>	< 0,0	-	3	<i>A. g. clamitans</i>
23	29°46'7.20"S 54°47'52.86"O	253	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	1e-57	<i>A. caraya</i>	5	Heterozigoto
24	29°46'6.90"S 54°47'52.86"O	775	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	4	<i>A. caraya</i>
33	29°46'9.96"S 54°47'48.66"O	-	-	-	-	<i>A. caraya</i>	4	<i>A. caraya</i>
34	29°46'6.48"S 54°47'47.70"O	520	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	<i>*A. caraya</i>	5	Heterozigoto
35	29°46'9.00"S 54°47'51.30"O	824	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	<i>*A. g. clamitans</i>	5	Heterozigoto
36	29°47'46.02"S 54°48'18.72"O	758	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	<i>*A. g. clamitans</i>	4	<i>A. caraya</i>
37	29°47'43.26"S 54°48'15.12"O	510	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	-	-
38	29°47'43.30"S 54°48'14.93"O	273	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	2e-135	-	5	Heterozigoto
39	29°47'43.93"S 54°48'14.94"O	559	KC757384.1	<i>A. caraya</i>	< 0,0	-	3	<i>A. g. clamitans</i>

*Indivíduos com padrão de coloração esperada para híbrido.