Caracterização de três *loci* de DNA microssatélite em bugio-ruivo (*Alouatta fusca*): uma ferramenta para estudos populacionais, filogeografia e conservação

Yanina Micaela Sammarco Dalessandro

Orientador: Dr. Thales Renato O. de Freitas
Co-Orientadora: Dra. Margarete Suñé Mattevi
Supervisor: M.Sc. Carlos André da V. L. Rosa
Colaboradores: Biól. Leandro Jerusalinsky
M.Sc. Adriana Gava

Relatório submetido ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Ênfase Ambiental.

Porto Alegre, RS
2000

BIO
BIO
100

Caracterização de 3 loci de DNA microssatélite em bugio-ruivo (*Alouatta fusca*): uma ferramenta para estudos populacionais, filogeografia e conservação.

Palavras-chave: *Alouatta fusca*, bugio-ruivo, primata, microssatélite, DNA, estudos populacionais, filogeografia, conservação.

Resumo: O bugio-ruivo (*Alouatta fusca*) é um primata neotropical que habita a Mata Atlântica. Atualmente, está ameaçado de extinção devido ao crescimento urbano e aos desmatamentos nas áreas de remanescentes florestais, causando o isolamento das subpopulações. Em função disso, urgem pesquisas que possibilitem a avaliação da estrutura genética desta espécie. Microssatélites são seqüências de DNA moderadamente repetitivo, presentes na eucromatina do genoma de vertebrados, insetos e plantas. Seu grande polimorfismo de comprimento, acessado por PCR e de relativamente fácil interpretação, tem permitido o emprego recente dos microssatélites com diversas finalidades. Este trabalho tem como objetivo caracterizar *loci* de microssatélites que possibilitem estudos populacionais em *Alouatta fusca*.

Introdução

Os primatas neotropicais ocorrem desde o sul do México até o sul do Brasil e norte da Argentina. São encontrados em todas as principais áreas florestadas da América do Sul (com exceção do Chile e do Uruguai) e da América Central, incluindo algumas ilhas do Caribe (Mittermeier, 1986a).

O bugio-ruivo (*Alouatta fusca* - Humboldt, 1812 - Figura 1) é um primata neotropical, pertencente ao gênero *Alouatta* (Lacépède, 1799) - Cebidae, Alouattinae - da infra-ordem Platyrrhini. Este gênero apresenta a mais ampla distribuição dentre os primatas do Novo Mundo (Hill, 1962; Napier & Napier, 1967; Neville *et al.*, 1988), devido, principalmente, ao seu hábito alimentar, constituído basicamente de folhas, recurso alimentar que está presente em larga escala em quase todos os ambiente. Pela sua grande capacidade adaptativa (Crockett & Eisenberg, 1987), ocupam de florestas úmidas perenifolias a florestas decíduas sazonais (Wolfheim, 1983)

A distribuição desta espécie abrange desde a bacia do rio Camaquã (31°S), limite meridional do gênero (em atualização, Printes *et all*, 2000), até o o sul da Bahia, acompanhando os biomas associados à Mata Atlântica (floresta ombrófila densa - Figura 2).

A subespécie estudada, *Alouatta fusca clamitans* (Cabrera, 1940), caracteriza-se por apresentar dimorfismo sexual quando adultos, sendo os machos ruivos (castanho-avermelhados) e as fêmeas marrom-escuras. Os machos chegam a pesar 7Kg, enquanto as fêmeas não passam de 5Kg. Possuem comportamento social com bandos de 3 a 10 indivíduos (Figura 3).

Popularmente conhecidos como bugios, guaribas ou barbados, também são chamados de roncadores devido ao poderoso ronco, emitido na maioria das vezes pelos machos adultos quando necessitam demàrcar posição no bando, definir território ou emitir alarme em caso de perigo. Sua popularidade também está

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCIÊNCIAS

FIGURA 1: Fêmea de bugio-ruivo com filhote



FIGURA 3: Bando de bugios-ruivos do Morro da Extrema



Fotografias de Adriano Nygaard Becker

FIGURA 2: Distribuição aproximada de *Alouatta fusca* e posição do Rio Grande do Sul na América do Sul



Fonte da imagem de satélite: Atlas Ambiental de Porto Alegre

presente na cultura gaúcha, como, por exemplo, em ritmos musicais, danças e trovas.

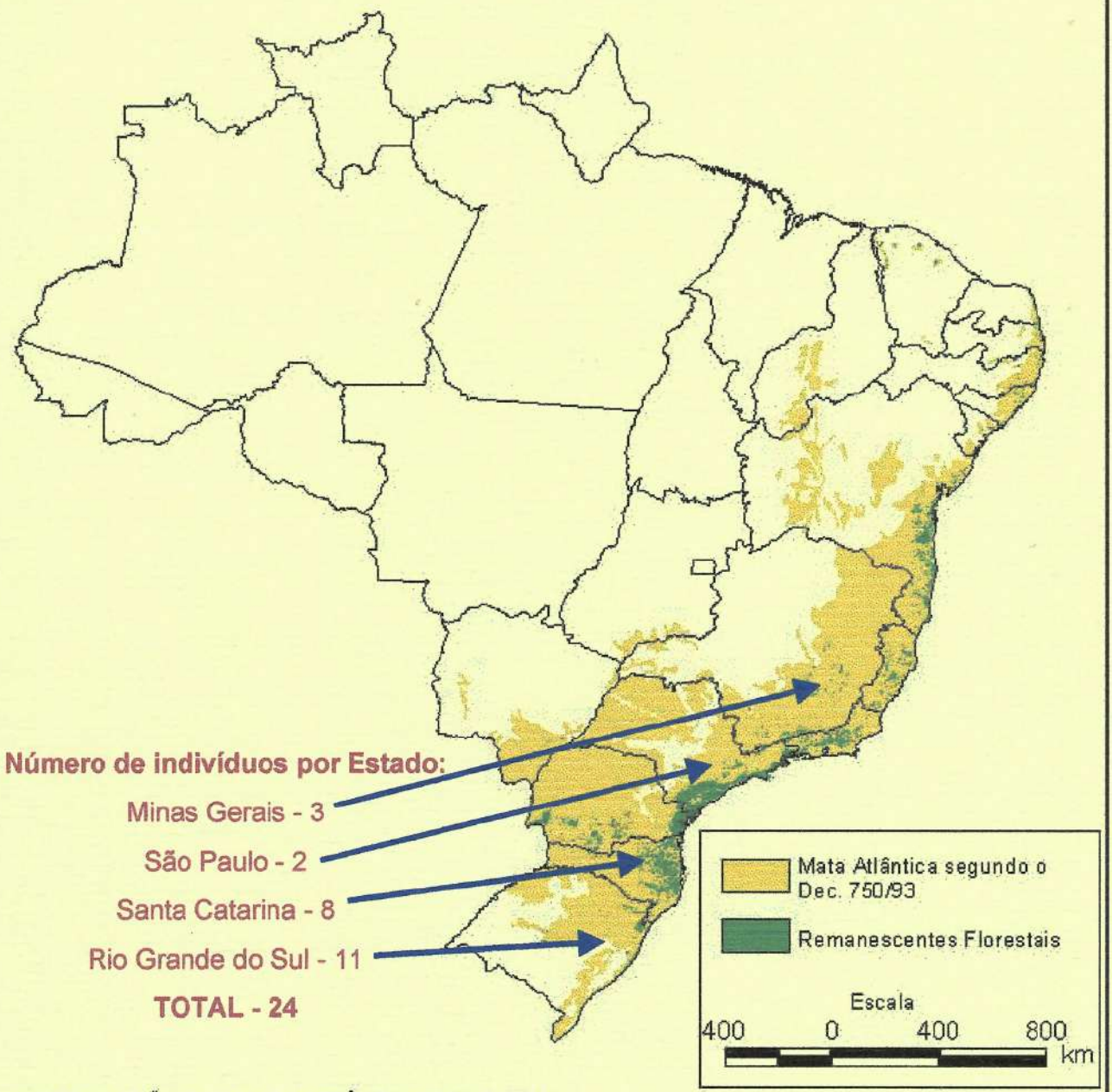
O bugio-ruivo está sob perigo de extinção (Fonseca *et al.*, 1994) devido à caça (para alimentação, diversão ou "defesa" de pomares e lavouras), à predação por fauna introduzida associada aos humanos (p. ex.: cachorros), e à brutal destruição da Mata Atlântica (Mittermeier, 1986b - Figura 4). A partir disso, um grupo de pesquisadores (Projeto Macacos Urbanos) iniciou em 1993 o levantamento da "Ocorrência e distribuição do bugio-ruivo (*Alouatta fusca clamitans*) (Cebidae, Primates) em Porto Alegre, RS".

Após a primeira etapa, observou-se que a população porto-alegrense de bugios encontra-se, atualmente, dividida em pequenas subpopulações (Printes et al., 1996), a maioria localizada nas partes mais altas dos morros (Dornelles et al., 1996) e nos talvegues, na zona sul do município (Figura 5). Um dos problemas destas subpopulações é o efeito de isolamento, causado pelo crescimento da urbanização nestas regiões, onde se concentram grande parte dos remanescentes florestais e na qual estão registradas as maiores densidades de bugios em Porto Alegre.

Sabe-se que populações pequenas enfrentam riscos demográficos (como cruzamentos escassos), riscos genéticos (como depressão por endocruzamentos; Wright, 1977; Falconer, 1981) ou doenças e mudanças climáticas, que podem gerar a extinção local. As conseqüências demográficas e genéticas da redução e fragmentação das populações são sinérgicas. O desaparecimento de populações locais pode rapidamente levar à extinção global, se as populações estiverem a distâncias que impossibilitem a recolonização dos hábitats vagos (Lacy, 1992).

Numa população em processo de diminuição e isolamento, os fatores demográficos geralmente causam um declínio no tamanho efetivo da população. Tal fato possibilita a perda de variabilidade genética devido ao aumento nas taxas de endocruzamento e aos efeitos da deriva, baixando, assim, o valor

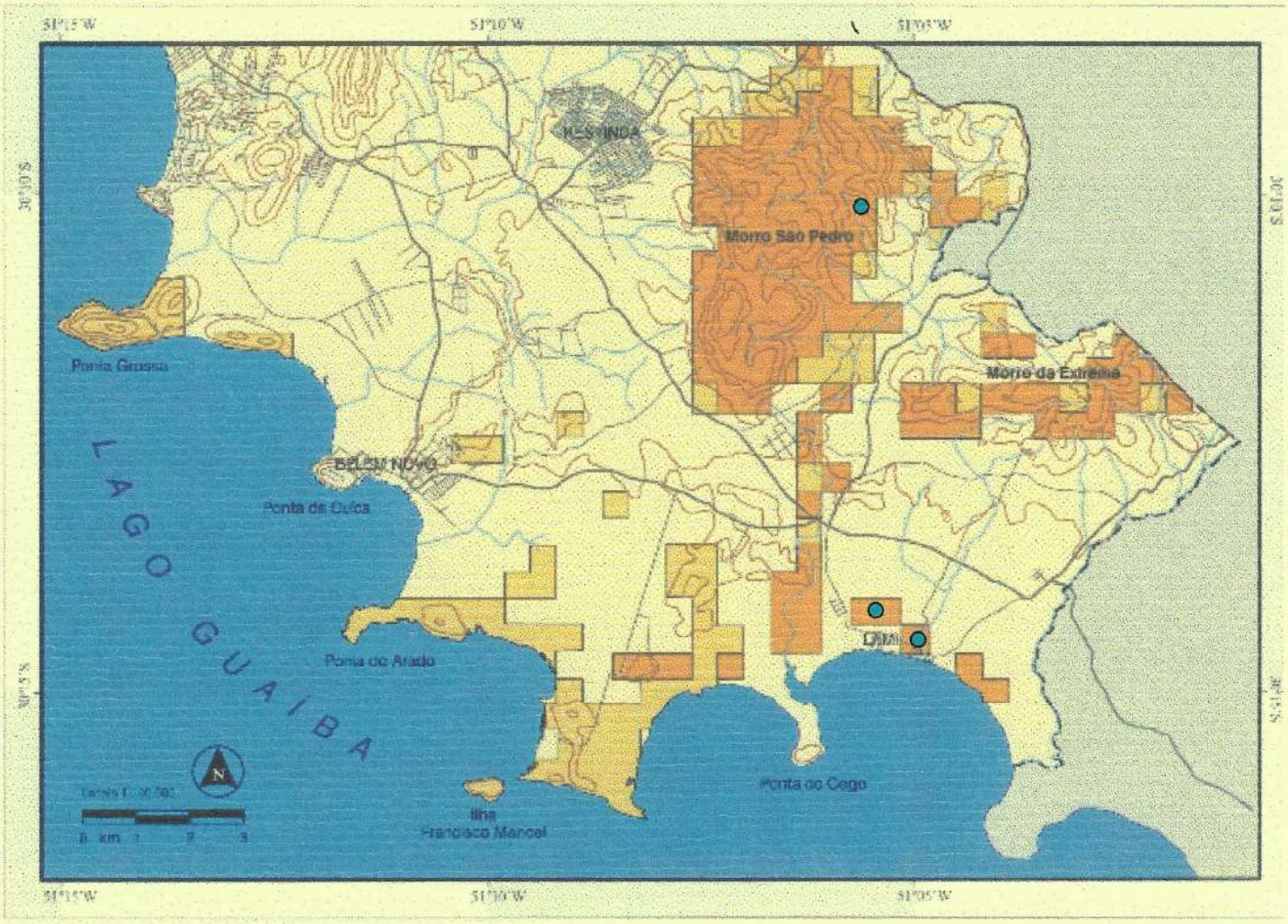
FIGURA 4: Distribuição das Amostras por Estado e Remanescentes Florestais da Mata Atlântica



Fonte: FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA / INPE / ISA.
"Atlas da Evolução dos Remanescentes Florestais e Ecossistemas Associados no Domínio da Mata Atlântica", 1998.

C.I./FUND. BIODIVERSITAS/SOC. NORDESTINA DE ECOLOGIA
Dados organizados para o Workshop "Prioridades para conservação da biodiversidade da Mata Atlântica no Nordeste", 1993.

FIGURA 5: Distribuição das amostras de Porto Alegre e ocorrência do bugio-ruivo na zona sul da cidade (Etapa I do Projeto Macacos Urbanos)



Fonte: Atlas Ambiental de Porto Alegre

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCIÊNCIAS

adaptativo da população. Isso gera novo declínio populacional, agravando os problemas demográficos, que voltam a agir piorando os problemas genéticos. Esse processo foi definido como vórtice de extinção (Gilpin & Soulé, 1986).

Em função disso, sentiu-se a necessidade de estudar os possíveis efeitos da fragmentação e redução dos habitats sobre a estrutura populacional e "saúde genética" desta espécie, com especial enfoque na região de Porto Alegre.

Microssatélites

Os marcadores moleculares vêm sendo largamente usados na determinação de variabilidade e estrutura genética de populações, em estudos de cunho conservacionista, evolutivo, ou taxonômico (Cronin & Sarich, 1975; Schneider *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 1997; Muir *et al.*, 1998).

Microssatélites são seqüências de DNA moderadamente repetitivo, presentes na eucromatina do genoma de vertebrados, insetos e plantas, sendo que o seu tamanho médio fica na ordem de 100pb, e são compostos por pequenas sub-unidades, 1-6pb (Rosa, 1997). Seu grande polimorfismo de comprimento (arranjado em torno da média - Charlesworth *et al.*, 1994), acessado por PCR e de relativamente fácil interpretação, tem permitido o emprego dos microssatélites como uma excelente ferramenta para a caracterização das populações, assim como das espécies. Podem, portanto, ser utilizados em investigações filogeográficas inter e intra-específicas, visando identificar a relação de linhagens e estoques genéticos diferenciados com sua respectiva distribuição geográfica.

Sua principal desvantagem técnica é a necessidade da construção de "primers" (sondas) espécie-específicos. Recentemente, no entanto, uma série de

investigações têm demostrado o uso heterólogo, não só entre táxons relacionados, mas também, entre categorias taxonômicas superiores (Rosa, 1997).

Em populações naturais foram usados para investigar, por exemplo: grau de isolamento em espécies norte-americanas de lobos (Roy *et al.*, 1994); variabilidade genética na foca cinza (Allen, 1995); polimorfismo em populações isoladas de baleias (Buchanan *et al.*, 1996); marcadores específicos de taxon em focas (Gemmell *et al.*, 1997); distância genética (Calvas *et al.*, 1994) e estudos de genética de populações (Morins *et al.*, 1997) em espécies de primatas; e deriva genética e grau de mistura entre populações humanas (Crouau-Roy *et al.*, 1996). Por gerar dados de estrutura populacional com ótima resolução têm se mostrado uma importante ferramenta para estudos de conservação.

A relevância destes dados é demostrada por Moritz *et al.* (1995), que, em ampla discussão sobre o papel das UC's (Unidade de Conservação), propõem estratégias de conservação com base na criação de áreas de preservação, que se apóiem na estrutura genética molecular das espécies ameaçadas.

Objetivo

Este trabalho tem por objetivo caracterizar e aperfeiçoar técnicas de avaliação da diversidade genética em *Alouatta fusca*, que possibitem estudos populacionais, através de três loci de DNA microssatélites.

Materiais e Métodos

- Coleta

Foi coletado tecido muscular de indivíduos mortos independentemente do local (obtidos através de contatos com moradores ou outros pesquisadores), bem como tecido sangüíneo de animais em cativeiro, durante procedimentos de rotina dos Parques Zoológicos. Foram coletadas, no total, amostras de 24 indivíduos (ver Tabela 1, Figuras 4, 5 e 6).

TABELA 1: Distribuição das amostras por região

Localidades	Indivíduos
Rio Grande do Sul	11
Santa Catarina	8
São Paulo	2
Minas Gerais	3
TOTAL	24

- Extração de DNA

Duas formas de extração de DNA foram testadas conforme descrição a seguir:

<u>Extração de DNA genômico pelo o método de precipitação de proteínas com NaCl (adaptado de Lahiri e Nurnberger, 1991)</u>

Com todo o material esterilizado, foi cortado 20mg de tecido ou aliquotado 300µl de sangue. Após lavagens com STE, foi adicionado 550µl de tampão de lise (50mM Tris-HCL; 10mM EDTA; SDS 1%; 200mM NaCl; β-mercaptoetanol 1%), 27,5µl de SDS 20% , 2,5µl de β-mercapto 2% , 11µl de proteinase K , e incubou-

FIGURA 6: Distribuição das Amostras da Região Metropolitana de Porto Alegre



Morro das Quirinas: 1

Itapuã: 3

BR290: 2

Arroio dos Ratos (1)
Butiá (1)

Lami: 2

Águas Claras: 2

Indeterminado: 1

TOTAL: 11

Fonte da imagem de satélite: Atlas Ambiental de Porto Alegre

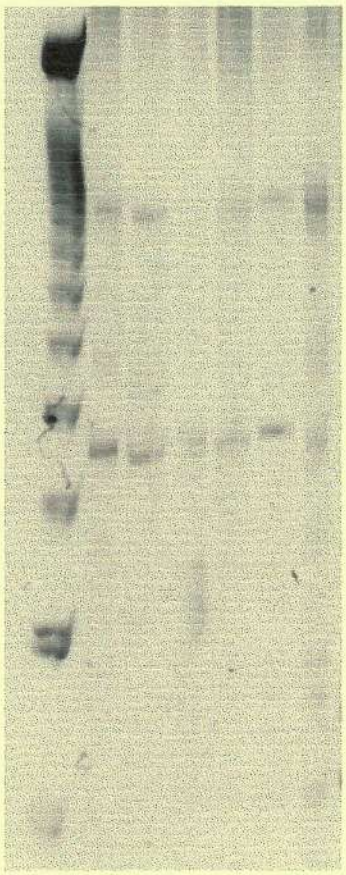


FIGURA 7: Produtos de amplificação do "primer" Ap6

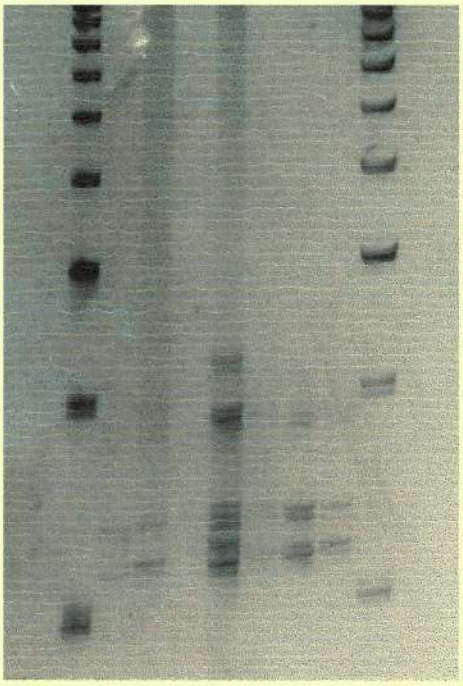


FIGURA 8: Produtos de amplificação do "primer" Ap74

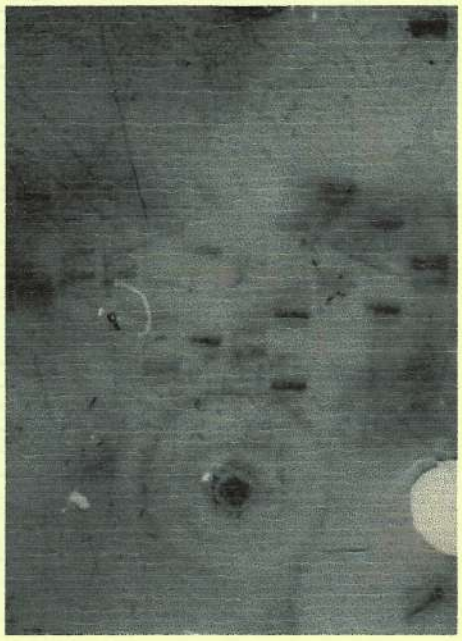


FIGURA 9: Produtos de amplificação do "primer" Ap68

se "overnigth" a 37°C. No dia seguinte, acrescentou-se 5,5µl de RNAse A (10mg/ml), e uma hora depois foi colocado 600µl de NaCl 4M. Agitou-se os os tubos no vórtex por 15 segundos, e centrifugou-se por 30 minutos a 13.000rpm. Transferiu-se o sobrenadante para outros 3 tubos, com 400µl cada um. O DNA foi precipitado com 2 volumes (800µl) de etanol absoluto gelado. Depois de agitado manualmente, foi deixado em banho-maria "overnight" a 4°C. No terceiro dia, foi centrifugado por 30 minutos a 13.000rpm. Após, foi lavado 2 vezes com álcool 70% e secado em estufa por 30 minutos a 37°C. Para finalizar, foi ressuspendido em banho-maria a 37°C com 50µl de TE por uma hora, colocado em geladeira e deixado por 2 dias, no mínimo, para entrar em suspensão.

Extração de DNA com sílica (adaptado de Taberlet & Fumagalli, 1996)

Com todo o material esterilizado, foi cortado 20mg de tecido ou aliquotado 100µl de sangue. Após, foi adicionado 1ml do tampão L6 e agitado no vórtex por 3 segundos. Incubou-se os tubos a 60°C por uma hora com agitação constante. No dia seguinte, acrescentou-se 50µl de suspensão de sílica, com posterior agitação e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após uma centrifugação de 1 minuto a 13.000 rpm, foi descartado o sobrenadante e foi lavado o *pellet* de sílica com o tampão L2 por 2 vezes, centrifugando-se novamente por 4 minutos. O *pellet* foi lavado 1 vez com álcool 100% e centrifugado novamente por 4 minutos. Após, o *pellet* foi secado em estufa por 10 minutos a 56°C e resuspendeu-se o DNA em 50µl de TE. Incubou-se por 5 minutos a 60°C (banho-maria) e centrifugou-se por 2 minutos a 13.000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Repetiu-se 1 vez os passos desde a resuspenssão com TE. Foi decctectado se havia resíduos de sílica; em caso afirmativo, repetiu-se os últimos passos. Estocou-se o DNA a 4°C por dias ou semanas até o uso.

- Amplificação do DNA por PCR

Foram usados três pares de primers para *loci* de Microssatélites desenvolvidos para o gênero *Alouatta* (*A. palliata*) por Ellsworth & Hoelzer (1998 - Tabela 2).

TABELA 2: Caracterização dos *loci*

Locus	Seqüência do *primer*	Motivo de repetição	T°C anelamento
Ap6	5' AGT GTT TTA TGG TTT GAG AT 3'	$(TG)_{11}$	47
	5' GTT TAG CAA TAA TGT TGA TG 3'		
Ap68	5' TGT TGG TAT AAT CTT TCC TA 3'	$(TG)_{17}$	50
	5' ACA TAC ACC TTT GAG TTT CT 3'		
Ap74	5' TGC ACC TCA TCT CTT TCT CTG 3'	$(TG)_{19}$	52
	5' CAT CTT TGT TTT CCT CAT AGC 3'		

Para tal foram feitas reações de PCR com volume total de 25µl contendo:

- 1µl DNA-PEP
- 4pmol de cada *primer*
- 4nm de cada dNTP
- 0.625u TAq polimerase
- 60mM de Tris-HCl
- 15mM de $(NH_4)SO_4$
- 1.5mM de $MgCl_2$
- ddH_2O para completar o volume

As reações foram processadas em termociclador em duas condições:

1 °- a - 95°C por 5'

b - 95°C por 1'

c - T°C de anelamento por 1'

d - 72°C por 1'

e - volta ao passo a por 29x

f - 4°C ∞

2 °- a - 95°C por 5'

b - 95°C por 1'

c - T°C de anelamento mais 4°C por 1'

d - 72°C por 1'

e - volta ao passo b por 10 x

f - 95°C por 1'

g - T°C de anelamento mais 2°C por 1'

h - volta ao passo f por 10 x

i - 95°C por 1'

j - T°C de anelamento 1'

l - volta ao passo i por 10 x

m - 4°C ∞

- Análise eletroforética

- Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x para verificação da amplificação.

- Os produtos amplificados foram corridos em gel de poliacrilamida a 7% (corados com nitrato de prata) para a visualização dos fragmentos (Figuras 7, 8 e 9).

BIBLIOTECA

Resultados Preliminares e Discussão

Em relação aos dois métodos de extração, observou-se melhores resultados de extração com o método de precipitção de proteínas com NaCl, obtendo-se DNA de 90% das amostras. Já a extração com sílica não obteve bons resultados, obtendo-se DNA de menos de 50% das amostras. Observou-se também que estas últimas não obtinham bons resultados de amplificação. Uma possível explicação para isso é que resíduos de sílica podem inibir a amplificação.

Em relação às duas condições de amplificação utilizadas, podemos observar que a primeira condição amplificou cerca de 50% das amostras; já a segunda condição, amplificou cerca de 90% das amostras. No entanto, não foram detectadas diferenças entre as duas condições com o "primer" Ap6.

Os "primers" Ap6 (Figura 7) e Ap74 (Figura 8) obtiveram bons produtos de amplificação, na maioria dos indivíduos (Tabela 3). Foram obtidos dados preliminares sobre a identificação do número de alelos para estes primers (Tabela 4) em *A. fusca*. Sobre este resultados podemos inferir que:

- Os *loci* acessados pelos "primers" Ap6 e Ap74 são polimórficos em *A. fusca*.
- Os *loci* acessados pelos "primers" Ap6 e Ap74 em *A. fusca* possuem menos alelos do que os *loci* acessados por estes primers em *A. palliata* e mais alelos do que em *A. pigra* e *A.seniculus*.
- O *locus* acessado pelo "primer" Ap6 *A. fusca* possui fragmentos maiores que os encontrados nas espécies *A. palliata, A. pigra* e *A.seniculus*.
- O *locus* acessado pelo "primer" Ap74 em *A. fusca* possui fragmentos menores que os encontrado nas espécies *A. palliata, A. pigra* e *A.seniculus*.

- O *locus* acessado pelo primer Ap68 apresentou um bandeamento padrão distinto entre os indivíduos analisados de *A. fusca* (Figura 9). Isso demonstra que deve haver um polimorfismo acentuado neste *locus*. Entretanto, para determinação dos alelos será necessário um maior refinamento da técnica.

TABELA 3: Amostras com origem e respectivos fragmentos (bp) encontrados

Nº	Nome	Origem Geográfica	Ap6	Ap74
1	Morgana	Itapuã - RS	282	111
2	Arroio dos Ratos	A. dos Ratos -RS-BR290	278	109-111
3	Quirinas	Quirinas - RS	286	111-113
5	Congelado	Itapuã - RS	X	109-113
8	Joana sem braço	Lami - RS	X	109
9	Águas Claras	Águas Claras - RS	X	109-111
11	Urubu	Itapuã - RS	X	109-113
13	FZ	Indeterminado - RS	282	109-111
15	Varejão	Lami - RS	282	X
16	Pedreira	Campinas - SP	X	103-109
17	Pavarotti	Indeterminado - MG	X	109-111
18	Magalhães	Campo das Dores - MG	X	106-109
19	Fusquinha	Indeterminado - MG	278-282	X
20	Butiá	Butiá - RS - BR290	X	109-111

X = não identificado

TABELA 4: Produtos (bp) gerados pelos "primers" nas diferentes espécies

Locus	Ap6	Ap74	Referência
A. fusca	3	4	Presente estudo
	278-286	106-113	
A. palliata	4	5	Ellsworth & Hoelzer (1998)
	176-184	146-156	
A. pigra	2	2	Ellsworth & Hoelzer (1998)
	180-182	154-156	
A. seniculus	2	3	Ellsworth & Hoelzer (1998)
	173-175	145-160	

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que foi possível amplificar os 3 *loci* de microssatelites em *Alouatta fusca* com "primers" heterólogos de *A. palliata, A. pigra* e *A.seniculus.* Esta técnica permite que estudos sobre estrutura populacional, variabilidade genética e aspectos filogeográficos desta espécie sejam realizados. Estes dados são extremamente relevantes para espécies ameaçadas, pois associados a outros (ecológicos, etológicos, etnobiológicos...) permitem traçar estratégias de manejo e conservação.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPQ, pelo fornecimento de bolsa de Iniciação Científica PIBIC durante a execução do trabalho. A todos os colegas do Projeto Macacos Urbanos por me receber e apoiar durante minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço à minha família, ao meu companheiro Leandro, aos amigos, aos irmãos, aos orientadores, supervisor e colaboradores pelo carinho, paciência e confiança depositados. Enfim, agradeço à vida e seus encantos, e a todos que de alguma forma me inspiram a viver.

Referências Bibliográficas

ALLEN, P.J.; AMOS, W.; POMEROY, P.P. & TWISS, S.D. 1995. Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. **Mol. Ecol.** 4: 653-662.

BUCHANAN, F.C.; FRIESEN, M.K.; LITTLEJOHN, R.P. AND CLAYTON, J.W. - Microsatellites from belunga whale Delphinapterus leucas. **Mol. Ecol.**, 5: 571-575. 1996.

CALVAS, P.; BLANCHER, A.; SALVIGNOL, I.; SOCHA, W.W. & RUFFIÉ, J. 1994. Leght polimorphism of microsatellite in human and non human primates. **Life Sciences** 317: 755-763.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P. & STEPHAN, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** 371: 215-220.

CROCKETT, C.M. & EISENBERG, J.F.1987. Howlers: variationin group size and demography. In: Smuts, B.B. et al. (eds.). **Primate Societies**: 54-68.

CRONIN, J.E. & SARICH, V.S. 1975. Molecular systematics of the New World monkeys. **J. Hum. Evol.** 4: 357-375.

CROUAU-ROY, B.; BOUZEKRI, N.; CARCASSI, C.; CLAYTON, J.; COUTU, L. & CAMBON-THOMSEN, A. 1996. Strong association between microsatellites and an HLA-B, DR haplotype (B18-DR3): implication for microsatellite evolution. **Immunogenetics** 43: 255-260

DORNELLES, S. da S.; BUSS, G.; BRUTTO, L.F.G.; JARDIM, M.M. de A.; PRINTES, R.C.; ROMANOWSKI, H.P. & OLIVEIRA, L.F.B. 1996. Ocorrência e distribuição do bugio-ruivo (*Alouatta fusca clamitans*) (Cebidae, Primates) em Porto Alegre, RS. **XXI Congresso Brasileiro de Zoologia, Resumos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

ELLSWORTH, J.A. & HOELZER, G.A. 1998. Characterization of microsatellite loci in a New World primate, the mantled howler monkey (*Alouatta palliata*). **Mol. Ecol.** 7: 657-658.

FALCONER, D.S. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman, Nova York, EUA.

FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; COSTA, C.M.R. & LEITE, Y.L.R. 1994. Livro vermelho dos Mamíferos Ameaçados de Extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil. 459 p.

GEMMELL, N.J.; ALLEN, P.J.; GOODMAN, S. J. AND REED, J. Z. - Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. Mol. Ecol., 6: 661-666. 1997.

GILPIN, M.E. & SOULÉ, M.E. 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: Soulé, M.E. (ed.). Conservation biology: the science of scarcity and diversity: 19-34. Sinauer Press, Massachusets, EUA.

HILL, W.C.O. 1962. Primates: comparative antomy and taxonomy. Cebidae, Part B. Vol. V. Edinburgh University Press, Edinburgh.

LACY, R.C. 1992. The effects of inbreeding on isolated populations: are minimum viable population sizes predictable? In: Fiedler, P.L. & Jain, S.K. (eds.). Conservation Biology - The theory and practice of nature conservation: 277-296. Ed. Chapman & Hall Inc., Londres, Inglaterra.

LAHIRI,D.K., NURNBERGER,J.I, 1991. A rapid non-enzimatic method for preparatio of HMW dna from blood for RFLP STUDIES. Nucleid Acids Res, :19:5444

MITTERMEIER, R.A. 1986a. Primate conservation priorities in the neotropical region. In: Benirschke, K. (ed.). Primates: the road to self sustaining populations: 1024-1037. Nova York, EUA.

MITTERMEIER, R.A. 1986b. Strategies for the conservation of highly endangered primates. In: Benirschke, K. (ed.). Primates: the road to self sustaining populations: 1014-1022. Nova York, EUA.

MORIN, P.A.; KANTHASWAMY, S. AND SMITH, D. - Polymorphisms for colony management and population genetics in rhesus macaque (Macaca mulatta). Am. J. of Primatology, 42: 199-213. 1997.

MORITZ, C., LAVERY, S., SLADE, R. Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. **American Fisheries Society Symposium**, v.17, p.249-262, 1995.

MUIR, C.C.; GALDIKAS, B.M.F. & BECKENBACH, A.T. 1998. Is there sufficient evidence to elevate the orangutan of Borneo and Sumatra to separate species? **J. Mol. Evol. 46**: 378-381.

NAPIER, J.R. & NAPIER, P.H. 1967. **A handbook of living Primates**. New York Academic Press, Nova York, EUA.

NEVILLE, M.K.; GLANDER, K.E.; BRAZA, F. & RYLANDS, A.B. 1988. The howling monkeys, genus Alouatta. In: Mittermeier, R.A. et al. (eds.). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Vol. 2. World Wildlife Fund, Washington, EUA.

PRINTES, R.C.; FIALHO, M.S.; BUSS, G.; BRUTTO, L.F.G.; DORNELLES, S. da S.; JARDIM, M.M. de A. & ROMANOWSKI, H.P. 1996. Os bugios do morro da Extrema: situação atual e sugestões para a conservação de uma metapopulação de primatas em Porto Alegre.(RS). **VIII Salão de Iniciação Científica, Resumos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PRINTES, R.C.; LIESENFELD, M.V.A & JERUSALINSKY, L. 2000. Atualização do limite sul de Alouatta fusca (Humboldt 1812) e Novo Limite Austral dos Primatas Neotropicais.**(em preparo)**.

REED, J.Z.; TOLLIT, D.J.; THOMPSON, P.M. & AMOS, W. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetics analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. **Mol. Ecol. 6**: 225-234.

ROMANOWSKI, H.P.; DORNELLES, S.S.; BUSS, G.; BRUTTO, L.F.G.; JARDIM, M.M.A.; PRINTES, R.C. & FIALHO, M.S. 1998. Bugio-ruivo - *Alouatta fusca*. In: Menegat, R.; Porto, M.L.; Carraro, C.C. & Fernandes, L.A.D. (eds.). **Atlas Ambiental de Porto Alegre**: 63-64. Editora da Universidade, Porto Alegre, Brasil.

ROSA, C.A .V.L. 1997. Marcadores de DNA Microssatélite em Oryzomyinos (Cricetidae, Rodoentia) da região do cerrado brasileiro. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS

ROY, M.S.; GEFFEN, E.; SMITH, D.; OSTRANDER, E.A. & WAYNE, R.K. 1994. Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. **Mol. Biol. Evol.** 11: 553-570.

SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M.P.C.; SAMPAIO, I.; HARADA, M.L.; STAHOPE, M.; CZEUSNIAK, J. & GOODMAN, M. 1993. Molecular phylogeny of New World monkeys (Platyrrhini, Primates). **Mol. Phys. Evol.** 2: 225-242.

TABERLET, P. & FUMAGALLI, L. 1996. Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. **Mol. Ecol.** 5: 301-305.

WRIGHT, S. 1977. **Evolution and the genetics of populations.** Vol. 3. Experimental results and evolutionary deductions. University of Chicago Press, Chicago, EUA.