

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE BUGIOS-DE-MÃOS-  
RUIVAS (*Alouatta belzebul*) NA ÁREA DE INUNDAÇÃO DA USINA  
HIDRELÉTRICA DE BELO MONTE

Jacqueline Vieira Gardellin

Março, 2023

Jacqueline Vieira Gardellin

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE BUGIOS-  
DE-MÃOS-RUIVAS (*Alouatta belzebul*) NA ÁREA DE  
INUNDAÇÃO DA USINA HIDRELÉTRICA DE BELO MONTE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado na Universidade Federal de  
São Carlos para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia  
Domingues de Freitas

São Carlos

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Queria agradecer, primeiramente, aos meus pais. Pelo esforço em tentar, mesmo de longe, ficar perto de mim (quando eu permitia), e de longe tentar cuidar, dar força à filha muitas vezes ranzinza e distante. Ao meu pai, por sempre trabalhar, sem medir esforços, para me dar o melhor ensino. A minha mãe, por ser minha orientadora pessoal enquanto eu crescia e me impulsionar em meus sonhos.

Agradeço aos meus amigos de faculdade, pelas conversas profundas, tão importantes, tanto como palavras de consolo quando eu mais precisei ou como verdades doídas mas que precisavam ser ditas em certos momentos. Agradeço também pelos comentários bobos em momentos inesperados, que tornavam mais leve o meu dia. Agradeço especialmente pelas amigas que moraram comigo, Pri e Isa, dividindo a rotina, perplexidades e por me aguentar e dividir comigo também suas opiniões, histórias diárias, desconfortos e experiências.

À minha orientadora, Patrícia, que me acolheu no laboratório e abriu as portas para companheiros inesquecíveis e para uma área de pesquisa pela qual fui me apaixonando cada vez mais, estudando sobre animais incríveis, que fazem valer a pena as horas de estudo. Também agradeço ao professor Pedro Galetti Jr., nos auxiliando com suas valiosas observações.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, que tornaram meu trabalho muito mais fluido e repleto de conhecimento (seja científico ou não), que não obteria trabalhando sozinha, envolvendo reciprocidade, e o compartilhamento, não esperando nada em troca. Agradeço especialmente à Nathalia, que foi meu ponto de apoio (no trabalho e na vida pessoal) e grande amiga, ao Leo, Camila, Luana, Carla, Brunão, Marina, Gaby, Theo, Anderson e todos os outros colegas do laboratório que se abriram comigo e se tornaram grandes parceiros ao longo de minha jornada. Não teria conseguido sem vocês!

À minha família, com seu jeito particular, lá para me acolher, e me fazer pensar em quem eu quero me tornar. Em especial ao meu avô, que sempre me incentivou ao caminho do conhecimento, me encantando com sua cultura e conhecimento de mundo. Aos meus amigos de longa data, que também sempre estiveram presentes para mim; e aos novos, por seus ensinamentos.

Aos meus colaboradores, em especial Victor Yunes (Unesp), que tão gentil e pacientemente cedeu seu tempo para compartilhar suas experiências em

campo e seu contato com os animais que estudei mas que nunca tive a oportunidade de ver cara a cara, a Fabiano Melo (UFV) e Amy Goldberg (Duke University).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de iniciação científica, processo 2021/05923-6

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 317345/2021-4

"As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e do CNPq".

**RESUMO**

O bugio-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul*) é um primata endêmico do Brasil, com ocorrência disjunta em regiões da Amazônia e da Mata Atlântica nordestina. De acordo com a Lista Vermelha da IUCN, essa espécie está classificada como vulnerável à extinção, dada a redução significativa de suas populações nos últimos 30 anos. O manejo e uso da água para construção de barragens em usinas hidroelétricas representa principal ameaça antrópica à espécie. Nesse contexto, a recente implantação da Usina Hidrelétrica de Belo Monte (UHEBM), no sudoeste do estado do Pará, local de ocorrência de *A. belzebul*, representa potencial ameaça para espécie, podendo culminar em isolamento populacional e perda de diversidade genética a longo prazo. Diante disso, o presente trabalho tem o objetivo de determinar os padrões de distribuição da diversidade genética e a estruturação genético populacional de *A. belzebul* na área de inundação da região de Vitória do Xingu (PA), utilizando marcadores nucleares obtidos por *Genotyping by Sequencing* (GBS) e da região controle mitocondrial do Dloop, gerando informações úteis para futuros planos de monitoramento e manejo. Os resultados obtidos tanto por GBS quanto por Dloop indicam a existência duas linhagens de *Alouatta*, e não apenas uma como inicialmente assumido, na região estudada, geograficamente delimitadas pela presença do rio e com alta diversidade genética. Os dados gerados neste estudo são de especial relevância para o entendimento de questões relativas ao do grupo e para o manejo adequado dessas populações, a fim de evitar que animais de unidades evolutivas distintas sejam tratados como sendo de uma mesma linhagem ou que haja separação de indivíduos de uma mesma unidade, o que por sua vez poderia culminar na geração de núcleos populacionais menores e favorecer eventos de redução da diversidade genética e aumento da endogamia, e, conseqüentemente, do valor adaptativo ao longo do tempo.

**Palavras-chave:** Bioinformática; genética da conservação; fluxo gênico; genética de populações; primatas neotropicais.

## ABSTRACT

The red-handed howler (*Alouatta belzebul*) is an endemic primate in Brazil, with a disjunct distribution in the Northern and the Northeastern Atlantic Forest of Brazil. According to the IUCN Red List, *A. belzebul* is classified as vulnerable, given the significant reduction in its population over the past 30 years. Damming for the construction of hydroelectric plants is the activity that represents the greatest anthropic threat to the species indeed. In this way, the recent implantation of the Belo Monte Hydroelectric Plant (UHBM), whose flooding zone covers the municipalities of Vitória do Xingu and Altamira, in the southwest of the state of Pará, where *A. belzebul* occurs, represents a potential threat to the species, likely leading to the isolation of populations and the consequent reduction of genetic diversity in the long term. Thus, the present project has as its main objective to characterize the patterns of distribution of the genetic diversity and the structure of *A. belzebul* from the Vitória do Xingu (PA) for populations rescued during the construction of the UHBM. For that, we used *Genotyping by Sequencing* (GBS) and the mitochondrial control region Dloop analyses, aiming to generate useful data for future monitoring and management plans. The present results indicate the existence of two distinct lineages of *Alouatta* in the study area, and not only one as initially assumed, which are geographically delimited by the river flow. A high level of genetic diversity was also identified. The data obtained by this study are especially relevant for the understanding on the group diversification and for elaborating adequate management plans for these populations, in order to avoid the admixture of distinct evolutive lineages or the separation of individuals of the same unity, which could diminish population size and alternatively increase inbreeding, consequently reducing genetic diversity and fitness over time.

**Keywords:** Bioinformatics; conservation genetics; gene flow; population genetics; genetic diversity, neotropical primates

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Mapa da distribuição geográfica de *Alouatta belzebul*, considerando as unidades taxonômicas *A. belzebul*, *A. discolor* e *A. ululata*. Ilustração elaborada pelo próprio autor. .... 13
- Figura 2.** Qualidade do sequenciamento a partir do score de qualidade (escala Phred) a cada base (a) e pelo número de sequências a cada valor de escore (b).  
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3. I)** Presença de dois grupos genéticos mais prováveis, de acordo com o Critério de Informação Bayesiana do DAPC, como demonstra o ponto de inflexão da reta. **II)** Distribuição das amostras de acordo com os dados de DAPC, considerando k=2. .... 28
- Figura 4.** Análise de Discriminante de Componentes Principais (DAPC), considerando um valor de k=2 como mais provável. Localidades de proveniência dos indivíduos são indicadas na legenda. .... 29
- Figura 5.** Identificação de dois grupos genéticos a partir da análise de componentes principais (PCA). .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Pontos de ocorrência dos indivíduos analisados com GBS na área de distribuição geográfica de *Alouatta belzebul*. A coloração dos pontos indica a localidade à qual o indivíduo pertence. Fonte: Ilustração elaborada pelo próprio autor. .... 30
- Figura 7.** Análises de FST indicam menor diferenciação entre a margem esquerda e a Ilha Pimental, confirmando os dados de DAPC. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 8.** Resultado dos agrupamentos dos 26 indivíduos em estudo, segundo o software BAPS. Os resultados indicam a presença de um k=3, com a separação de *A. discolor* (em vermelho) e *A. belzebul*, este último apresentando dois haplogrupos (verde e azul). .... 35
- Figura 9.** Topologia da árvore de distância (KP2) a partir do marcador Dloop em 26 amostras de *A. belzebul* da região de Vitória do Xingu. Os símbolos e cores representam as cinco localidades estudadas: margem direita do rio Xingu (círculo azul), margem esquerda do rio Xingu (quadrado roxo), Ilha Pimental (triângulo laranja), Ilha da Maravilha (triângulo verde) e Ilha do Meio (triângulo lilás). .... 36

- Figura 10.** Rede de haplótipos dos grupos *Alouatta belzebul* e *Alouatta discolor* provenientes das três ilhas, da Margem Direita e Margem Esquerda do rio Xingu (PA)..... 38
- Figura 11.** Imagem ilustrando a distribuição dos indivíduos analisados no presente trabalho. A cor indica o agrupamento genético do indivíduo. As amostras em laranja representam o agrupamento *A. belzebul* e as amostras em azul representam amostras pertencentes ao agrupamento *A. discolor*. As amostras de Janiak et al (2022) (em amarelo) também compõe o agrupamento *A. discolor*. Fonte: Bing Satellite, 2015..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12.** Imagem ilustrando um possível trajeto de migração dos indivíduos de uma margem a outra do rio Xingu. As linhas em vermelho indicam os trajetos que os indivíduos BR5608 e BR5609 poderiam ter percorrido em etapas, à nado. Fonte: Bing Satellite, 2015. .... 40
- Figura 13.** Região nas proximidades dos indivíduos BR5608 e BR5609. A maioria dos braços de rios deste trecho não ultrapassa 250 metros entre ilhas e margens, corroborando a hipótese de estes animais terem atravessado da margem direita para a esquerda e explicando sua similaridade genética maior com indivíduos de *A. belzebul*. Fonte: Bing Satellite, 2015. .... 41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de espécies do gênero <i>Alouatta</i> e respectivos nomes populares, áreas de ocorrência, status de conservação e situação populacional.....	11
<b>Tabela 2.</b> Amostras coletadas na região de Vitória do Xingu, algumas das quais já previstas no início do trabalho, e outras da mesma região acrescentadas posteriormente* para ampliar a amostragem. Algumas amostras foram utilizadas de forma complementar nas abordagens, utilizando dados de GBS e Dloop (X), conforme assinalado na tabela.....	19
<b>Tabela 3.</b> Número de sequências por amostra, total e retidas após filtragem na etapa de demultiplexagem, usando o processo <code>process_radtags</code> da pipeline Stacks (Catchen et al. 2011, 2013) e suas respectivas localidades de origem. Amostras indicadas com † foram excluídas das análises.....	27
<b>Tabela 4.</b> Valores de parâmetros de diversidade para os dois grupos genéticos encontrados.....	31
<b>Tabela 5.</b> Amostras de <i>A. belzebul</i> utilizadas nesse trabalho com dados de identificação (ID), local de origem, coordenadas geográficas, data de coleta e tipo de tecido. Amostras indicadas com * não passaram das etapas de alinhamento e filtragem e amostras indicadas com ** foram obtidas do trabalho de Janiak et al. (2022).....	33
<b>Tabela 6.</b> Média das distâncias genéticas e desvio padrão, através do modelo K2P entre as duas linhagens de <i>A. belzebul</i> . Em negrito, na diagonal, são os valores médios das distâncias intragrupo. ....	35
<b>Tabela 7.</b> Média das distâncias genéticas e desvio padrão, através do modelo K2P entre os três grupos de <i>A. belzebul</i> . Em negrito, na diagonal, são os valores médios das distâncias intragrupo. ....	35
<b>Tabela 8.</b> Índices de diversidade genética para os grupos de <i>Alouatta belzebul</i> da região de Vitória do Xingu (PA). <b>N</b> : Número de sequências analisadas; <b>S</b> : Número de sítios polimórficos; <b>h</b> : Número de haplótipos; <b>Hd</b> : Diversidade haplotípica; <b>Pi</b> : Diversidade nucleotídica.....	37

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. O gênero <i>Alouatta</i> e ameaças a sua conservação .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. <i>Alouatta belzebul</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3. Estudos genético-populacionais em <i>Alouatta belzebul</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4. Caracterização da área de estudo e impactos relacionados à implantação da UHBM .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Justificativa e Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Amostragem e extração do DNA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. GBS (Genotyping by Sequencing).....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.1. Construção da biblioteca de GBS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2. Processamento dos dados genômicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.3. Análises dos dados de SNPs.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Análises da região mitocondrial Dloop .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.1. Amplificação e purificação do DNA mitocondrial (Dloop) .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Análise dos dados de Dloop .....</b>	<b>25</b>
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Dados de GBS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Análises da região Dloop do DNA mitocondrial .....</b>	<b>32</b>
<b>5. Considerações Finais.....</b>	<b>41</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>42</b>
<b>Referências .....</b>	<b>43</b>

## 1. Introdução

### 1.1. O gênero *Alouatta* e ameaças a sua conservação

O gênero *Alouatta* (Família Atelidae), corresponde aos primatas popularmente conhecidos como bugios, que possuem ampla distribuição geográfica, ocorrendo do sul do México até o noroeste do Uruguai (GREGORIN, 2006). As espécies do gênero emitem vocalizações roucas, graves e altas, a longas distâncias, sendo essa uma característica marcante do grupo (CROCKETT; EISENBERG, 1987). A presença de um osso hioide alargado possibilita esse tipo de vocalização, servindo como um ressonador capaz de amplificar o som. Esse comportamento vocal pode servir para defesa territorial (HORWICH; GEBHARD, 1983) e delimitação de distância intergrupar (CROCKETT; EISENBERG, 1987), sinalização contra predadores, localização de indivíduos e promoção de encontros entre grupos (BONVICINO, 1989). Ademais, estímulos advindos do meio ambiente podem influenciar a emissão dos roncamentos dos *Alouatta*, como períodos de chuvas contínuas e incidências de raios e trovões, e de sons advindos da influência antrópica, como de meios de transporte, por exemplo (CHIARELLO, 1995).

Dentro do gênero *Alouatta*, são reportadas 14 espécies reconhecidas (VALENÇA-MONTENEGRO et al., 2021), a saber: *A. belzebul* (Linnaeus, 1766), *Alouatta seniculus* (Linnaeus, 1766), *Alouatta juara* (Linnaeus, 1766), *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), *Alouatta guariba* (Humboldt, 1812), *Alouatta macconnelli* (Humboldt, 1812), *Alouatta discolor* (Spix, 1823), *Alouatta palliata* (Gray, 1849), *Alouatta sara* (Elliot, 1910), *Alouatta ululata* Elliot, 1912, *Alouatta pigra* Lawrence, 1933, *Alouatta arctoidea* Cabrera 1940, *Alouatta puruensis* Lönnberg, 1941 e *Alouatta nigerrima* Lönnberg, 1941. Desse total, seis estão sob algum grau de ameaça segundo a Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (VALENÇA-MONTENEGRO et al., 2021), sendo as espécies *A. guariba*, *A. belzebul*, *A. discolor* e *A. palliata* apresentadas como vulneráveis; e *A. pigra* e *A. ululata*, como ameaçadas. Os status das populações de *A. macconnelli*, e de *A. arctoidea* e *A. puruensis* apresentam-se respectivamente como estável e sem informações, enquanto as demais espécies de *Alouatta* encontram-se em declínio populacional (Tabela 1).

**Tabela 1.** Lista de espécies do gênero *Alouatta* e respectivos nomes populares, áreas de ocorrência, status de conservação e situação populacional.

<b>Espécie</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>Status de conservação</b>	<b>Situação populacional</b>
<i>Alouatta arctoidea</i>	<b>Ursine Howler Monkey</b>	Venezuela; Colômbia (possivelmente)	<b>Pouco preocupante</b>	<b>Desconhecida</b>
<i>Alouatta belzebul</i>	<b>Red-Handed Howler Monkey</b> (Bugio-de-mãos-vermelhas/ Guariba de mãos ruivas)	Brasil (Maranhão, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Pará, Alagoas, Tocantins, Paraíba)	<b>Vulnerável</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta caraya</i>	<b>Black-and-Gold Howler Monkey</b> (Bugio preto)	Norte e nordeste da Argentina; leste e norte da Bolívia; Brasil (BA, DF, GO, MA, PA, MG, MS, MG, PI, PR, RS, RO, SC, SP, e TO, estado onde é residente nativo); norte, sul e leste do Chaco Paraguai; e norte do Uruguai (possivelmente)	<b>Quase ameaçada</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta discolor</i>	<b>Spix's Red-Handed Howler Monkey</b> (Guariba-de-mãos-ruivas)	Brasil (Pará e Mato Grosso)	<b>Vulnerável</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta guariba</i>	<b>Brown Howler Monkey</b> (Bugio ruivo)	Argentina; Brasil (SP, ES, BA, PR, MG, RJ, RS, SC)	<b>Vulnerável</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta juara</i>	<b>Juruá Red Howler Monkey</b> (Guariba vermelho/ Bugio vermeho)	Brasil (Roraima, Mato Grosso, Amazonas, Acre; Peru; possivelmente Colômbia e Venezuela)	<b>Pouco preocupante</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta macconnelli</i>	<b>Guianan Red Howler Monkey</b> (Bugio-ruivo-da-guiana)	Brasil (Amapá, Amazonas, Pará e Roraima); Guiana Francesa; Guiana; Suriname; Venezuela, em grande parte do escudo das Guianas, a norte do rio Amazonas, leste do rio Negro e leste e sul do rio Orinoco e provavelmente na Ilha Tupinambarama (entre rios Tapajós e Madeira, no sul do Amazonas)	<b>Pouco preocupante</b>	<b>Estável</b>
<i>Alouatta nigerrima</i>	<b>Black Howler Monkey</b> (Bugio preto)	Brasil (Pará, Amazonas)	<b>Pouco preocupante</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta palliata</i>	<b>Mantled Howler Monkey</b>	Colômbia; Costa Rica; Equador; Guatemala; Honduras; México (Oaxaca, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Campeche); Nicarágua; Panamá; Peru	<b>Vulnerável</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta pigra</i>	<b>Yucatán Black Howler Monkey</b>	Belize (Yucatán); Guatemala (norte e centro); México (Chiapas, Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco)	<b>Ameaçada</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta puruensis</i>	<b>Purús Red Howler Monkey</b> (Guariba/Bugio-vermelho-do Purús)	Brasil (Rondônia, Mato Grosso, Acre e Amazonas); Peru	<b>Pouco preocupante</b>	<b>Desconhecida</b>
<i>Alouatta sara</i>	<b>Bolivian Red Howler Monkey</b>	Bolívia	<b>Pouco preocupante</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta seniculus</i>	<b>Colombian Red Howler Monkey</b>	Brasil (Amazonas); Colômbia; Equador; Peru; Venezuela	<b>Pouco preocupante</b>	<b>Em declínio</b>
<i>Alouatta ululata</i>	<b>Maranhão Red-Handed Howler Monkey</b> (Bugio-de-mãos-ruivas-do-Maranhão)	Brasil (endêmico do nordeste, estando presente em CE, PI e MA, em especial, zonas litorâneas)	<b>Ameaçada</b>	<b>Em declínio</b>

O Brasil abrange 10 táxons de *Alouatta* (CASSON, 2003; ESTRADA et al., 2017; KOWALEWSKI; CORTÉS-ORTIZ; URBANI, 2015): *A. macconnelli*, *A. belzebul*, *A. discolor*, *A. ululata*, *A. puruensis*, *A. juara*, *A. nigerrima*, *A. caraya*,

*A. clamitans* e *A. fusca*, sendo que *A. fusca* é tomada como sinônimo sênior prevalecendo sobre o nome de *A. guariba* e *A. clamitans* é descrito como táxon distinto de *A. fusca* (GREGORIN, 2006). Apesar dessa classificação, o número de espécies envolvendo o gênero tem sido um ponto de grande discussão no meio científico, em que diferentes abordagens investigativas aplicadas para compreensão do grupo resultam em classificações taxonômicas diversas (BONVICINO et al., 1989; GREGORIN, 2006; HERSHKOVITZ, 1964; RYLANDS; MITTERMEIER; SILVA, 2012; VIANA et al., 2015). Neste contexto, avaliações morfométricas apontam para classificações divergentes das eventualmente realizadas por métodos puramente genéticos, razão pela qual atualmente muitos especialistas sugerem aliar as novas técnicas moleculares à taxonomia mais tradicionalmente utilizada (VIANA et al., 2015).

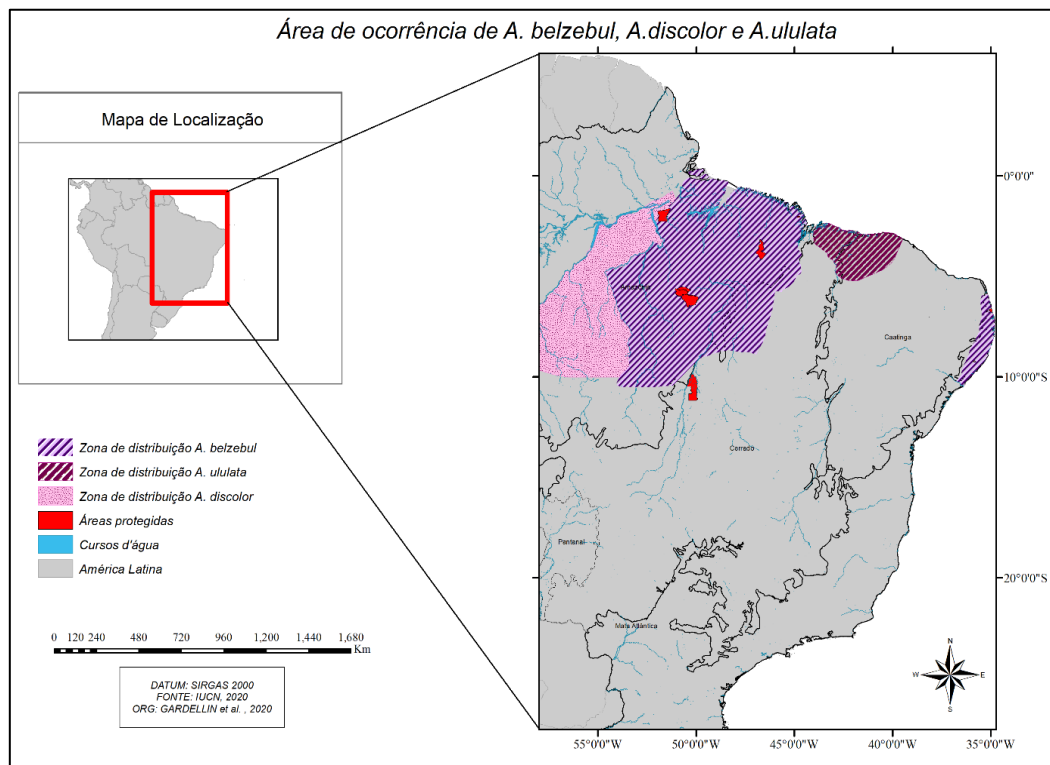
### **1.2. *Alouatta belzebul***

Conhecida como guariba-de-mãos-ruivas, bugio-de-mãos-vermelhas, ou ainda guariba-de-mãos-vermelhas, *A. belzebul* é uma espécie endêmica do Brasil, que se caracteriza por possuir um padrão de coloração de pelagem com um corpo totalmente negro, e a região das mãos, pés e terço apical da cauda de coloração ruiva ou castanho-avermelhada. Alguns desses padrões, no entanto, podem variar entre populações de diferentes localidades (BONVICINO et al., 1989; COUTINHO, 2012; GREGORIN, 2006).

No Brasil, *A. belzebul* pode receber três distintas nomeações e apresentar distribuição geográfica disjunta, a saber: (i) *A. b. ululata* ou *A. ululata*, que engloba as populações de ocorrência restrita ao norte do Maranhão, Piauí e Ceará; (ii) *A. b. discolor* ou *A. discolor*, que inclui populações amazônicas de ocorrência à margem direita do rio Tapajós; e (iii) *A. b. belzebul* ou *A. belzebul*, que inclui as populações de ocorrência nas regiões amazônicas à margem direita do rio Xingu e com distribuição disjunta às populações de ocorrência na Mata Atlântica nordestina (BONVICINO, 1989; GREGORIN, 2006; VIANA et al., 2015). Essas classificações foram feitas a partir de caracteres morfométricos (BONVICINO, 1989; GREGORIN, 2006) ou a partir de marcadores genéticos (VIANA et al., 2015).

No domínio de Floresta Amazônica, esta espécie já foi registrada em diversas áreas protegidas como a Floresta Nacional de Carajás (CARVALHO et

al., 2014) e o Parque Nacional do Araguaia (IBAMA, 2001), no Tocantins. Já no domínio de Mata Atlântica houve registros em áreas protegidas como a Estação Ecológica de Murici, em Alagoas, onde sua presença foi verificada (SOUZA, 2005) (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa da distribuição geográfica de *Alouatta belzebul*, considerando as unidades taxonômicas *A. belzebul*, *A. discolor* e *A. ululata*. Ilustração elaborada pelo próprio autor.

Os bugios-de-mãos-ruivas, assim como outros primatas, no geral, são reconhecidos por sua capacidade de se adaptar e sobreviver em habitats consideravelmente alterados (ARROYO-RODRÍGUEZ; DIAS, 2010; BICCA-MARQUES, 2003; KOWALEWSKI; CORTÉS-ORTIZ; URBANI, 2015). Apesar disso, estima-se que 60% das espécies de primatas estão ameaçadas de extinção, com 75% de suas populações decrescendo globalmente, em virtude principalmente de ações antrópicas (ESTRADA et al., 2017). Estudos reportam que alterações em florestas nativas causadas pela ação humana ocasionam perda ou modificação do habitat, fato esse que pode promover o isolamento das populações (BICCA-MARQUES, 2003; ESTRADA, 2002; ESTRADA et al., 2017; OKLANDER et al., 2010, 2017).

Dentre as principais ameaças ao gênero *Alouatta*, incluindo à espécie *A. belzebul*, estão o alto índice de desmatamento, ocasionado por distintas atividades econômicas como a expansão da atividade agropecuária e extrativista, o manejo e uso da água para a construção de barragens, o desenvolvimento da malha urbana, rodoviária e ferroviária, e a caça, captura e comércio ilegal de animais (CASSON, 2003; ESTRADA et al., 2017; KOWALEWSKI; CORTÉS-ORTIZ; URBANI, 2015). Todos esses fatores têm gerado alterações nos habitats e populações desses animais, constituindo-se em ameaças prementes a sua conservação.

Enquanto na Mata Atlântica o desmatamento ocorre principalmente pela expansão da monocultura canavieira, ameaçando a existência dos corredores florestais por efeitos demográficos e estocásticos, na Floresta Amazônica, local que abriga 95% das populações dessa espécie, os domínios florestais tendem a ser reduzidos em 40% devido à expansão da agricultura e criação de gado e construção de estradas ou barragens (SOARES-FILHO et al., 2006). Para *A. belzebul*, em um panorama mais específico, a construção de barragens é a que representa o maior grau de ameaça à espécie em relação às demais atividades mencionadas (VALENÇA-MONTENEGRO et al., 2021).

*A. belzebul* está incluída em ações de conservação do Plano de Conservação Nacional para Conservação dos Primatas do Nordeste (ICMBio, 2012), na Lista Vermelha Brasileira de espécies ameaçadas (MMA, 2014) e no Apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*/Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens em Perigo de Extinção). De acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (VALENÇA-MONTENEGRO et al., 2021), *A. belzebul* está classificada como vulnerável dada sua redução populacional significativa nos últimos 30 anos. Apesar dessa constatada redução no número de indivíduos da espécie, muito pouco se sabe acerca da diversidade e estrutura genética de suas populações, elementos diretamente associados à viabilidade populacional e manutenção do potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie (FRANKHAM, 2003; FRANKHAM et al., 2002; REED; FRANKHAM, 2003).

### **1.3. Estudos genético-populacionais em *Alouatta belzebul***

Algumas espécies do gênero *Alouatta* já foram geneticamente estudadas para validação de marcadores moleculares (CORTÉS-ORTIZ; MONDRAGÓN; CABOTAGE, 2010; ELLSWORTH; HOELZER, 1998; ESCOBAR-PÁRAMO, 2000; GONÇALVES et al., 2004), para análises da diversidade genética e/ou relações de parentesco (JAVAROTTI, 2018; MONTICELLI, 2019; OKLANDER et al., 2017; OKLANDER; KOWALEWSKI; CORACH, 2010; SOARES, 2017; VELTRONI, 2018), e para inferências evolutivas (ASCUNCE et al., 2007). Esses estudos utilizaram marcadores de microssatélites (BASTOS, 2010; MONTICELLI, 2019; OKLANDER et al., 2017; SOARES, 2017; VELTRONI, 2018) e regiões do DNA mitocondrial como o gene citocromo b (Cytb) (ASCUNCE et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2005, 2008; VIANA et al., 2015) e Dloop (ASCUNCE et al., 2007; OKLANDER et al., 2017).

Em *A. belzebul* as análises genéticas foram realizadas em sua maioria para a compreensão de questões filogenéticas e filogeográficas usando marcadores mitocondriais (ASCUNCE et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2005, 2008; OKLANDER et al., 2017; VIANA et al., 2015) e regiões do pseudogene  $\gamma^1$ -globina (MEIRELES, 1999). Com foco conservacionista, no entanto, há apenas um estudo usando 15 locos de microssatélites, que visou avaliar o impacto da construção de usinas hidrelétricas no rio Tocantins (BASTOS, 2010), em cinco populações de bugios-de-mãos-ruivas: duas delas amostradas em 1985, anteriormente à construção da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, uma na margem direita e outra na margem esquerda; e três outras populações amostradas em 2002, após a construção da usina, representando a margem esquerda, a margem direita e a Ilha Cornélio (esta última com população isolada da margem direita isolada após o alagamento). Os resultados desse estudo evidenciaram alta variabilidade genética nas populações analisadas, sem alterações grandes na estrutura genética populacional, embora, a população ilhada pela barragem tenha apresentado diferenciação genética pronunciada em relação as demais, fato atribuída ao isolamento provocado pela inundação.

O estudo de Bastos e colaboradores (2010) se mostrou importante para avaliação do impacto desses empreendimentos na conservação de espécies como *A. belzebul*, sugerindo que a presença significativa de alelos privados em todas as populações analisadas era consequência de uma mistura de populações ou mesmo de um processo de expansão demográfica, e não

decorrente da perda de alelos raros por deriva genética. Além disso, foi possível verificar considerável diversidade genética em relação a outras espécies do gênero, indicando bom potencial adaptativo para essa espécie. Embora esta abordagem tenha se mostrado eficiente para caracterizar a estrutura e diversidade genética da espécie, estudos genético-populacionais em *A. belzebul*, no entanto, ainda são muito escassos, a despeito de sua aplicabilidade, principalmente para avaliar populações em áreas consideradas *spotlights* para construção de Usinas Hidrelétricas, como é o caso da região de Vitória do Xingu e municípios ao entorno, localizados nas margens do rio Xingu, na qual foi instalada a Usina Hidrelétrica de Belo Monte, no ano de 2011 (ANA, 2020).

#### **1.4. Caracterização da área de estudo e impactos relacionados à implantação da UHBM**

Vitória do Xingu é um município localizado a leste do território amazônico, no sudoeste do estado do Pará, situado em Latitude de 02°52'48" Sul e Longitude 52°00'36" Oeste, em local que faz divisa a oeste com a cidade de Altamira (03°12'12" Sul e 52°12'23" Oeste), às margens do rio Xingu. Uma das rodovias importantes acessadas a partir de Vitória do Xingu e que atravessa Altamira é a Rodovia Federal BR-230, a Transamazônica, que dá acesso à Usina Hidrelétrica de Belo Monte (UHBM), cuja construção implicou no alagamento da parte rural de Vitória do Xingu e no alagamento dos igarapés Altamira e Ambé, em Altamira.

A UHBM levantou diversas questões socioeconômicas e ambientais, gerando oposições por parte de ambientalistas nacionais e internacionais, indígenas e populações locais. Socialmente, a construção de barragens resulta, via de regra, em um aumento populacional em municípios próximos à construção, levando a uma ocupação desordenada e deficiência estrutural; surgimento de comércio clandestino como alternativa ao aumento dos preços; aumento na criminalidade; e, paralelamente, em uma alteração nos hábitos e costumes/cultura locais, o que pode vir a gerar conflitos entre residentes e "forasteiros" (CONCEIÇÃO; SEIXAS, 2013, p. 216).

Em se tratando dos impactos ambientais, esses envolvem a alteração no regime de secas e cheias do rio, afetando direta ou indiretamente espécies locais por alterações em aspectos diversos, como por exemplo a redução consequente

no fluxo do rio, que implica em constantes alagamentos e enchentes e, alternativamente, secas em regiões como as de igarapés que alimentam o manancial, afetando processos naturais como de piracema. Além disso, pode ocorrer a acentuação do processo de erosão nas margens do rio, notavelmente à montante, acompanhada por assoreamento decorrentes de manejo e/ou planejamento inadequados. Somado a isso, há ainda que se considerar a ignorada contribuição para emissão de gases estufa como o metano, pela decomposição da biomassa acumulada no fundo dos reservatórios, o que se acentua com o aumento de suas profundidades, e de dióxido de carbono oriundo da vegetação inundada pelos reservatórios (ANDRADE, 2013, p. 20).

Complementando o desmatamento local, durante a fase de implantação de uma usina, a construção de moradias e estradas propicia o crescimento de atividades como a caça e a pesca, ameaçando a fauna local e contribuindo para aumento de risco de extinção e até o desaparecimento local de algumas espécies. Esse cenário, por sua vez, também contribui para o desequilíbrio do ecossistema, instaurando-se um ciclo vicioso que leva à constante intensificação do processo de desmatamento. Dependendo da dimensão da bacia do rio, podem ainda surgir penínsulas e pequenas ilhas que dificultam a comunicação e movimentação de espécies terrestres (CONCEIÇÃO; SEIXAS, 2013, p. 217). Assim, com a inundação há também o óbvio impacto da fragmentação de habitats, levando ao isolamento de populações e conseqüentemente à interrupção de fluxo gênico, fato que pode contribuir para perda de diversidade genética, estruturação populacional e até mesmo a extinções locais (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; BERGL; VIGILANT, 2007; COUVET, 2002; ESTRADA et al., 2017; FRANKHAM, 2003).

Considerando-se que a UHBM é a quarta maior usina hidrelétrica do mundo e a primeira do Brasil, essa se torna um bom exemplo dos cenários de impactos mencionados anteriormente. A inauguração da última turbina e entrega da usina pelo então Presidente da República, em novembro de 2019, deu início ao seu completo funcionamento e ativação (KRÜGER, 2019). Os prováveis impactos da construção da UHBM já foram listados pelo Relatório de Impacto Ambiental do IBAMA, encomendado pela Eletrobrás, e incluem alteração na qualidade da água do rio Xingu, aumento do número de mosquitos geradores de

doenças, perda de ambientes naturais e de vegetação, gerando alterações das paisagens e da fauna.

Sob o ponto de vista genético, a inundação de áreas de matas pode promover o isolamento de populações antes conectadas, intensificando efeitos de eventos aleatórios, como a deriva genética, e promovendo diminuição e até interrupção de fluxo gênico, com conseqüente aumento da endogamia (COUVET, 2002; FRANKHAM, 2003). Processos como esses, por sua vez, propiciam a estruturação genética e redução de diversidade e a fixação de alelos deletérios, comprometendo características de performance e a capacidade das populações se adaptarem e persistirem em longo prazo (BJILSMA et al., 2000; KELLER; WALLER, 2002; REED; FRANKHAM, 2003; FRANKHAM, 2003).

## **2. Justificativa e Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar a diversidade genética de populações de *A. belzebul* amostradas na região de Vitória do Xingu (PA), durante a construção da Usina Hidrelétrica de Belo Monte (UHEBM), visando gerar dados de referência que permitam o monitoramento da estrutura e variabilidade genética das populações avaliadas ao longo do tempo, e que sejam úteis ao manejo e conservação da espécie.

A partir dessa perspectiva, os seguintes objetivos específicos de trabalho foram estabelecidos:

2.1. Determinar a diversidade genética de *A. belzebul* de ocorrência na área de instalação da UHEBM, através de estimativas dos níveis de heterozigosidade observada e esperada, dos valores de riqueza alélica e dos coeficientes de endogamia;

2.2. Caracterizar o padrão de distribuição da diversidade genética e investigar a existência de estruturação populacional na área estudada;

2.3. Discutir o potencial de emprego dos marcadores aqui utilizados para auxiliar tomadas de decisões em programas de conservação que visem o monitoramento da diversidade genética, e eventualmente futuras ações de manejo.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Amostragem e extração do DNA**

As amostras biológicas de *A. belzebul* analisadas no presente trabalho são provenientes da região da Volta Grande do rio Xingu, localizada entre os municípios de Vitória do Xingu e Altamira (03°24'43"S, 51°57'56"O), no sudoeste do estado do Pará, onde ocorrem naturalmente em parapatria as unidades *A. b. discolor* e *A. b. belzebul* (CABRERA, 1958; CORTÉS-ORTIZ et al., 2015; HILL, 1962. RYLANDS et al., 1995; VIANA et al., 2015) ou *A. discolor* e *A. belzebul* (GREGORIN, 2006), respectivamente. O projeto inicial previa uma amostragem de 22 indivíduos, no entanto, durante o desenvolvimento do mesmo foram acrescentadas mais 27 amostras, dentre as quais algumas foram repetidas e outras descartadas das análises, totalizando no final 49 animais amostrados ao longo do rio Xingu. Esta amostragem foi submetida a análises de GBS (*Genotipagem by Sequencing*) e/ou da região controle do DNA mitocondrial (Dloop) (Tabela 2), dependendo da quantidade e qualidade do DNA obtido.

**Tabela 2.** Amostras coletadas na região de Vitória do Xingu, algumas das quais já previstas no início do trabalho, e outras da mesma região acrescentadas posteriormente\* para ampliar a amostragem. Algumas amostras foram utilizadas de forma complementar nas abordagens, utilizando dados de GBS e Dloop (X), conforme assinalado na tabela.

ID	Local Original	Coordenadas Iniciais**	Coordenadas de Soltura	Data	GBS	Dloop
AC10508	Margem Esquerda	X:414625 Y:9644101	X:415516 Y:9647542	25/03/2015	-	X
BR5610	Margem Esquerda	X:416876 Y:9639102	X: 411198 Y:9653302	04/04/2015	-	-
BR5607	Margem Esquerda	X:416876 Y:9639102	X: 411198 Y:9653302	04/04/2015	-	-
BR5608	Margem Esquerda	X:416876 Y:9639102	X: 411198 Y:9653302	04/04/2015	-	X
BR5609	Margem Esquerda	X:416876 Y:9639102	X: 411198 Y:9653302	04/04/2015	-	X
BM 0759*	Margem Esquerda	X:395420 Y:9619542	Sem dados	30/01/2013	-	-
BM 0830*	Margem Esquerda	X:404504 Y:9635812	Sem dados	26/02/2013	X	-
BM 1026*	Margem Esquerda	X:393200 Y:9630480	Sem dados	05/06/2013	X	X
BM 1049*	Margem Esquerda	X:394450 Y:9628490	Sem dados	04/06/2013	X	X
BM 1022*	Margem Esquerda	X:407289 Y:9633582	Sem dados		-	X
BM 1142*	Margem Esquerda	X:400210 Y:9620161	Sem dados	31/08/2013	X	-
BM 1115789*	Margem Esquerda	X:412792 Y:9648715	Sem dados	26/05/2015		X
BM 115771*	Margem Esquerda	X:413175 Y:9648600	Sem dados	26/05/2015		X
BM 115793*	Margem Esquerda	X:412792 Y:9648715	Sem dados	26/05/2015		X
BM 0708*	Margem Esquerda	X:417809 Y:9655333	Sem dados	28/11/13		X
BM 87722*	Margem Esquerda	X:410336 Y:9637937	Sem dados	20/01/2016		X
BM 0828*	Margem Esquerda	X:407289 Y:9633582	Sem dados	25/02/2013		X
BM 1171*	Margem Direita	X:392989 Y:9620899	Sem dados	20/08/2013	X	X
BM 96617*	Margem Direita	X:384865 Y:9627307	Sem dados	20/01/2016	X	X
BM 96615*	Margem Direita	X:384865 Y:9627307	Sem dados	20/01/2016	X	X
BM 97108*	Margem Direita	X:378476 Y:9638367	Sem dados	20/01/2016	X	X
BM 96614*	Margem Direita	X:384865 Y:9627307	Sem dados	20/01/2016	X	X
BM 92976*	Margem Direita	X:384875 Y:9626900	Sem dados	20/01/2016	X	X
BM 94383*	Margem Direita	X:387125 Y:9620100	Sem dados	20/01/2016	X	X
BM 54803*	Margem Direita	X:389625 Y:9622900	Sem dados	26/05/2015		X
BM 55617*	Margem Direita	X:388875 Y:9622500	Sem dados	26/05/2015		X
BM 55623*	Margem Direita	X:389125 Y:9623100	Sem dados	26/05/2015		X
BM 56345*	Margem Direita	X:388875 Y:9622100	Sem dados	26/05/2015		X
BM 52712*	Margem Direita	X:388625 Y:9625300	Sem dados	26/05/2015		X
BM 55415*	Margem Direita	X:389875 Y:9621300	Sem dados	26/05/2015		X
CX23	Ilha da Maravilha	X:396694 Y:9623241	X: 399749 Y: 9626463	18/07/2015	-	-
NG1522	Ilha da Maravilha	X:396694 Y:9623241	X: 399749 Y: 9626463	18/07/2015	X	X

NG1521	Ilha da Maravilha	X:396694 Y:9623241	X: 399749 Y: 9626463	18/07/2015	-	-
CX29	Ilha da Maravilha	X:396694 Y:9623241	X: 399749 Y: 9626463	18/07/2015	-	-
CX25	Ilha da Maravilha	X:396694 Y:9623241	X: 399749 Y: 9626463	18/07/2015	-	-
NG1520	Ilha da Maravilha	X:396694 Y:9623241	X: 399749 Y: 9626463	18/07/2015	-	-
CX24	Ilha da Maravilha	X:396694 Y:9623241	X: 399749 Y: 9626463	18/07/2015	-	-
NG1589	Ilha do Meio	X:397309 Y:9623089	X: 396551 Y: 9628497	29/07/2015	-	-
NG1506	Ilha do Meio	X:395854 Y:9620715	X:399749 Y:9626463	14/07/2015	-	X
CD 433	Ilha Pimental	X:397542 Y:9622005	X:402263 Y: 9623144	19/02/2015	-	X
CD 434	Ilha Pimental	X:397542 Y:9622005	X:402263 Y: 9623144	19/02/2015	-	X
CD 435	Ilha Pimental	X:397542 Y:9622005	X:402263 Y: 9623144	19/02/2015	X	X
CD 436	Ilha Pimental	X:397542 Y:9622005	X:402263 Y: 9623144	19/02/2015	X	X
CD 437	Ilha Pimental	X:397542 Y:9622005	X:402263 Y: 9623144	19/02/2015	-	-
DE011	Ilha Pimental	X:396875 Y:9622500	X:400742 Y: 9623841	19/02/2015	-	-
DE012	Ilha Pimental	X:396875 Y:9622500	X:400742 Y: 9623841	19/02/2015	X	X
NG39	Ilha Pimental	X:397125 Y:9622100	X: 399749 Y:9626463	18/03/2015	-	-

\*Amostras adicionadas à amostragem inicial

\*\*Coordenadas são dadas em UTM zona 22 S.

- Amostras que não geraram resultados de GBS e/ou Dloop satisfatórios

Do total de indivíduos amostrados, 32 foram analisados por Dloop, sendo 12 capturados na margem esquerda do rio Xingu, 13 na margem direita do rio Xingu e sete em três ilhas na região, sendo cinco na Ilha Pimental, uma na Ilha do Meio e uma na Ilha da Maravilha. Para as análises de GBS, foram utilizadas 15 amostras, sendo quatro delas coletadas de animais capturados na margem esquerda, sete na margem direita, e quatro nas ilhas: uma na Ilha da Maravilha e três na Ilha Pimental. Os animais amostrados foram capturados e transferidos, pelo Projeto de Salvamento e Aproveitamento Científico da Fauna, para áreas adjacentes, onde não ocorreu a inundação durante o processo de construção da UHEBM (ver Tabela 2).

Foram coletadas amostras de sangue venoso periférico, utilizando-se seringas de sucção com agulha de aproximadamente 0,2 centímetro cúbico. Cerca de 200-500 µl de sangue por indivíduo foi acondicionado em tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA (3,6 mg), os quais foram posteriormente estocados a -20°C. Além de amostras de sangue, foram coletadas também amostras de tecido (músculo) preservadas em álcool absoluto. As coletas e a utilização das amostras biológicas seguiram as normas e requerimentos éticos e legais estabelecidos pelo SISBIO (ICMBio, MMA, Governo Federal, Brasil), com licenças autorizadas e expedidas sob os números 71555-1 e 49643-1; pelo SISGEN (ICMBio, MMA, Governo Federal, Brasil), sob número A411359, e pelo Comitê de Ética no Uso e Experimentação Animal (CEUA) da

Universidade Federal de São Carlos, sob número 6618060320.

A extração do DNA genômico total foi realizada seguindo o protocolo de fenol-clorofórmio (GREEN; SAMBROOK, 2012) para as amostras de sangue, e o protocolo de extração por precipitação salina (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) para as amostras de músculo. A quantidade e qualidade do DNA extraído foi avaliada em fluorímetro Qubit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) para um mínimo de 5ng/μl e de razão de absorbância 260/280nm, e em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), para valores preferencialmente entre 1,7 a 1,9 para amostras livres de contaminação por proteína.

## **3.2. GBS (Genotyping by Sequencing)**

### **3.2.1. Construção da biblioteca de GBS**

Os procedimentos para construção das bibliotecas genômicas, para emprego da abordagem de GBS, seguiram o protocolo proposto por Elshire et al. (2011). Um total de 27 amostras de DNA de *A. belzebul* (Tabela 3) foi processado e disposto em placas e normalizado a 5ng/ul para redução da complexidade genômica, usando-se enzima de restrição *Pst*I. Após a digestão, foi feita a reação de ligação a sequências indexadoras e adaptadoras, por meio da ação da enzima *T4 DNA ligase*. Posteriormente, foram feitos *pools* das amostras, que foram purificados com *beads* magnéticas (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter). Os fragmentos de restrição gerados foram amplificados e purificados, e a qualidade da biblioteca final foi avaliada em equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EUA), usando-se o kit *High Sensitivity DNA*. A maior parte dos fragmentos de interesse estava entre 200 e 450 pares de bases, não tendo sido detectados picos entre 100 e 150pb, que acusam a presença de dímeros ou excesso de adaptadores. Por fim, a biblioteca final foi quantificada por meio de uma PCR em tempo real usando o kit KAPA Biosystems Quantification, diluída para 2pM. O sequenciamento foi realizado em Plataforma HiSeq 2500 Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA).

### **3.2.2. Processamento dos dados genômicos**

Primeiramente, a qualidade dos dados obtidos no sequenciamento foi avaliada no programa FastQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) sendo, no final, considerada satisfatória. Em seguida utilizamos o pipeline Stacks (Catchen et al. 2011, 2013) para demultiplexação e identificação dos SNPs. Primeiro, utilizando a função *process\_radtags*, os arquivos gerados pelo sequenciamento foram demultiplexados separando todas as sequências de acordo com sua amostra de origem a partir dos *barcodes* inseridos durante a preparação da biblioteca genômica. Nesse processo, as sequências de baixa qualidade foram eliminadas, mantendo aquelas com índice de pelo menos 33 na escala Phred 33. Com a função *ustacks*, construímos a lista de locos para cada amostra; com a *cstacks* criamos o catálogo de locos considerando todas as amostras; e com a *sstacks*, pareamos cada loco de cada amostra com o catálogo conjunto de locos. Para a etapa *ustacks*, configuramos para profundidade mínima de seis sequências em cada pilha, assim como a máxima distância de cinco nucleotídeos entre pilhas. Na construção do catálogo (*cstacks*), configuramos como cinco o número de bases discordantes no alinhamento. Na sequência, com a função *tsv2bam*, realizamos a transposição dos arquivos para o formato que permite análise dos dados, e com a função *gstacks* genotipamos cada loco listado. Por fim, usamos a função *populations* na etapa de filtragem para gerar os arquivos (.vcf, .genepop, .structure) para as análises populacionais. A porcentagem mínima de indivíduos por loco foi de 70% do total de amostras, sendo que em locos com mais de um SNP, apenas o primeiro foi selecionado.

Ao final, fizemos uma nova filtragem para o controle de qualidade dos dados de genótipos utilizando o pacote *r2vcftools* (<https://github.com/npope/r2vcftools>). Os dados foram filtrados para excesso de heterozigosidade com base em desvios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE,  $p < 0,0001$ ), desequilíbrio de ligação (LD,  $r^2 < 0,8$ ) e frequência do alelo menor (MAF) de 0,05%, tendo sido retidos apenas os locos encontrados em pelo menos um indivíduo de todos os grupos. Para identificar locos *outliers* em relação aos potencialmente neutros, utilizamos a abordagem baseada em distância de Mahalanobus, implementada no pacote PCAdapt v.4.3.3 (Luu et al. 2017) no ambiente R (R Development Core Team 2022).

### 3.2.3. Análises dos dados de SNPs

As análises para determinação de parâmetros de diversidade e diferenciação genética foram feitas utilizando apenas os locos neutros. Inicialmente fizemos uma Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), considerando o Critério de Informação Bayesiana (BIC), utilizando o pacote *adegenet* (JOMBART, 2008) no ambiente R (R Development Core Team 2022), para identificação de grupos genéticos distintos. Além disso, realizamos também uma Análise de Componentes Principais (PCA) (HOTELLING, 1933; PEARSON, 1901), utilizando a função *"pca"* do pacote LEA (FRICHOT; FRANÇOIS, 2015) para detectar estruturação populacional. O pacote LEA contém procedimentos para calibrar modelos estatísticos e controlar falsas taxas de descoberta. Por fim, realizamos uma análise de estruturação populacional utilizando a função *"snmf"* também disponível no mesmo pacote, que estima a ancestralidade individual e o agrupamento populacional utilizando uma fatoração de matriz não negativa (sNMF) e um procedimento de otimização de mínimos quadrados dos coeficientes de ancestralidade.

Adicionalmente, inferências de estruturação populacional foram tomadas baseadas na determinação do índice de fixação  $F_{ST}$  utilizando o pacote *"hierfstat"* (GOUDET; PERRIN; WASER, 2002). Essa função estima estatísticas do tipo F, incluindo níveis de endogamia e de coancestralidade a partir de organismos diploides, em vários níveis de hierarquia (PETIT; MOUSADIK; PONS, 1998). Nesse mesmo pacote, utilizamos as funções *"basic.stats"* para determinação das frequências alélicas e valores de heterozigosidade, *"nb.alleles"* para determinação do número de alelos e *"allelic richness"* para a estimativa de riqueza alélica (GOUDET; PERRIN; WASER, 2002). Todas essas análises foram realizadas no ambiente R (R Development Core Team, 2022).

### 3.3. Análises da região mitocondrial Dloop

#### 3.3.1. Amplificação e purificação do DNA mitocondrial (Dloop)

Para amplificação da região Dloop do DNA mitocondrial, foram utilizados os *primers* How-RA1 F (forward) (5' – CTACCATCAACACCCCAAAGC – 3') e How-RA2 R (reverse) (5' – ACCCGTCTAGACATTTTC – 3'), descritos por ASCUNCE et. al (2003). As reações de amplificação da região Dloop ocorreram nas seguintes condições: 1,25 µl de *Buffer* (1x); MgCl<sub>2</sub> a 3 mM; *primers forward* e *reverse* a 10 pmol; BSA a 0,30 mg/mL; 0,5 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®); dNTPs a 0,25 mM; 1 µl de DNA a 10 ng/µl ou a 50 ng/µl; e 6,85 µl de água ultrapura, para um volume final total de 12,5 µl de solução.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti™ 96 – Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos) e incluíram um primeiro estágio de desnaturação à 94°C por 2 minutos; seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94° C, 30 segundos à 52° C e 1 minuto de extensão à 72°C; com uma extensão final de 7 minutos a 72° C, e resfriamento posterior à 10 ° C.

As amostras que apresentaram padrão de amplificação satisfatório, checado em gel de agarose 1,5% em condição de corrida de 90 Volts por 45 minutos, foram purificadas seguindo o protocolo proposto por Lis (1980), com algumas modificações. Este procedimento visou eliminar dos produtos de PCR, resíduos de baixo peso molecular, tais como resquícios de sais, *primers* e/ou dNTPs. Em um microtubo de 0,2mL, uma solução de PEG/Glicogênio azul foi adicionada em igual volume às amostras a serem purificadas. Essa mistura foi homogeneizada e incubada em banho seco à 37°C por vinte minutos. Passados os vinte minutos, a solução foi centrifugada durante quinze minutos à 13.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 150µL de etanol 80% gelado. A amostra foi novamente centrifugada por dez minutos em igual rotação à centrifugação anterior. O sobrenadante foi descartado mais uma vez e foram adicionados 150µL de etanol 80% gelado ao pellet formado no fundo do tubo. A amostra foi centrifugada por dez minutos à 13000 rpm e o sobrenadante foi novamente descartado. Ao final, os tubos permaneceram secando à 37°C por cerca de 40 minutos. Após a secagem, o pellet foi ressuscitado em 10 µL de água ultrapura e as amostras foram

submetidas a sequenciamento em sequenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City CA, USA).

### 3.4. Análise dos dados de Dloop

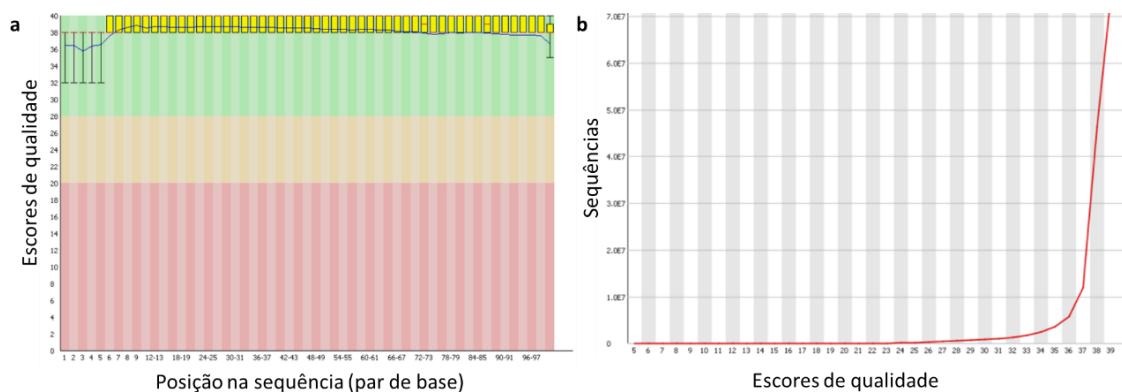
Todas as sequências obtidas pelo sequenciamento foram alinhadas e editadas utilizando o software Geneious R7 v6.1.6 (KEARSE *et al.*, 2012) e o ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) como algoritmo de alinhamento. O Mega v6 (TAMURA *et al.*, 2013) foi usado para calcular as médias das distâncias genéticas intra e interespecíficas, baseada no modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). Uma topologia *neighbor-joining* (NJ) (SAITOU & NEI, 1987) foi construída sob esse mesmo modelo com o objetivo de representar graficamente eventuais divergências genéticas encontradas. O suporte dos clados foi avaliado por *Bootstrap* (1000 pseudo-réplicas), conforme Felsenstein (1985). Os índices de diversidade genética, como diversidade nucleotídica, diversidade haplotípica, número de haplótipos e número de sítios polimórficos, foram estimados utilizando o programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009). As estimativas de estruturação genética foram obtidas por meio do programa BAPS (CORANDER *et al.*, 2008). Para estimar as relações genealógicas entre os haplótipos mitocondriais, foi construída uma rede de haplótipos por meio do programa PopART (LEIGH; BRYANT, 2015), gerada também a partir do método *neighbor-joining* (BANDELT *et al.*, 1999). Nesta representação, a frequência haplotípica é representada pelo tamanho de cada agrupamento representado pelos círculos, enquanto as cores de preenchimento de cada círculo referem-se à provável entidade/população/espécie pertencente.

Para as análises de Dloop, foram acrescentadas ao nosso conjunto de dados duas sequências da espécie *A. discolor* (TAP 315355, ID: NC\_064189.1; BM 48342, ID: OM328950.1), recentemente disponibilizadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizada para conferência de similaridade entre as sequências geradas no presente estudo e as disponíveis na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para verificar a possibilidade de amostragem de duas linhagens genéticas, a saber *A. belzebul* e *A. discolor*. Para tal uma árvore de haplótipos foi gerada usando-se o PopArt (LEIGH; BRYANT, 2015).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Dados de GBS

Após a análise de qualidade Phred (Figura 2) e filtragem das seqüências obtidas (Qscore >33), observamos grande variação do número de *reads* retidos por amostra analisada, o qual variou de 2.524 a 3.603.121 (Tabela 3). Assim, 12 amostras (destacadas com † na Tabela 3) foram excluídas das análises utilizando-se o critério de contagem de *reads* (<20.000).



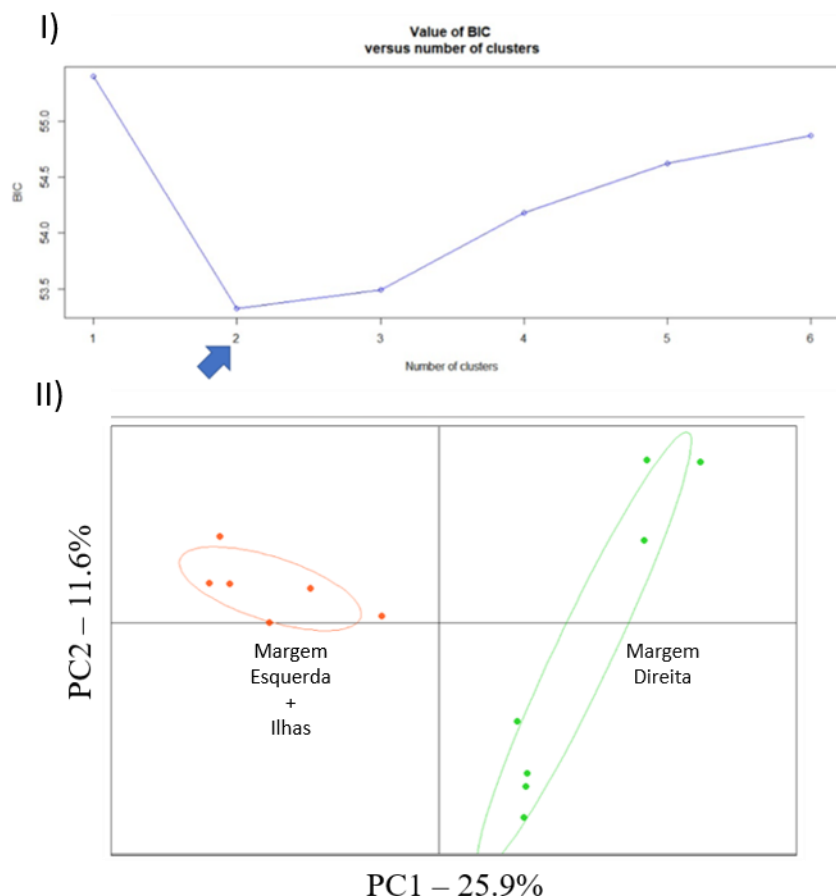
**Figura 2.** Qualidade do sequenciamento a partir do *score* de qualidade (escala Phred) a cada base (a) e pelo número de seqüências a cada valor de *score* (b).

Obtivemos um catálogo inicial com 190.554 locos. Após as filtrações iniciais, foram retidos 4.612 locos, com média de 12,2 amostras por loco, representados por 1.980 SNPs. Utilizando critérios de qualidade e filtragem final (ex. remoção de *indels*, exclusão de locos com MAF < 0.05%), o número de locos retidos foi igual a 1.334. Além disso, mais dois indivíduos (NG1522 e BM830) foram excluídos das análises, pois apresentaram 70% dos *loci* ausentes para este conjunto de dados. Adicionalmente, eliminou-se os locos que não estavam presentes em, no mínimo, 70% dos indivíduos. Dessa forma, ao final, foram mantidos 1.136 locos neutros e 198 locos que se comportaram como *outliers*.

Considerando o Critério de Informação Bayesiana (BIC) para a existência de dois grupos genéticos mais prováveis ( $k=2$ ), a Análise de Discriminante de Componentes Principais (DAPC) realizada para o conjunto de locos neutros apontou para a existência de dois agrupamentos genéticos bem diferenciados (Figura 3).

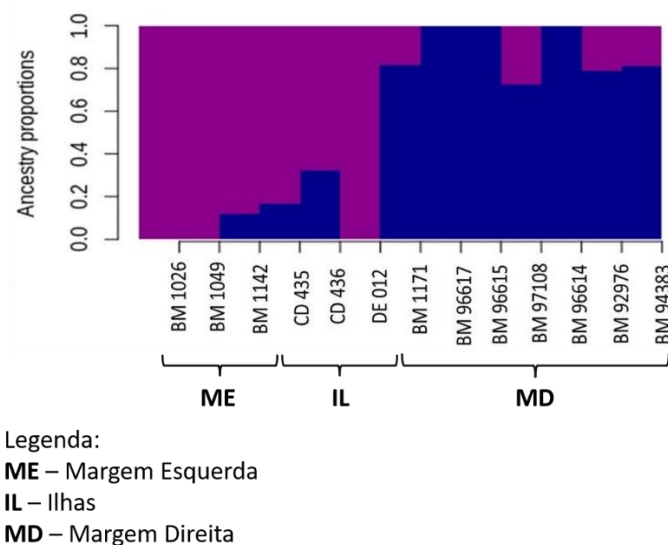
**Tabela 3.** Número de sequências por amostra, total e retidas após filtragem na etapa de demultiplexagem, usando o processo process\_radtags da pipeline Stacks (Catchen et al. 2011, 2013) e suas respectivas localidades de origem. Amostras indicadas com † foram excluídas das análises.

	<b>Total</b>	<b>Retidas</b>	<b>Localidade</b>
AC10508†	8.194	7.921	Margem Esquerda
CX23†	9.461	8.368	Ilha da Maravilha
CX24†	18.362	17.669	Ilha da Maravilha
CX25†	35.271	13.860	Ilha da Maravilha
CX29†	54.298	21.133	Ilha da Maravilha
BR5607†	19.636	18.551	Margem Esquerda
BR5608†	13.241	12.588	Margem Esquerda
BR5609†	12.864	12.469	Margem Esquerda
BR5610†	16.859	15.911	Margem Esquerda
NG1520†	12.236	11.816	Ilha da Maravilha
NG1521†	17.336	17.067	Ilha da Maravilha
NG1522	41.795	40.929	Ilha da Maravilha
BM0759†	34.326	2.524	Margem Esquerda
BM0830	543.580	176.395	Margem Esquerda
BM1026	3.543.444	3.384.428	Margem Esquerda
BM1049	3.671.257	3.603.121	Margem Esquerda
BM1142	2.030.010	1.995.121	Margem Esquerda
BM1171	2.262.124	2.233.067	Margem Direita
CD435	1.413.653	1.388.789	Ilha Pimental
CD436	781.023	754.143	Ilha Pimental
DE01	2.322.329	2.279.525	Ilha Pimental
BM96617	3.293.745	3.247.033	Margem Direita
BM96615	1.955.334	1.921.749	Margem Direita
BM97108	1.738.122	1.619.555	Margem Direita
BM96614	1.809.943	1.790.067	Margem Direita
BM92976	2.669.891	2.638.526	Margem Direita
BM94383	2.081.242	1.868.192	Margem Direita



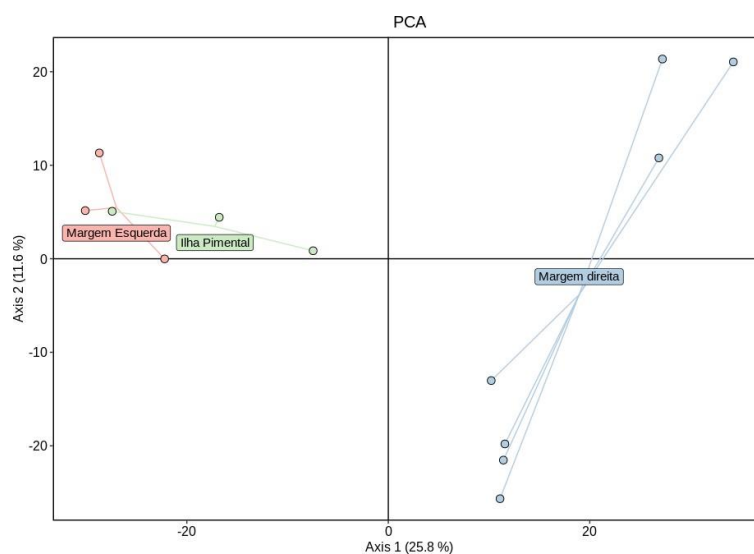
**Figura 3. I)** Presença de dois grupos genéticos mais prováveis, de acordo com o Critério de Informação Bayesiana do DAPC, como demonstra o ponto de inflexão da reta. **II)** Distribuição das amostras de acordo com os dados de DAPC, considerando  $k=2$ .

Com a análise de estruturação, identificamos também dois *clusters* genéticos; um deles reunindo amostras de sete indivíduos provenientes da margem direita do rio (BM1171, 95515, 96617, 97108, 96614, 92976 e 94383), e outro reunindo três indivíduos da margem esquerda do rio (BM1026, BM1049 e BM 1142) e três indivíduos da Ilha Pimental (CD435, CD436 e DE012) (Figura 4).



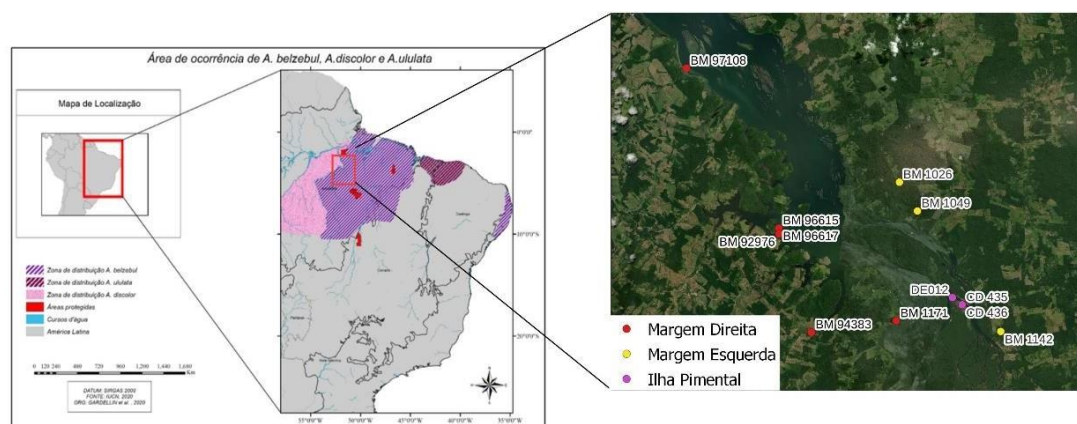
**Figura 4.** Análise de Discriminante de Componentes Principais (DAPC), considerando um valor de  $k=2$  como mais provável. Localidades de proveniência dos indivíduos são indicadas na legenda.

A distribuição dos indivíduos analisados evidenciada na Análise de Componentes Principais (PCA) também indicou a existência dois agrupamentos genéticos bem diferenciados, reunindo, mais uma vez, os animais da margem esquerda do rio Xingu com os animais da Ilha Pimental, que se localiza mais próxima da margem esquerda do rio. Além disso, estes indivíduos foram separados dos animais da margem direita (Figura 5).



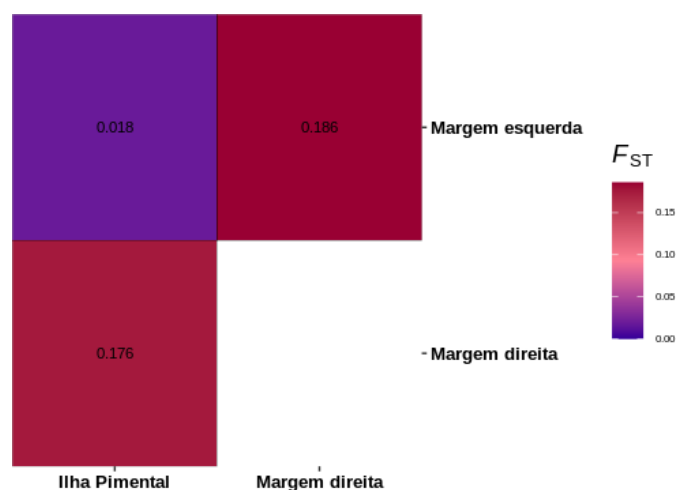
**Figura 5.** Identificação de dois grupos genéticos a partir da análise de componentes principais (PCA).

Estes dados sugerem o rio como uma possível barreira geográfica para o fluxo gênico (Figura 6).



**Figura 6.** Pontos de ocorrência dos indivíduos analisados com GBS na área de distribuição geográfica de *Alouatta belzebul*. A coloração dos pontos indica a localidade à qual o indivíduo pertence. Fonte: Ilustração elaborada pelo próprio autor.

Os resultados de índice  $F_{ST}$  confirmaram os dados obtidos nas análises anteriores, indicando ausência de diferenciação entre indivíduos da margem esquerda e a Ilha Pimental e diferenciação entre indivíduos da margem direita e esquerda (Figura 7).



**Figura 7.** Análises de  $F_{ST}$  indicam menor diferenciação entre a margem esquerda e a Ilha Pimental, confirmando os dados de DAPC.

Os dados de diferenciação genética levantados pela abordagem genômica sugerem, portanto, a existência de dois agrupamentos genéticos.

O número de táxons dentro do gênero *Alouatta* ainda é debatido entre diferentes autores, e muito é atribuído à similaridade fenotípica entre os táxons ou à falta de dados morfológicos satisfatórios para sanar incertezas taxonômicas

(ÁVILA, 2022; BOUBLI et al., 2008; BUCKNER et al., 2015; MERCÊS et al., 2015; MORALES-JIMENEZ et al., 2015; SILVA et al., 2018). Entretanto, a despeito de diversos autores tratarem *A. belzebul* como um complexo contendo subespécies e/ou não reconhecerem *A. discolor* como unidade válida distinta de *A. belzebul* (CABRERA, 1958; CORTÉS-ORTÍZ et al., 2015; GROVES, 2001; HILL, 1962; RYLANDS et al., 1995; VIANA et al. 2015), Gregorin (2006) propoe que *A. belzebul*, *A. ululata* e *A. discolor* sejam consideradas unidades taxonômicas diferentes, em nível de espécie. Essa proposição é parcialmente suportada por estudos recentes realizados por Ávila (2022), no qual Unidades Taxonômicas Moleculares (MOTUs) no gênero *Alouatta* foram caracterizadas através de análises de delimitação de espécie que diferenciaram *A. belzebul* de *A. discolor* molecularmente.

Tomando-se, portanto, como evidência a existência de duas linhagens bem diferenciadas dentro de nossa amostragem, e com base nos dados recentes publicados (Povill et al., 2022; Janiak et al., 2022; Ávila 2022), no presente trabalho, as análises para estimativas de diversidade genética foram conduzidas separadamente para cada linhagem identificada, considerando a classificação proposta por Gregorin (2006) e a distribuição geográfica de ambas as linhagens, a saber: *A. discolor* (margem esquerda e ilhas do rio Xingu) e *A. belzebul* (margem direita do rio Xingu).

Os valores de heterozigosidade e riqueza alélica evidenciaram uma alta diversidade genética para ambas as linhagens (Tabela 4), e, embora, até a presente data, não haja na literatura dados de diversidade genética para *Alouatta* reportados através de análises de GBS, os nossos achados apontam para uma diversidade genética nesta espécie superior a encontrada para o gênero *Leontopithecus* utilizando esta mesma abordagem genômica (AYALA-BURBANO, 2020; ALIAGA-SAMANEZ, 2022).

**Tabela 4.** Valores de parâmetros de diversidade para os dois grupos genéticos encontrados.

	Margem Esquerda/Ilha Pimental ( <i>A. discolor</i> )	Margem Direita ( <i>A. belzebul</i> )
Nº Total de Alelos	1962	2040
Ho (médio)	0,432	0,451
Hs (médio)	0,315	0,323
FIS (médio)	-0,330	-0,322
n.ind.samp*	5,074	6,334

\*"n.ind.samp" indica o número de genótipos para os grupos genéticos analisados.

Os valores de diversidade genética se apresentaram similares para ambas as linhagens. Além disso, os valores de heteroziguidade indicaram excesso de heterozigotos, o que pode sugerir a existência de gargalos populacionais (SANTOS, 2011). Isto pode ser admitido considerando que o gargalo contribui para perda de alelos, especialmente os raros, aspecto este que, a curto prazo, é muito mais rapidamente observado do que a perda de heteroziguidade (ALMEIDA, SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2003). Estes efeitos são geralmente apresentados por locos neutros quando os tamanhos efetivos populacionais são reduzidos. Nestes casos, a heteroziguidade observada se apresenta maior que a esperada para o número de alelos encontrados na amostragem. Tais excessos de heterozigotos tendem a se apresentar até um certo número de gerações, até que um novo equilíbrio seja estabelecido (CORNUET; LUIKART, 1996).

Embora a relativa alta diversidade genética estimada para *Alouatta* a partir de dados genômicos obtidos em larga escala seja um dado inédito para o grupo, estudos utilizando marcadores de microssatélites já reportaram resultados similares aos encontrados para populações de *A. belzebul* de ambas as margens do rio Tocantins (NASCIMENTO et al., 2008; BASTOS et al., 2010). Além disso, estudos realizados com o marcador mitocondrial Dloop também reportaram alta diversidade genética para *A. caraya* provenientes de seis áreas das regiões do nordeste da Argentina e sul do Paraguai (ASCUNCE et al., 2007; OKLANDER et al., 2017).

#### **4.2. Análises da região Dloop do DNA mitocondrial**

As análises com o marcador Dloop foram realizadas em uma amostragem ampliada composta por 27 indivíduos, dos quais 24 sequências foram obtidas após alinhamento e edição. Além dessas, como já mencionado, foram acrescentadas nesta abordagem duas sequências de *A. discolor* (Accession Numbers: TAP 315 355 e BM 48342), obtidas da publicação recente de Janiak et al. (2022), mostrando que uma das linhagens identificadas no presente trabalho é de fato *A. discolor*, como demonstrado mais adiante. Assim, para a região Dloop, foi analisado um total de 26 sequências, sendo 11 da margem direita, 9 da margem esquerda e 6 de ilhas (Tabela 5). Após edição e alinhamento do

conjunto total de sequências consideradas, obtivemos uma média de comprimento dos fragmentos Dloop de 1014 pb, com 120 sítios polimórficos. Destes, 89 foram parcimoniosamente informativos e 31 sítios se constituíram *singletons*.

As análises utilizando o *software* BAPS apontaram para um  $k=3$ , indicando a existência de duas linhagens distintas (Figura 8), *A. belzebul* e *A. discolor*, o que está de acordo com os resultados recentemente reportados por Povill *et al.* (2022). Além disso, foram evidenciados dois haplogrupos dentro de *A. belzebul*, um desses formado por três indivíduos capturados na margem direita do rio Xingu (MBF 477, MBF 480, MBF 482) e dois indivíduos da margem esquerda (BR 5608, BR 5609).

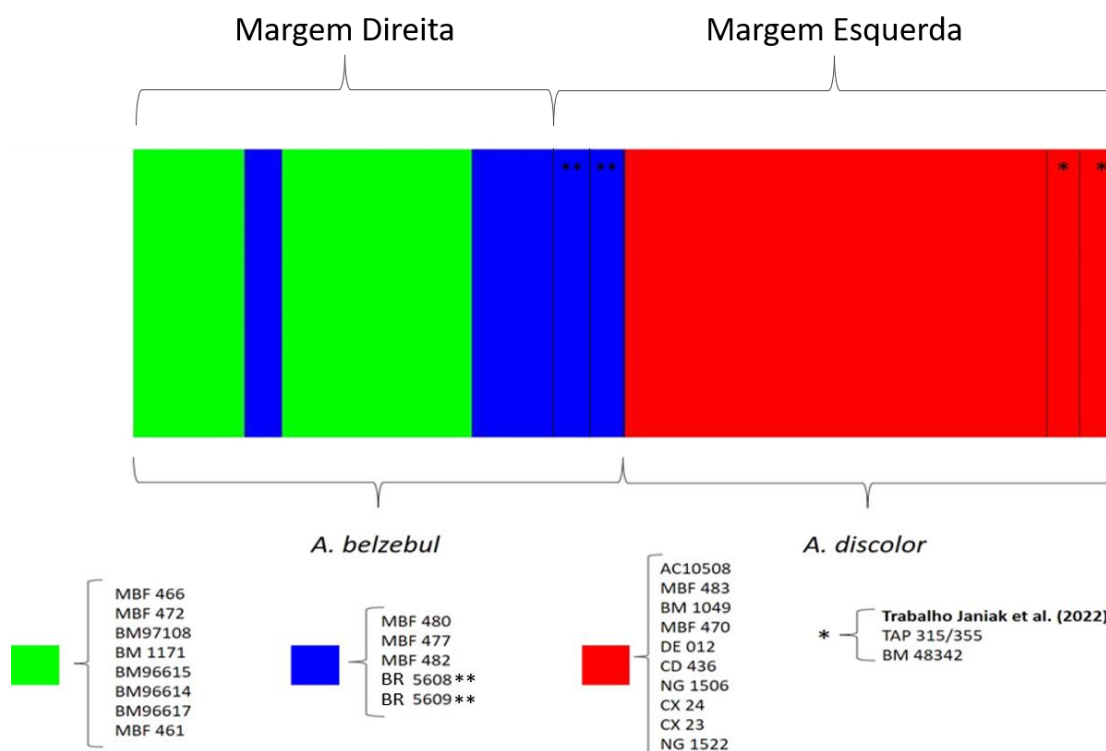
Os indivíduos pertencentes ao agrupamento aqui denominado *A. belzebul*, apresentaram uma distância intra-grupo de 0,02%. Já os indivíduos pertencentes a linhagem *A. discolor*, capturados na margem esquerda do rio, apresentaram valor de 0,01%. Os valores de distância entre linhagens foi 0,0634% (Tabela 6) e entre haplogrupos foi de 0,0267% (Tabela 7). Desta forma, as distâncias intragrupo se apresentam superiores à distância intergrupo, enquanto as distâncias entre haplogrupos se apresentam baixas, o que faz sentido, considerando os resultados de estruturação pelo índice *Fst* e os resultados obtidos pelo *software* BAPS.

A topologia da árvore de distância também corroborou a existência das duas linhagens evolutivas, com valor máximo de suporte (100). Mais uma vez, a linhagem nomeada *A. belzebul* reuniu todos os indivíduos da margem direita, além de dois indivíduos da margem esquerda (BR5608 e BR609). A linhagem *A. discolor* agrupou os demais indivíduos da margem esquerda e os indivíduos capturados em três ilhas (DE 012, NG1506, CD 436, CX 23, CX 24 e NG 1522) (Figura 9).

**Tabela 5.** Amostras de *A. belzebul* utilizadas nesse trabalho com dados de identificação (ID), local de origem, coordenadas geográficas, data de coleta e tipo de tecido. Amostras indicadas com \* não passaram das etapas de alinhamento e filtragem e amostras indicadas com \*\* foram obtidas do trabalho de Janiak *et al.* (2022).

ID	Coord X	Coord Y	Margem	Data de Coleta	Tecido
BM54803 / MBF 466	389625	9622900	Direita	26/05/15	Músculo
BM55617 / MBF 472	388875	9622500	Direita	26/05/15	Músculo

BM 97108	378476	9638367	Direita	20/01/16	Músculo
BM 1171	392989	9620899	Direita	20/08/13	Músculo
BM 96617	384865	9627307	Direita	20/01/16	Músculo
BM 96615	384865	9627307	Direita	20/01/16	Músculo
BM 96614	384865	9627307	Direita	20/01/16	Músculo
BM55623 / MBF 461	389125	9623100	Direita	26/05/15	Músculo
BM56345 / MBF 480	388875	9622100	Direita	26/05/15	Músculo
BM52712 / MBF 477	388625	9625300	Direita	26/05/15	Músculo
BM55415 / MBF 482	389875	9621300	Direita	26/05/15	Músculo
BR 5608	416874	9639102	Esquerda	04/04/15	Sangue
BR 5609	416874	9639102	Esquerda	04/04/15	Sangue
AC10508	414625	9644101	Esquerda	25/03/15	Sangue
BM1115789 / MBF 483	412792	9648715	Esquerda	26/05/15	Músculo
BM115771/ MBF 453	413175	9648600	Esquerda	26/05/15	Músculo
BM 1049	394450	9628490	Esquerda	04/06/13	Músculo
BM115793/ MBF 470	412792	9648715	Esquerda	26/05/15	Músculo
DE012	396875	9622100	Ilha Pimental	19/02/15	Sangue
CD 436	397542	9622005	Ilha Pimental	19/02/15	Sangue
NG 1506	395854	9620715	Ilha do Meio	14/07/15	Sangue
CX 24	396694	9623241	Ilha da Maravilha	18/07/15	Sangue
CX 23	396694	9623241	Ilha da Maravilha	18/07/15	Sangue
NG 1522	396694	9623241	Ilha da Maravilha	18/07/15	Sangue
TAP 315/355**	695870	9620043	Esquerda	-	-
BM 48342**	391729	9627257	Esquerda	-	-
BM 0708*	417809	9655333	Esquerda	28/11/13	Músculo
BM 87722*	410336	9637937	Esquerda	20/01/16	Músculo
BM 0828*	407289	9633582	Esquerda	25/02/13	Músculo



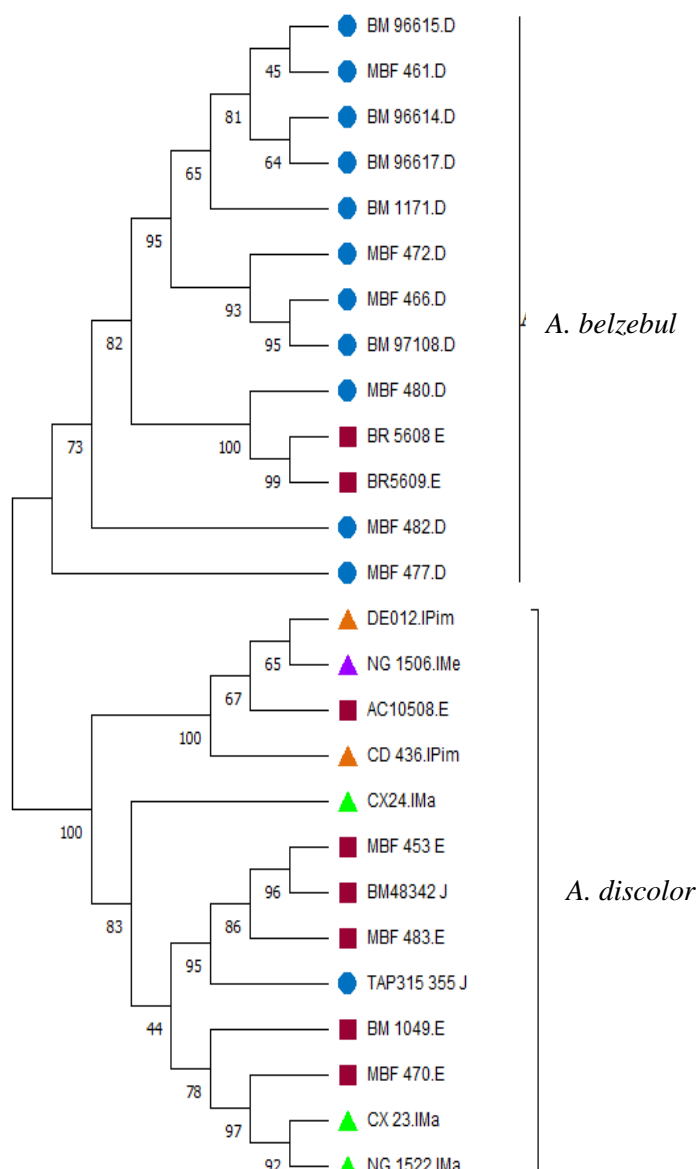
**Figura 8.** Resultado dos agrupamentos dos 26 indivíduos em estudo, segundo o software BAPS. Os resultados indicam a presença de um  $k=3$ , com a separação de *A. discolor* (em vermelho) e *A. belzebul*, este último apresentando dois haplogrupos (verde e azul).

**Tabela 6.** Média das distâncias genéticas e desvio padrão, através do modelo K2P entre as duas linhagens de *A. belzebul*. Em negrito, na diagonal, são os valores médios das distâncias intragrupo.

	<i>A. belzebul</i>	<i>A. discolor</i>
<i>A. belzebul</i>	<b>0,02</b>	
<i>A. discolor</i>	0,0634 ( $\pm 0,0075$ )	<b>0,01</b>

**Tabela 7.** Média das distâncias genéticas e desvio padrão, através do modelo K2P entre os três grupos de *A. belzebul*. Em negrito, na diagonal, são os valores médios das distâncias intragrupo.

	<i>A. belzebul</i> Haplogrupo 1	<i>A. belzebul</i> Haplogrupo 2	<i>A. discolor</i>
<i>A. belzebul</i> Haplogrupo 1	<b>0,01</b>		
<i>A. belzebul</i> Haplogrupo 2	0,0267 ( $\pm 0,0039$ )	<b>0,03</b>	
<i>A. discolor</i>	0,0625 ( $\pm 0,0078$ )	0,0649 ( $\pm 0,0039$ )	<b>0,01</b>



**Figura 9.** Topologia da árvore de distância (KP2) a partir do marcador Dloop em 26 amostras de *A. belzebul* da região de Vitória do Xingu. Os símbolos e cores representam as cinco localidades estudadas: margem direita do rio Xingu (círculo azul), margem esquerda do rio Xingu (quadrado roxo), Ilha Pimental (triângulo laranja), Ilha da Maravilha (triângulo verde) e Ilha do Meio (triângulo lilás).

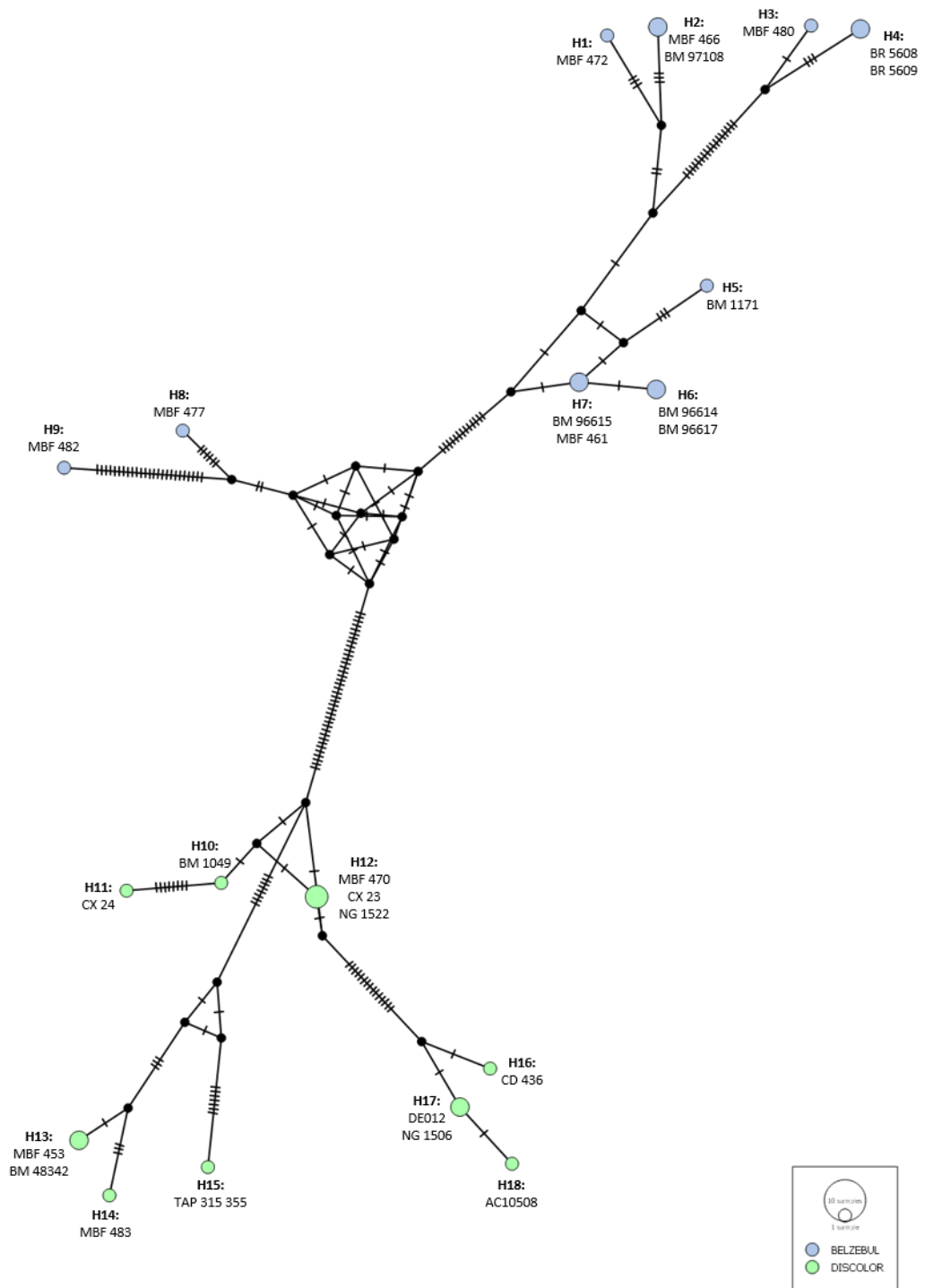
Quanto ao número de haplótipos, foi identificado um total de 18 haplótipos (H1-H18), não tendo sido observado compartilhamento de haplótipos entre as linhagens (Figura 10). Além disso, observa-se a presença de quatro haplótipos ancestrais entre indivíduos da linhagem *A. belzebul* (H4: BR5608 e BR5609; H2: MBF 466 e BM 97108; H6: BM 96614 e BM 96617; e H7: BM 96615 e MBF 461), e de três haplótipos ancestrais entre indivíduos da linhagem *A. discolor* (H12: MBF 470, CX 23 e NG 1522; H13: MBF 453 e BM 48342; e H17: DE012 e NG

1506). Quanto à diversidade genética estimada com base no programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009), todos os grupos evidenciaram valores de diversidade haplotípica altos, variando entre 0,936 (*A. discolor*) e 0,949 (*A. belzebul*). Os valores de diversidade nucleotídica se apresentaram igualmente elevados, variando de 0,0146 a 0,0186 para *A. discolor* e *A. belzebul*, respectivamente (Tabela 8).

**Tabela 8.** Índices de diversidade genética para os grupos de *Alouatta belzebul* da região de Vitória do Xingu (PA). **N:** Número de sequências analisadas; **S:** Número de sítios polimórficos; **h:** Número de haplótipos; **Hd:** Diversidade haplotípica; **Pi:** Diversidade nucleotídica.

Localidade	N	S	h	Hd	Pi
<i>A. belzebul</i>	13	65	9	0,949	0,0186
<i>A. discolor</i>	13	40	9	0,936	0,0146

Os altos índices de diversidade haplotípica e nucleotídica, e o alto número de passos mutacionais observado entre alguns haplótipos pode ser atribuído, conforme relatado no relatório anterior, à possibilidade de existência de uma população grande e estável no passado, a qual se divergiu a partir do isolamento promovido, provavelmente, por barreira geográfica. Neste contexto, Boubli et al. (2015) reforçam a ideia de que os primatas alcançaram a região neotropical no final do Oligoceno, ou seja, anteriormente à etapa final de soerguimento dos Andes e da subsequente reorganização do sistema de drenagem amazônico (BOUBLI et al., 2015; CAMPBELL et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2009; HOORN et al., 2010; LATRUBESSE et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2013; RIBAS et al., 2012), de forma que a formação de novos rios com o decorrer do tempo foi um importante fator de vicariância entre e dentro de espécies (BOUBLI et al., 2015).



**Figura 10.** Rede de haplótipos dos grupos *Alouatta belzebul* e *Alouatta discolor* provenientes das três ilhas, da Margem Direita e Margem Esquerda do rio Xingu (PA).

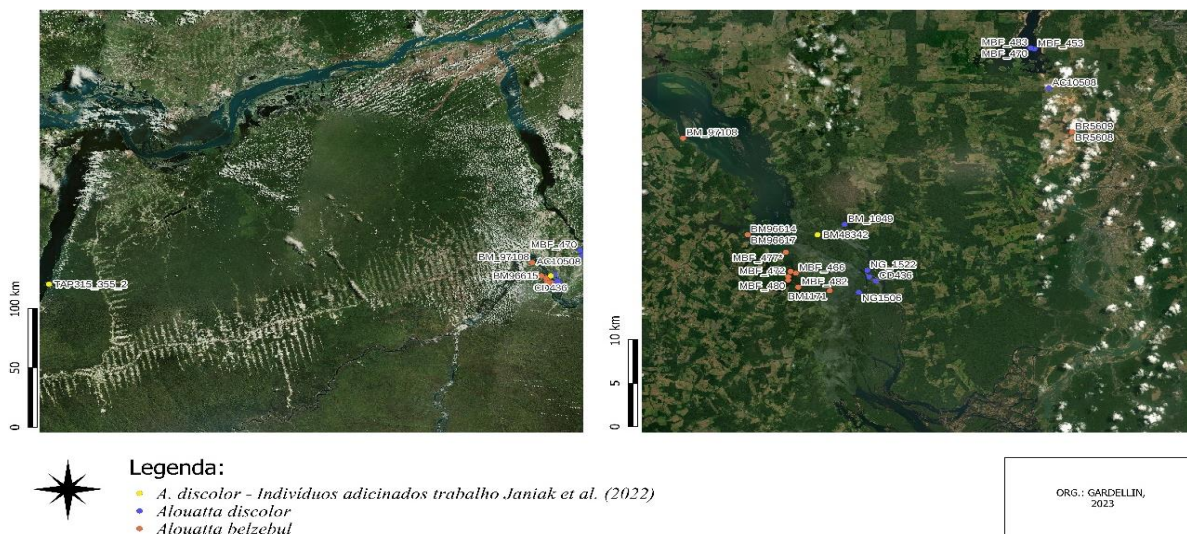
Uma segunda hipótese plausível poderia ser a ocorrência de um contato secundário entre linhagens distintas, anteriormente alopátricas (GRANT *et al.*, 1998). Os nossos achados mostraram que dois indivíduos (BR 5608 e BR 5609) catalogados como sendo da margem esquerda se apresentam agrupados aos indivíduos da margem direita, linhagem aqui denominada como sendo *A.*

*belzebul*, os quais geograficamente se distribuem na margem direita do rio (Figura 11).

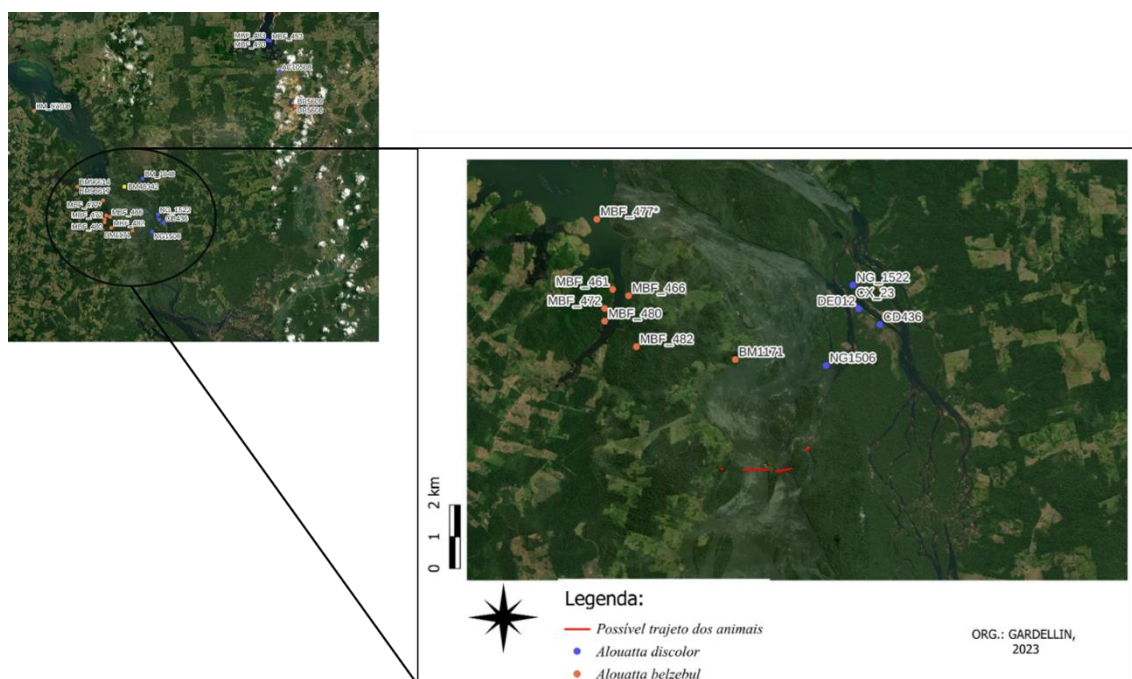
O grande número de passos mutacionais na rede haplotípica, principalmente observados entre os indivíduos destacados em azul e verde, contribui ainda mais para a hipótese de que estes constituem duas Unidades Evolutivas Significantes (ESU) distintas e, por isso, sugere que estas devam ser tratadas como unidades independentes (MUNIZ, 2012), ainda que registros fósseis desta região não estejam disponíveis para confirmar estes dados. Também é importante considerar que sítios mitocondriais têm maior probabilidade de acumular mutações em comparação a genes nucleares, mesmo que estas sejam potencialmente desvantajosas frente ao ambiente. Esta característica é corroborada por pequenos tamanhos populacionais associados à herança mitocondrial essencialmente haploide (NEIMAN; TAYLOR, 2009; XU et al, 2012), impulsionada por ambientes mitocondriais mais oxidativos e menor capacidade de reparo de DNA em relação ao genoma nuclear (FELSENSTEIN, 1974; MULLER, 1964).

Os estudos de Hernandez-Camacho e Cooper (1976) apontam para os bugios como detentores de alta capacidade de natação, tendo sido observados cruzando rios com distâncias entre 200 e 300 metros de largura. Este fato pode justificar a presença atual na margem esquerda dos indivíduos BR 5608 e BR5609, identificados geneticamente como sendo *A. belzebul*, e, portanto, provenientes da margem direita do rio. Neste caso, considerando a impossibilidade de erros de registros das procedências, estes bugios teriam migrado da margem direita para a margem esquerda, provavelmente à nado, tendo sido capturados nesta última margem no período da operação de salvamento e resgate dos animais.

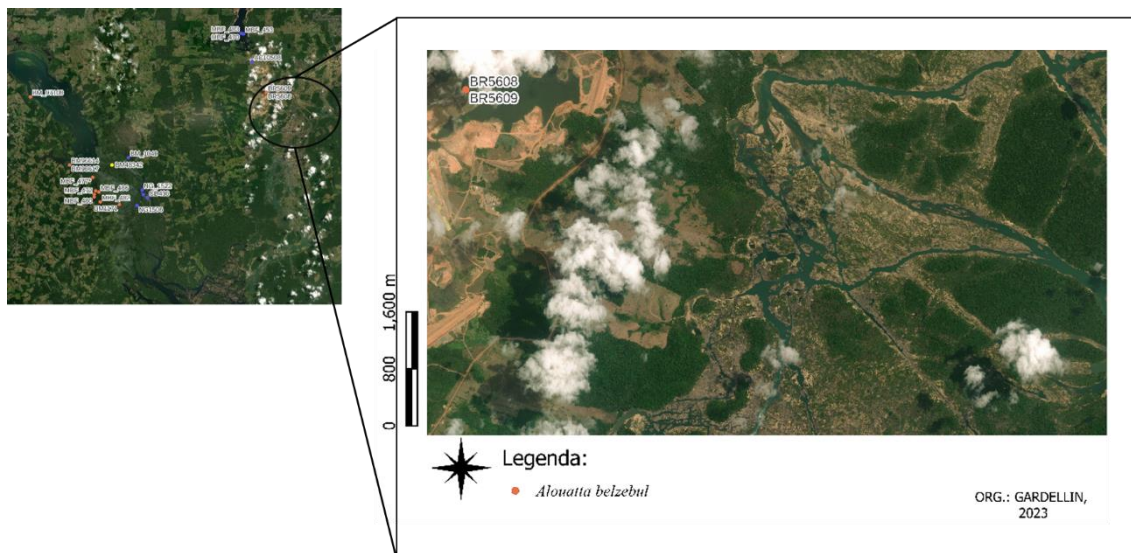
De fato, certos trechos do rio apresentam larguras de cerca de 100 metros entre uma margem e uma ilha, e de cerca de 500 metros de uma ilha a outra margem (Figura 12), o que poderia sustentar a hipótese levantada. Adicionalmente, os trechos entre ilhas e margem, na região próxima à coleta destes dois indivíduos, não ultrapassam 250 metros (Figura 13), o que torna ainda mais possível que estes tenham atravessado originalmente da margem direita para a margem esquerda do rio Xingu.



**Figura 11.** Imagem ilustrando a distribuição dos indivíduos analisados no presente trabalho. A cor indica o agrupamento genético do indivíduo. As amostras em laranja representam o agrupamento *A. belzebul* e as amostras em azul representam amostras pertencentes ao agrupamento *A. discolor*. As amostras de Janiak et al (2022) (em amarelo) também compõe o agrupamento *A. discolor*. Fonte: Bing Satellite, 2015.



**Figura 12.** Imagem ilustrando um possível trajeto de migração dos indivíduos de uma margem a outra do rio Xingu. As linhas em vermelho indicam os trajetos que os indivíduos BR5608 e BR5609 poderiam ter percorrido em etapas, à nado. Fonte: Bing Satellite, 2015.



**Figura 13.** Região nas proximidades dos indivíduos BR5608 e BR5609. A maioria dos braços de rios deste trecho não ultrapassa 250 metros entre ilhas e margens, corroborando a hipótese de estes animais terem atravessado da margem direita para a esquerda e explicando sua similaridade genética maior com indivíduos de *A. belzebul*. Fonte: Bing Satellite, 2015.

## 5. Considerações Finais

A análise conjunta dos dados Dloop e de GBS converge para o cenário de existência de duas unidades taxonômicas, uma delas composta por indivíduos da margem esquerda do rio Xingu e indivíduos das Ilha Pimental; e outra composta essencialmente por indivíduos da margem direita. Além disso, as análises de Dloop indicam a presença de dois haplogrupos dentro de *A. belzebul*. Tais resultados são importantes no que diz respeito à distribuição dos táxons e das populações caracterizadas na área de estudo, uma vez que estes bugios foram resgatados pelos profissionais envolvidos no Projeto de Salvamento e Aproveitamento Científico da Fauna e transferidos para áreas adjacentes aos seus locais de origem, antes da inundação para implantação da UHEBM.

A mistura de espécimes de linhagens evolutivas distintas ou a separação de espécimes de uma mesma linhagem evolutiva e/ou população geneticamente estruturada pode trazer consequências negativas para viabilidade destas. No primeiro caso, pode ocorrer o surgimento de linhagens híbridas com menor valor adaptativo (RIDLEY, 2009; WRIGHT; TREGENZA; HOSKEN, 2008), ou ao contrário de linhagens superiores que compitam com as linhagens puras e se sobreponham à estas (FRANKHAM, 2005, 2008; FREEMAN, 2009; RIDLEY, 2009). No segundo caso, pode haver redução de diversidade genética, devido a

eventos de deriva e efeito fundador, além do aumento na taxa de endocruzamentos pela redução populacional (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013; FRANKHAM, 2005, 2008; RIDLEY, 2009; WRIGHT; TREGENZA; HOSKEN, 2008). Adicionalmente, à despeito dos altos valores de diversidade genética estimados em ambas as linhagens, o excesso de heterozigotos observados em relação ao que seria esperado pode indicar a existência de gargalos populacionais, e consequente redução de diversidade genética pela perda de alelos raros. A detecção de haplogrupos distintos dentro de *A. belzebul*, ainda que geograficamente não estruturados, sugere diferenciação. Assim, os padrões de estruturação e diversidade genética levantados neste estudo podem servir como base de conhecimento para que as entidades manejadoras da espécie e os órgãos tomadores de decisão, possam estabelecer práticas de manejo adequadas na área de estudo visando a conservação da(s) espécie(s). As informações trazidas aqui também são úteis no manejo e conservação de outros táxons, servindo de modelo para estudos similares.

## 6. Conclusões

Considerando os objetivos iniciais de trabalho, o presente estudo foi capaz de estimar os níveis de diversidade genética para as populações amostradas, antes da inundação da UHEBM, tanto em termos de diversidade haplotípica e nucleotídica, inferidos pela análise do marcador Dloop, quanto de diversidade genômica nuclear, inferida pelos dados de SNPs, os quais indicaram alta variação genética para as linhagens identificadas. Deste modo, nosso primeiro objetivo de trabalho foi alcançado. Em relação a caracterização do padrão de distribuição da diversidade genética e de estruturação populacional na amostragem de estudo, proposto como segundo objetivo específico deste trabalho, os resultados obtidos foram além do esperado, já que, com a amostragem ampliada, pudemos identificar a existência de duas linhagens evolutivas, aqui assumidas como sendo *A. discolor* e *A. belzebul*, além de detectar estruturação populacional dentro de *A. belzebul*, evidenciada pela existência de dois haplogrupos diferenciados. Por fim, os achados deste estudo contribuem com informações relevantes ao melhor entendimento de questões relativas à diversificação do grupo, bem como ao manejo e conservação do

complexo *A. belzebul*, satisfazendo, desta forma, o terceiro objetivo deste projeto, uma vez que a detecção de diversidade oculta é um dos primeiros passos para que planos de conservação da biodiversidade sejam geridos adequadamente. Neste sentido, ressaltamos a relevância de manejar e monitorar de forma adequada as linhagens aqui identificadas; e sugerimos investigar a existência de híbridos, já que embora não tenhamos detectado sinal de hibridização nas amostras analisadas por GBS, que não incluíram os animais da linhagem da margem direita que foram encontrados na margem esquerda do rio Xingu pela análise de Dloop, o achado indica a existência de uma possível zona de contato, propícia à hibridização.

## Referências

- AGUIAR, L. D. M.; REIS, N. R.; LUDWIG, G.; ROCHA, V. J. Dieta, área de vida, vocalizações e estimativas populacionais de *Alouatta guariba* em um remanescente florestal do Norte do estado do Paraná. **Neotropical Primates**, [s. l.], v. 11, [s.n], August, p. 78–86, 2003.
- A História de Belo Monte – Cronologia. Norte Energia. Disponível em: <<https://www.norteenergiasa.com.br/pt-br/uhe-belo-monte/historico>>. Acesso em: 21 nov. 2020.
- ALEXANDER, D. H.; LANGE, K. Enhancements to the admixture algorithm for individual ancestry estimation. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 12, n. 246, 2011.
- ALIAGA-SAMANEZ, G.G.. Caracterização da diversidade e estrutura genética de uma população invasora e investigação de possíveis híbridos entre as espécies ameaçadas *Leontopithecus rosalia* e *Leontopithecus chrysomelas*. Dissertação (Mestrado), 2022.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25, 4692–4693.
- ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 697–709, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2844>.
- Amostras para a Biologia Molecular: Boas Práticas na Coleta e Preparo. KASVI, 20 dez. 2019. Disponível em: <https://kasvi.com.br/amostras-biologia-molecular-boas-praticas-coleta-preparo>. Acesso em: 03 mai. 2022.
- ANDRADE, André Luiz Campos de; MATTEI, Lauro. A (in)sustentabilidade da matriz energética brasileira. **Revista Brasileira de Energia**. v. 19, n. 9 o . 2, pp. 9-36, 2o Sem. 2013.
- ANDRIOLO, A.; FAULHABER, A. C. L.; JUNIOR, A. P.; MARTINS, A. rodrigues; MACHADO, A. M. de O. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica**, 2014. Disponível em: <[http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/livro\\_coleta\\_biologica2013.pdf](http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/livro_coleta_biologica2013.pdf)>

- ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; DIAS, P. A. D. Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: A review. **American Journal of Primatology**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 1–16, 2010.
- ASCUNCE, M. S.; CORTES-ORTIZ, L.; MUDRY, M. D. The mitochondrial control region of the black howler monkey, *Alouatta caraya* (Primates, Platyrrhini), and the development of new primers. **Molecular Ecology Notes**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 372–375, 2003.
- ASCUNCE, M. S.; HASSON, E.; MULLIGAN, C. J.; MUDRY, M. D. Mitochondrial sequence diversity of the southernmost extant New World monkey, *Alouatta caraya*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 202–215, 2007.
- ASCUNCE, M. S.; OKLANDER, L.; MUDRY, M. D. Amplification of mitochondrial COII gene from DNA extracted from hair samples in some species of new world monkeys. **Folia Primatologica**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 165–167, 2003.
- ÁVILA, L. P. F.. Unidades taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) identificadas dentro do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 (Atelidae, Primates) por abordagens de delimitação de espécies single-gene (mtDNA). Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2022.
- AVISE J. C.. Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, London, 1994.
- AVISE, J. C; ARNOLD, J; BALL, R.M.. Intraespecific phylogeographic: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, v. 18, pp. 489- 522, 187.
- AYALA-BURBANO, P. A.; CALDANO, L.; JUNIOR, P. M. G.; PISSINATTI, A.; MARQUES, M. C.; WORMELL, D.; DOMINGUES DE FREITAS, P. Genetic assessment for the endangered black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), Callitrichidae, Primates. **American Journal of Primatology**, [s. l.], v. 79, n. 12, p. 1–13, 2017.
- AYALA-BURBANO, P. A.; GALETTI JUNIOR, P. M.; WORMELL, D.; PISSINATTI, A.; MARQUES, M. C.; DE FREITAS, P. D. Studbook and molecular analyses for the endangered black-lion-tamarin; an integrative approach for assessing genetic diversity and driving management in captivity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A.. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol.Evol.*, v. 16, p. 37-48, 1999.
- BASTOS, H. B.; GONÇALVES, E. C.; FERRARI, S. F.; SILVA, A.; SCHNEIDER, M. P. C. Genetic structure of red-handed howler monkey populations in the fragmented landscape of eastern Brazilian Amazonia. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 774–780, 2010.
- BECHE, M. Caracterização da variabilidade genética de *Bombus morio* do Rio Grande do Sul baseada no mtDNA (COI). Dissertação (Mestrado), Rio Grande do Sul, 2019.
- BERGL, R. A.; VIGILANT, L. Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of the Cross River gorilla (*Gorilla gorilla diehli*). **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 501–516, 2007.
- BICCA-MARQUES, J. C. How do Howler Monkeys Cope with Habitat Fragmentation? **Primates in Fragments**, [s. l.], n. 2000, p. 283–303, 2003.

- BICCA-MARQUES, J.C. et al. Avaliação do risco de extinção de *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940 no Brasil. **ICMBIO**, 2021. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7179-mamiferos-alouatta-guariba-clamitans-guariba-ruivo>>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- BIJLSMA, R.; BUNDGAARD, J.; BOEREMA, A. C. Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: Predictions from *Drosophila*. **Journal of Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 502–514, 2000.
- BONVICINO, C. R.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A. A study of pelage color and geographical distribution in *Alouatta belzebul* (PRIMATES: CEBIDAE). **Revista Nordestina de Biologia**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 139–148, 1989. Disponível em: <<http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/revnebio/article/view/16762>>.
- BOUBLI, J. P.; RIBAS, C.; LYNH ALFARO, J. W.; ALFARO, M. E.; DA SILVA, M. N. F.; PINHO, G. M.; FARIAS, I. P.. Spatial and temporal patterns of diversification on the Amazon: A test of the riverine hypothesis for all diurnal primates of Rio Negro and Rio Branco in Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, pp. 400–412, 2015.
- BOUBLI, J.P.; SILVA, M.N.F.; AMADO, M.V.; HRBEK, T.; PONTUAL, F.B.; FARIAS, I.P.. A taxonomic reassessment of *Cacajao melanocephalus* Humboldt (1811), with the description of two new species. *International Journal of Primatology*, v. 29, n. 3, pp. 723 – 741, 2008.
- BRANDÃO, R. Rio Xingu não tem piracema por causa de Belo Monte. **Amazônia Real**. Disponível em: <<https://racismoambiental.net.br/2020/11/17/rio-xingu-nao-tem-piracema-por-causa-de-belo-monte/>>. Acesso em: 22 nov. 2020.
- BRASIL. RIMA - Aproveitamento Hidrelétrico Belo Monte - Relatório de Impacto Ambiental-RIMA. **Ibama**, [s. l.], v. 36, p. 100, 2009.
- BRAVO, S. P.; SALLENAVE, A. Foraging behavior and activity patterns of *Alouatta caraya* in the northeastern Argentinean flooded forest. **International Journal of Primatology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 825–846, 2003.
- CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos da America del Sur. **Revista del Museu Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”**, Ciencia Zoológica, Buenos Aires, v. 9, pp. 1-307, 1958.
- CAMARGO, C. C. **Ecologia Comportamental de *Alouatta belzebul* (Linnaeus, 1766) na Amazônia Oriental sob Alteração Antrópica de Hábitat**, 2005.
- CAMPBELL Jr, K. E.; FRAILEY, C. D.; ROMERO-PITTMAN, L.. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. **Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.** V. 239, n. 166– 219, 2006.
- CARVALHO, A. S.; MARTINS, F. D.; DUTRA, F. M.; GETTINGER, D.; MARTINS-HATANO, F.; BERGALLO, H. G. List Large and Medium-Sized Mammals of Carajás National. **Journal of species lists and distribution**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2014.
- CASSON, A. Oil Palm, Soybeans & Critical Habitat Loss. **WWF The Forest Initiative**, [s. l.], n. August, p. 1–21, 2003.
- CATCHEN, J.; HOHENLOHE, P.; BASSHAM, S.; AMORES, A.; CRESKO, W. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124-3140.

- CATCHEN, J.; AMORES, A.; HOHENLOHE, P.; CRESKO, W.; POSTLETHWAIT, J. 2011. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes. Genomes. Genetics*. 1, 171-182.
- CAVALLI-SFORZA, L. L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A.. Demic Expansions and Human Evolution. **Science**, v. 259, n. 5095, pp. 639-646, 1993.
- CHIARELLO, A. G. Role of loud calls in brown howlers, *Alouatta fusca*. **American Journal of Primatology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 213–222, 1995.
- CONCEIÇÃO, A. L.; SEIXAS, S. R. da C. Hidrelétricas, qualidade de vida e desenvolvimento. [s. l.], v. 19, n. 19, p. 207–223, 2013.
- CORANDER, J.; TANG, J.. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Math. Biosci**, v. 205, p. 19–31, 2007.
- CORANDER J.; MARTTINEN, P.; SIREN, J.; TANG, J.. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 539, 2008.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. **Genetics**, v. 144, N. 4, 1996.
- CORTÉS-ORTIZ, L.; MONDRAGÓN, E.; CABOTAGE, J. Isolation and characterization of microsatellite loci for the study of mexican howler monkeys, their natural hybrids, and other neotropical primates. **Conservation Genetics Resources**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 21–26, 2010.
- CORTÉS-ORTIZ, L.; RYLANDS, A.; MITTERMEIER R. The taxonomy of howler monkeys: integrating old and new knowledge from morphological and genetic studies. In **Howler Monkeys** (Kowalewski MM, Garber PA, Cortés-Ortiz L, Urbani B, Youlatoss D, eds.). Springer: New York, pp 55–84, 2015.
- COUTINHO, L. A. VARIAÇÃO SAZONAL E LONGITUDINAL NA ECOLOGIA DO GUARIBA-DE-MÃOS-RUIVAS, *Alouatta belzebul* (PRIMATES, ATELIDAE), NA FAZENDA PACATUBA, PARAÍBA L. [s. l.], p. 86, 2012.  
Disponível em: <[http://bdtd.ufs.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=810](http://bdtd.ufs.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=810)>
- COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. **Conservation Biology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 369–376, 2002.
- CROCKETT, C. M.; EISENBERG, J. F. Howlers: variations in group size and demography BT - Primate Societies. **Primate Societies**, [s. l.], n. 6, p. 54–68, 1987. Disponível em: <<papers2://publication/uuid/ADC6E76E-EF60-4D5E-9A50-CED57751C7EC>>.
- DE CAMARGO, C. C.; PORFÍRIO, S.; RYLANDS, A. B.; LANGGUTH, A. Variação Sazonal E Longitudinal Nos Padrões De Comportamento Em Uma População De *Alouatta Belzebul* (Primates: Atelidae) Do Nordeste Brasileiro. **a Primatologia No Brasil - 9**, [s. l.], v. 9, p. 192–201, 2008.
- ELLSWORTH, J. A.; HOELZER, G. A. Isolation and characterization of microsatellite loci in a New World primate, the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 665–666, 1998.
- ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S.; MITCHELL, S. E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6(5), e19379.

- ESCOBAR-PÁRAMO, P. Microsatellite primers for the wild brown capuchin monkey *Cebus apella*. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 107–108, 2000.
- ESTRADA, A. et al. Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2017.
- ESTRADA, A.; MENDOZA, A.; CASTELLANOS, L.; PACHECO, R.; VAN BELLE, S.; GARCÍA, Y.; MUÑOZ, D. Population of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) in a fragmented landscape in Palenque, Chiapas, Mexico. **American Journal of Primatology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 45–55, 2002.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 783 – 791, 1985.
- FIALHO, M. de S.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M.; SILVA, T. C. F. Da; FERREIRA, J. G.; LAROQUE, P. de O. Ocorrência de *Sapajus flavius* e *Alouatta belzebul* no Centro de Endemismo Pernambuco. **Neotropical Primates**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 214–218, 2014.
- FIGUEIREDO, J.; HOORN, C.; VAN DER VEN, P.; SOARES, E. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: evidence from the Foz do Amazonas Basin. **Geology**, v. 37, pp.619–622, 2009.
- FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. Introduction to conservation genetics. Cambridge, UK.: Cambridge University Press, 2002.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **C.R. Biologies**, [s. l.], v. 326, p. S22–S29, 2003.
- FRANKHAM, R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 325–333, 2008.
- FREEMAN, S. Análise Evolutiva. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- FRICHOT, E. *et al.* Fast and efficient estimation of individual ancestry coefficients. **Genetics**, [s.l.], v. 196, [s.n.], p. 973-983, 2014.
- FRICHOT, E.; FRANÇOIS, O. LEA: an R Package for Landscape and Ecological Association Studies. **Methods in Ecology and Evolutions**, [s.l.], v. 6, n. 8, apr. 2015.
- FRICHOT, E. *et al.* Testing for Association between Loci and Environmental Gradients using Latent Factor Mixed Models. **Mol. Biol. Evol.**, [s.l.], v. 30, n. 7, p. 1687-1699, mar. 2013.
- GHILARDI, R.; ALHO, C. J. R. Produtividade sazonal da floresta e atividade de forrageamento animal em habitat de terra firme da Amazônia. [s. l.], v. 0, p. 61–76, 1990.
- GONÇALVES, E. C.; SILVA, A.; BARBOSA, M. S. R.; SCHNEIDER, M. P. C. Isolation and characterization of microsatellite loci in Amazonian red-handed howlers *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini). **Molecular Ecology Notes**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 406–408, 2004.
- GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. E.; LEONARD, J. A. et al.. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*, 7, 47–56, 1998.
- GOUDET, J.; PERRIN, N; WASER, P. Tests for Sex-biased dispersal using biparentally inherited genetic markers. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 11, [s.n.], p. 1103-1114, 2002.
- GRANT, W. Shallow Population Histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, [s.l.], v. 89, n. 5, p. 415 – 426, 1998.

- GREEN, M.R.; SAMBROOK, J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 47-54.
- GREGORIN, R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 64–144, 2006.
- GROVES, C. *Primate Taxonomy*. **Washington Smithsonian Institution Press**, v. 3, 350 pp., 2001.
- GUIMARÃES, V. Y.; MELO, F. R. De; TAKAHIRA, R. K. Avaliação clínico-morfométrica em guaribas-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul* Linnaeus, 1766) na região da Volta Grande do rio Xingu, Amazônia Oriental, Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, [s. l.], n. 80, p. 20–32, 2019.
- HERNANDEZ-CAMACHO, J.; COOPER, R. W.. The nonhuman primates of Colombia. In Thorington, R. W., and Heltne, P. G. (eds.), **Neotropical Primates: Field Studies and Conservation**, National Academy of Sciences, Washington, DC, pp. 35-69, 1976.
- HERSHKOVITZ, P. PRIMATES. COMPARATIVE ANATOMY AND TAXONOMY, V. Cebidae, part B. A monography by W. C. Osman Hill. **Comparative and General Pharmacology**, Columbus, v. 21, n. 3, p. 391–398, 1964.
- HILL, C.W.O. **Primates: comparative anatomy and taxonomy. V. Cebidae, part. B.** Edinburgh, Edinburgh University Press, v. 2, 537 pp. 1962.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; TER STEEGE, H.; BERMUDEZ, M. A.; MORA, A.; SEVINK, J.; SANMARTÍN, I.; SANCHEZ-MESEGUER, A.; FIGUEIREDO, J.P.; JARAMILLO, C.; RIFF, D.; NEGRI, F.R.; HOOGMIESTR, H.; LUNDBERG, J.; STADLER, T.; SÄRKINEN, T.; Antonelli, A.. Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. **Science**, v. 33, n. 6006, pp. 927–931, 2010.
- HORWICH, R. H.; GEBHARD, K. Roaring rhythms in black howler monkeys (*Alouatta pigra*) of Belize. **Primates**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 290–296, 1983.
- HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **J. Educ. Psychol.**, v. 24, pp. 417–441; 498–520, 1933.
- Ibama autoriza instalação da Usina de Belo Monte. Agência Nacional de Águas (ANA). Disponível em: <https://www.ana.gov.br/noticias-antigas/ibama-autoriza-a-instalaassapso-da-usina-de-belo.2019-03-15.5474098422#:~:text=O%20Ibama%20concedeu%20%C3%A0%20Norte,capacidade%20instalada%20de%2011.233%20MW,Acesso em: 11 set. 2020>.
- IBAMA (INSTITUTO BRASILEIRO DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). Plano de Manejo do Parque Nacional do Araguaia, **Ministério do Meio Ambiente**, 2001.
- ICMBIO. Sumário Executivo Do Plano De Ação Nacional Para a Conservação Dos Primatas Do Nordeste. [s. l.], p. 8, 2011. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-primatas-caatinga/sumario-primatas-nordeste-web.pdf>
- Janiak, M. C., Silva, F. E., Beck, R. M. D., de Vries, D., Kuderna, L. F. K., Torosin, N.S., Melin, A. D., Marquès-Bonet, T., Goodhead, I. B., Messias, M., da Silva, M. N. F., Sampaio, I., Farias, I. P., Rossi, R., de Melo, F. R., Valsecchi, J., Hrbek, T., & Boubli, J. P. Two hundred and five newly assembled mitogenomes provide mixed evidence for rivers as drivers of speciation for Amazonian

- primates. *Molecular Ecology*, 31, pp.3888–3902, 2022.
- JARDIM, M. M. A.; OLIVEIRA, L. F. B. 1997. Uso do espaço de *Alouatta belzebul* (Primates, Cebidae) em função da temporalidade de recursos. In: LISBOA, P. L. B. (Org.). Caxiuanã. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi. p. 417-436.
- JAVAROTTI, N. B. **Estrutura genética e relações de parentesco no mico leão preto (*Leontopithecus chrysopygus*) inferidas por marcadores de microssatélites**, 2018.
- JOMBART, T. *adeigenet*: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics Applications Note**, v. 24, n. 11, p 1403-1405, 2008.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. [s. l.], p. 991–995, 2006.
- KEARSE *et al.* Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, [s.l.], v 28, n. 12, p. 1647 – 1649, 2012.
- KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 230–241, 2002.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal Molecular Evolution**, [s.l.], v. 16, [s.n.], p. 111 -120, 1980.
- KNAUS, B. J.; GRÜNWALD, N. J. *VCFR*: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. **Molecular Ecology Resources**, [s.l.], v. 17, n.1, p. 44-53, 2016.
- KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 86, n. 16, p. 6196–6200, 1989.
- KOWALEWSKI, M. M.; CORTÉS-ORTIZ, L.; URBANI, B. Howler monkeys: Behavior, ecology, and conservation. **Howler Monkeys: Behavior, Ecology, and Conservation**, [s. l.], p. 1–440, 2015.
- KOWALEWSKI, M. M.; ZUNINO, G. E. Impact of deforestation on a population of *Alouatta caraya* in Northern Argentina. **Folia Primatologica**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 163–166, 1999.
- KRÜGER, A. Belo Monte ativa última turbina da hidrelétrica em cerimônia com a presença de Bolsonaro. **G1**, Brasília, 27 mai 2010. Disponível em: <https://g1.globo.com/politica/noticia/2019/11/27/belo-monte-ativa-ultima-turbina-da-hidreletrica-em-cerimonia-com-a-presenca-de-bolsonaro.ghtml>. Acesso em: 11 set. 2020.
- KUO, C. H.; JANZEN, F. J. BOTTLESIM: A bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations. **Molecular Ecology Notes**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 669–673, 2003.
- LATRUBESSE, E. M.; COZZUOL, M.; DA SILVA-CAMINHA, S. A. F.; RIGSBY, C. A.; ABSY, M. L.; JARAMILLO, C.. The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. **Earth-Science Reviews**, v. 99n. 3-4, pp. 99–124, 2010.
- LEIGH, J.W.; BRYANT, D.. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 6, no. 9, pp. 1110-1116, 2015.

- LIBRADO P.; ROZAS J.. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, pp. 1451-1452, 2009.
- LOPES, U.C. Caracterização genético-populacional de *Prochilodus nigricans* (Prochilodontidae) na sub-bacia do rio Tapajós (Tese de Doutorado), São Carlos, 2018.
- Massas d'Água. Agência Nacional de Águas (ANA). Disponível em: <https://metadados.ana.gov.br/geonetwork/srv/pt/main.home?uuid=7d054e5a-8cc9-403c-9f1a-085fd933610c>. Acesso em: 17 ago. 2020.
- MEADOWS, J.R. *et al.* Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified from Sheep Breeds of Near East. **Genetics**, [s.l.], v. 175, [s.n.], p. 1371 – 1379, mar. 2007.
- MEIRELES, C. M.; CZELUSNIAK, J.; FERRARI, S. F.; SCHNEIDER, M. P. C.; GOODMAN, M. Phylogenetic relationships among Brazilian howler monkeys, genus *Alouatta* (Platyrrhini, Atelidae), based on  $\gamma$ 1-globin pseudogene sequences. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 337–344, 1999.
- MELO, M. R.; MARTINS, A. R.; BARBOSA, I. V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. **Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular**, 2010.
- MÉNDEZ-CARVAJAL, P. G.; SANTAMARÍA, M.; MORENO, R. A. An Observation of Agonistic Behavior in Howler Monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. **Neotropical Primates**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 30, 2005.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).** Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2015. [s.d.].
- MIRANDA, J.M.D; PASSOS, F.C. Composição e dinâmica de grupos de *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) em Floresta Ombrófila Mista no Estado do Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v. 22, n. 1, 2005. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-81752005000100013](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752005000100013)>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- MMA. Portaria N° 444 Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção. [s. l.], p. 2082, 2014.
- MONTICELLI, C. **Diversidade genética de uma população isolada de bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) (CABRERA, 1940) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo - SP**, 2019.
- MORAES, H. T. De. **Estudo da diversidade genética em Cingulata através de marcadores mitocondriais e microssatélites: o caso de uma população de *Tolypeutes tricintus* (Linnaeus, 1758) do Cerrado.**, 2015.
- MORITZ, C.; BROWN, W. M. Tandem duplication in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 84, p. 7183-7187, ago. 1987.
- NASCIMENTO, F. F.; BONVICINO, C. R.; DA SILVA, F. C. D.; SCHNEIDER, M. P. C.; SEUÁNEZ, H. N. Cytochrome b polymorphisms and population structure of two species of *Alouatta* (Primates). **Cytogenetic and Genome Research**, [s. l.], v. 108, n. 1–3, p. 106–111, 2005.

- NASCIMENTO, F. F.; BONVICINO, C. R.; DE OLIVEIRA, M. M.; SCHNEIDER, M. P. C.; SEUÁNEZ, H. N. Population genetic studies of *Alouatta belzebul* from the Amazonian and Atlantic Forests. **American Journal of Primatology**, [s. l.], v. 70, n. 5, p. 423–431, 2008.
- NEVES, L.G; JERUSALINSKY, L.; MELO, F.R. Avaliação do risco de extinção de *Alouatta guariba guariba* (Humboldt, 1812) no Brasil. **ICMBIO**, 2021. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7182-mamiferos-alouatta-guariba-guariba-bugio-marrom>>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- NEIMAN, M.; TAYLOR D.R.. The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. **Proc Biol Sci.**, [s. l.], v. 276, n. 1660, pp. 1201-1209, 2009.
- NIEVERGELT, C. M.; MUNDY, N. I.; WOODRUFF, D. S. Microsatellite primers for genotyping common marmosets (*Callithrix jacchus*) and other callitrichids. **Molecular ecology**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1432–4, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787452>>.
- NOGUEIRA, A. C. R.; SILVEIRA, R.; GUIMARÃES, J. T. F. Neogene–Quaternary sedimentary and paleovegetation history of the eastern Solimões Basin, central Amazon region. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 46, pp. 89–99, 2013.
- OKLANDER, L. I.; MIÑO, C. I.; FERNÁNDEZ, G.; CAPUTO, M.; CORACH, D. Genetic structure in the southernmost populations of black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) and its conservation implications. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1–20, 2017.
- OKLANDER, L. I.; KOWALEWSKI, M. M.; CORACH, D. Genetic Consequences of Habitat Fragmentation in Black-and-Gold Howler (*Alouatta caraya*) Populations from Northern Argentina. **International Journal of Primatology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 813–832, 2010.
- OKLANDER, L. I.; ZUNINO, G. E.; DI FIORE, A.; CORACH, D. Isolation, characterization and evaluation of 11 autosomal STRs suitable for population studies in black and gold howler monkeys *Alouatta caraya*. **Molecular Ecology Notes**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 117–120, 2007.
- PATTERSON, N.; PRICWE, A.L.; REICH, D. Population Structure in Eigenanalysis. **PLOS Genetics**, [s.l.], v. 2, n. 12, dez. 2006.
- PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **Phil. Mag.**, v. 2, pp. 559–572, 1901.
- PETIT, R.J.; MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. **Conservation Biology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 844-855, ago. 1998.
- PERES, C. A.; PALACIOS, E. Basin-Wide Effects of Game Harvest on Vertebrate Population Densities in Amazonian Forests: Implications for Animal-Mediated Seed Dispersal. **Biotropica**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 304–315, 2007.
- POVILL, C.; OLIVEIRA, M.A.P.; MELO, F.R.; BONVICINO, C.R.. Phylogenetic relationships, population demography, and species delimitation of the *Alouatta belzebul* species complex (Atelidae: Alouattinae). **Primates**, v. 63, pp. 65-78, 2022.
- REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. **Conservation Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 230–237, 2003.

- R Development Core Team 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RIBAS, C.C.; ALEIXO, A.; NOGUEIRA, A. C. R.; MIYAKI, C. Y.; CRACRAFT, J.. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proc. R. Soc B.**, vol. 279, n. 1729, pp. 681–689, 2012.
- RIDLEY, M. *Evolução*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ROSA, A. J. M. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico / Artur Jordão de Magalhães Rosa, Samuel Rezende Paiva. – Planaltina, DF : **Embrapa Cerrados**, 2009.
- RYLANDS, A.B.; BERNARDES, A.T. Two Priority Regions for primate Conservation in the Brazilian Amazon. **Primate Conservation**, [s. l.], v. 10, p. 56-62, 1989.
- RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ, E. A species list for the New World Primates (Platyrrhini): distribution by the country, endemism, and conservation status according to the Mace-Land System. **Neotropical Primates**, Washington, v.3 (suppl.), pp. 113 – 160, 1995.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA, J. S. Neotropical primates: Taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 11–24, 2012.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, [s.l.], v. 4, [s.n.], p. 406 – 425, 1987.
- SANTOS, F. A. **Análise populacional genética de *Larus dominicanus* através do uso de microssatélites**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Evolutiva), São Paulo, 2011.
- SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, M. I. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; AYRES, J. M.; BARROSO, C. M. L.; HAMEL, A. R.; SILVA, B. T. F.; SALZANO, F. M. Coat color and biochemical variation in Amazonian wild populations of *Alouatta belzebul*. **American Journal of Physical Anthropology**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 85–93, 1991.
- SILVA, J. M. Da. **Ecologia, Conservação e Comportamento de Guariba-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul belzebul*) no município de água preta, Pernambuco, Brasil**, 2015.
- SOARES-FILHO, B. S.; NEPSTAD, D. C.; CURRAN, L. M.; CERQUEIRA, G. C.; GARCIA, R. A.; RAMOS, C. A.; VOLL, E.; MCDONALD, A.; LEFEBVRE, P.; SCHLESINGER, P. Modelling conservation in the Amazon basin. **Nature**, [s. l.], v. 440, n. 7083, p. 520–523, 2006.
- SOARES, R. R. **Caracterização genética de espécimes de *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) utilizados em um programa de reintrodução da espécie em área de ocorrência histórica, no estado de São Paulo**, 2017.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 pp., 2017.

- SOUZA, S. P. Ecologia e conservação de *Alouatta belzebul belzebul* na Paraíba, Brasil. [s. l.], 2005.
- SOUZA, L.M.; KAGEYAMA, P. T.; SEBBENN, A. M. Consequências genéticas do efeito de gargalo em populações de *Chorisia speciosa* St. Hil. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, v. 15, n.1, p. 9 – 17, jun. 2003.
- TAMURA *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, [s.l.], v. 30, n. 12, p. 2725 – 2729, 2013.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G; GIBSON, T.J.. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, pp. 4673-4680, 1994.
- VAL, A.; FEARNSTIDE, P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Environmental disturbances and fishes in the Amazon. *Journal of Fish Biology*, [s.l.], v. 89, n. 1, p. 192 - 193, 2016.
- Valença-Montenegro, M.M., Fialho, M.S., Carvalho, A.S., Ravetta, A.L., Régis, T., de Melo, F.R., Jerusalinsky, L., Veiga, L.M., Mittermeier, R.A., Cortes-Ortiz, L. & Talebi, M. 2021. *Alouatta belzebul* (amended version of 2019 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021: e.T39957A190412426.
- VELTRONI, Y. **Estrutura genética matrilinear e relações de parentesco no mico leão preto, *Leontopithecus chrysopygus* (Primates) uma espécie ameaçada que apresenta sistema de reprodução cooperativa**, 2018.
- VIANA, M. C.; BONVICINO, C. R.; FERREIRA, J. G.; JERUSALINSKY, L.; LANGGUTH, A.; SEUÁNEZ, H. Understanding the relationship between *Alouatta ululata* and *Alouatta belzebul* (Primates: Atelidae) based on cytogenetics and molecular phylogeny. **Oecologia Australis**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 173–182, 2015.
- Xu S, Schaack S, Seyfert A, Choi E, Lynch M, Cristescu ME. High mutation rates in the mitochondrial genomes of *Daphnia pulex*. **Mol Biol Evol**, [s.l.], v. 29, n. 2, pp. 763-769, 2012.