

ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE SAGÜIS
(*CALLITHRIX SPP.*) INTRODUZIDOS NA ÁREA DE PROTEÇÃO
AMBIENTAL DA BACIA DO RIO SÃO JOÃO/MICO-LEÃO-DOURADO, NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

CLAUDIA CAIXETA FRANCO ANDRADE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Campos dos Goytacazes - RJ

Dezembro - 2006

ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE SAGÜIS
(*CALLITHRIX SPP.*) INTRODUZIDOS NA ÁREA DE PROTEÇÃO
AMBIENTAL DA BACIA DO RIO SÃO JOÃO/MICO-LEÃO-DOURADO, NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

CLAUDIA CAIXETA FRANCO ANDRADE

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do título de mestre em
Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Leandro Rabello Monteiro

Co-orientadora: Adriana Daudt Grativol

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Campos dos Goytacazes - RJ

Dezembro - 2006

ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE SAGÜIS
(*CALLITHRIX SPP.*) INTRODUZIDOS NA ÁREA DE PROTEÇÃO
AMBIENTAL DA BACIA DO RIO SÃO JOÃO/MICO-LEÃO-DOURADO, NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

CLAUDIA CAIXETA FRANCO ANDRADE

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do título de mestre em
Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada no dia 20 de Dezembro de 2006

Banca examinadora:

Prof. Leandro Rabello Monteiro (Orientador)
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Dra. Adriana Daudt Grativol (Co-orientadora)
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Prof. Carlos Ramon Ruiz-Miranda
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Prof. Marcelo Trindade Nascimento
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Profa. Cristina Yumi Miyaki
Universidade de São Paulo - USP

Agradecimentos

À Deus, pelo seu amor incondicional, pela sua fidelidade, por estar sempre ao meu lado me dando condições para vencer em todos os momentos. “O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele confiou o meu coração e fui socorrido: pelo que o meu coração salta de prazer, e com o meu canto o louvarei”. Sl. 28:7

Ao Laboratório Ciências Ambientais, ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, ao Núcleo de Sequenciamento da UENF e ao Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves - IB/USP, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Leandro Rabello Monteiro, e minha co-orientadora, Dra. Adriana Daudt Grativol, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela confiança, paciência e pelos conhecimentos divididos.

À Profa. Ângela P. Vitória, pela revisão deste trabalho, e aos Profs. Cristina Y. Miyaki, Carlos Ramon Ruiz-Miranda e Marcelo Trindade por fazerem parte da banca.

À UENF e Associação Mico Leão Dourado (AMLD) pelo apoio logístico. Ao pessoal da AMLD pelas amostras de pêlo coletadas, em especial ao Márcio M. M. Júnior, Ana Paula, Andresa, pelos mapas, fotos, tabelas e informações.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, UENF/FAPERJ (bolsa de mestrado, no período de 2004-2006), LTBF (à Claudia Caixeta F. Andrade, no período de 2005-2006), FNMA (à Associação Mico Leão Dourado, convênio 004/2004). Também à Associação Mico Leão Dourado, pelo apoio logístico.

À profa. Cristina Y. Miyaki, juntamente com seus alunos, por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves-Instituto de Biologia/USP, em especial, Cibele Biondo, Adriana Marques, Fernando Nodari, Rodrigo e Gustavo, por todo auxílio e informações que foram muito importantes para a conclusão deste trabalho. E principalmente pelo carinho, atenção e amizade a mim dedicada.

Ao Márcio Marcelo de Moraes Júnior, em especial, pelas amostras de pêlo coletadas, pelas conversas sobre este trabalho e pelas informações trocadas.

À Albany pela amizade, alegria e ajuda no laboratório.

Aos meus colegas do mestrado por todo apoio e alegria dos momentos que passei com vocês.

Aos meus pais, Dalcio Ricardo de Andrade e Mary Cornélia Franco Andrade, e à minha irmã, Raquel Caixeta Franco Andrade, por nunca terem poupado esforços para me ajudar em todas as situações, pelas palavras de ânimo nos momentos de fraqueza, por me ensinarem a lutar nos momentos difíceis e por terem se alegrado comigo a cada pequena ou grande conquista. À minha família pelo apoio e também pelos momentos de descontração e alegria.

SUMÁRIO

Índice de Tabelas.....	VII
Índice de Figuras.....	VII
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	11
3. Metodologia.....	12
3.1 Área de estudo.....	12
3.2 Coleta das amostras.....	12
3.3 Extração de DNA.....	13
3.4 DNA microssatélites.....	13
3.5 Análise dos dados.....	15
4. Resultados.....	17
5. Discussão.....	23
6. Implicações Ecológicas.....	28
7. Conclusões.....	30
8. Referências bibliográficas.....	31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Temperatura de anelamento e concentração de Magnésio otimizadas para cada “primer”	15
Tabela 2:	Número de alelos encontrados para cada “primer” e a variação em pares de bases para esses alelos.....	17
Tabela 3:	Número de alelos encontrados para cada “primer” e o número de alelos restritos em cada população.....	18
Tabela 4:	Frequência dos alelos nulos inferidos pelo Microchecker.....	18
Tabela 5:	Valores de Fst gerado para cada dupla de populações.....	19
Tabela 6:	Valor dos logaritmos das probabilidades <i>a posteriori</i> ($\log P(X K)$) e alpha médio para cada K.....	20
Tabela 7:	Proporção de classificação de indivíduos provenientes de diferentes populações, mostrando a composição de cada grupo inferido pelo programa Structure. População RV (Rio Vermelho), Imb (Imbaú), Vd (Vendaval), Ig (igarapé).....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Exemplares de (a) <i>Callithrix jachus</i> , (b) <i>Callithrix penicillata</i> e (c) <i>Callithrix ssp</i>	06
Figura 2:	Localização dos cinco grupos de sagüis amostrados na região estudada.....	07
Figura 3:	Representação esquemática da disposição dos indivíduos em relação a cada grupo. Pontos azuis (indvs de Rio vermelho), vermelho (indvs de Vendaval), verde (indvs de Imabú), amarelo (indvs de Igarapé).....	21
Figura 4:	Representação da probabilidade de um indivíduo pertencer a cada agrupamento. Número (1) -Rio Vermelho; (2) -Imbaú; (3) -Vendaval; (4)-Igarapé. Proporção vermelha da barra (probabilidade de pertencer ao ‘cluster’1), proporção verde da barra (probabilidade de pertencer ao ‘cluster’2), proporção azul da barra (probabilidade de pertencer ao ‘cluster’3).....	22

RESUMO

Sagüis (*Callithrix spp.*), nativos do Nordeste e Cerrado brasileiro, foram introduzidos na área de proteção ambiental da Bacia do Rio São João/Mico leão dourado, no estado do Rio de Janeiro. A presença dos sagüis pode prejudicar o sucesso do esforço que tem sido feito para a conservação do mico leão dourado. O principal objetivo deste trabalho foi inferir a estrutura genética das populações de sagüis introduzidos na região. Foram utilizados oito “primers” polimórficos de microssatélites. Informações sobre a estrutura genética das populações foram geradas a partir de uma matriz de distância genética (valores de F_{st}) e de uma análise de agrupamentos baseada em modelos (model-based clustering). Os resultados mostraram que não existe uma estrutura genética muito evidente na região como um todo. Foi observado que a rodovia BR-101 provavelmente funciona como uma barreira geográfica para os sagüis. O cenário que melhor representa a estrutura das populações estudadas é o de quatro populações genéticas (Rio Vermelho e Vendaval como uma única população, Imbaú, Vale do Cedro e Igarapé como populações distintas). Também foi possível observar que a população de Vale do Cedro, onde encontram-se animais introduzidos que apresentam características de híbridos com *Callithrix aurita*, foi a mais divergente entre todas as populações estudadas. A implantação de um corredor florestal na região estudada é uma situação polêmica, pois pode facilitar a dispersão dos sagüis e trazer maiores complicações para conservação do mico leão dourado, além de dificultar a elaboração do plano de manejo para os sagüis.

ABSTRACT

Common marmosets (*Callithrix spp*) native from northeastern and Cerrado of Brazil, were introduced in protection area of river São João/Mico leão dourado basin in Rio de Janeiro state. The introduced common marmosets can be harmful for the success of this conservation program. The main purpose of this study was to assess the genetic structure of introduced common marmoset populations. Eight polymorphic microsatellites primers were used. Information about population genetic structure was generated by genetic distance matrix (values of F_{st}) and by analyzing model-based clustering. The results showed that there is no evident genetic structure among all the studied populations. The road BR-101 probably represents a geographic barrier for common marmosets. The most likely scenario for the genetic structure of marmoset populations is four genetics populations (Rio Vermelho and Vendaal as one population, Imbaú, Vale do Cedro and Igarapé as distinct populations). The results also showed that the Vale do Cedro population, where introduced animals with characteristic of hybrids with *Callithrix aurita* are found, was the most divergent of all populations studied. The implementation of a forest corridor in the studied region is controversial, because it can facilitate dispersion of common marmosets and hamper the conservation program for the golden lion tamarin, complicating the elaboration of a management plan to control the common marmoset.

1- INTRODUÇÃO

1.1-Espécies alótonas

Espécies alótonas ou não-nativas são aquelas que não existiam anteriormente na região da introdução. Se a espécie introduzida se estabelecer, ela passa a ser considerada uma espécie invasora ou não nativa (Sakai *et al.*, 2001). Segundo Allendorf & Lundquist (2003) a invasão de uma espécie é dividida em quatro fases. A primeira é a introdução das espécies, que podem ser tanto animais como vegetais. As principais introduções podem ser atribuídas a interesses humanos como a agricultura visando a alimentação, a medicina através de plantas de importância medicinal, a ornamentação, o controle da erosão, as plantações de árvores para extração de madeira, e o comércio ilegal e legal de animais (Sakai *et al.*, 2001). Introduções acidentais também podem ocorrer, como as introduções de espécies através da água de lastro dos navios. Ruiz *et al.* (2000) verificaram que ecossistemas costeiros são freqüentemente invadidos por microorganismos existentes na água de lastro dos navios. A próxima fase seria a colonização do novo habitat pela espécie introduzida. Para colonizar um habitat, é preciso que os indivíduos introduzidos formem uma população, ou seja, que encontrem condições para sobreviver e se reproduzir (Sakai *et al.*, 2001). O sucesso da colonização leva ao estabelecimento da espécie no novo habitat. Depois de estabelecida, a espécie passa por uma fase de crescimento exponencial na qual a população se reproduz, aumentando, consideravelmente, o número de indivíduos. Com o aumento da população, os indivíduos irão se dispersar pela região onde ocorreu a introdução e colonizar novos habitats, sendo esta a última fase de uma invasão. As maiores ocorrências de espécies introduzidas que se tornaram não nativas são encontradas em regiões degradadas pelo homem (Primack e Rodrigues, 2002; Willianson, 1996).

Pressão de propágulo é o número de indivíduos de uma espécie não nativa que são introduzidos numa dada região (Allendorf & Lundquist, 2003). A população que se originou de poucos indivíduos introduzidos pode apresentar o

efeito do fundador – baixa variabilidade genética (Allendorf & Lundquist, 2003). Se os indivíduos que chegam a cada introdução forem diferentes geneticamente, a pressão de propágulo irá contribuir para um aumento na variabilidade genética da espécie introduzida. Se ocorrerem múltiplas introduções ou fluxo gênico entre regiões com diferentes composições genéticas da espécie não nativa, a variabilidade genética da população não nativa tende a aumentar. Se os indivíduos apresentarem sempre a mesma composição genética, a pressão de propágulo não vai alterar a variabilidade genética da espécie introduzida.

O principal impacto ambiental que uma espécie não nativa pode causar é levar uma espécie nativa à extinção. Uma das causas da extinção é a competição que pode existir entre as espécies (Allendorf & Lundquist, 2003; Sakai *et al.*, 2001; Willianson, 1996). A capacidade de competição é uma característica importante para os invasores. Eles precisam competir com as espécies nativas por recursos indispensáveis para a sua sobrevivência. Segundo Allendorf & Lundquist (2003), as espécies não nativas são mais competitivas em relação às espécies nativas, porque para conseguir se estabelecer num novo habitat estas precisam ter uma alta capacidade de sobrevivência e uma alta taxa de reprodução. A introdução de espécies não nativas pode ser considerada a segunda causa de extinção de espécies nativas (Wilcove *et al.*, 1998; Willianson, 1996).

Vários exemplos de invasões na América do Sul, mais precisamente no Chile e na Argentina, são dados por Jaksic *et al.* (2002). Eles apontam oito espécies de mamíferos introduzidos: a lebre europeia (*Lepus europaeus*), o coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*), o javali selvagem (*Sus scrofa*), o veado vermelho (*Cervus elaphus*), o castor americano (*Castor canadensis*), o rato almiscarado (*Ondrata zibethicus*), o vison americano (*Mustela vison*), e a raposa cinza (*Pseudalopex griseus*).

Exemplos de invasão no Brasil podem ser dados por Oliveira *et al.* (2006) e Vitule *et al.* (2006). De acordo com Oliveira *et al.* (2006), *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) é nativo da Ásia e foi introduzido na América do Sul em 1991. Esta espécie não nativa foi avistada pela primeira vez no Brasil em 1998 – 1999 no

lago chamado Baía do Tuiuiú, próximo a Corumbá, Mato Grosso do Sul. Eles afirmam que este bivalve chegou ao pantanal através de cursos d'água que ligam o Estado do Paraná ao Paraguai. Esta espécie pode acumular metais pesados e poluentes em suas conchas e carne. Este metal pesado pode ser transferido para várias espécies de peixes que possuem a *Limnoperna fortunei* na sua rede alimentar; o que pode causar sérios impactos sobre a fauna nativa. Também tem causado problemas econômicos, uma vez que tem infestado a estação de tratamento de água de Corumbá. Outra espécie introduzida no Brasil foi o peixe africano *Clarias gariepinus*, e sua introdução aconteceu na bacia do rio Guaraguaçu, no estado do Paraná (Vitule *et al.*, 2006). Durante a década de 90 esta espécie foi criada em fazendas com o intuito de ser utilizada em pesque-pague. O peixe africano acabou escapando das fazendas de pesque-pague, o que resultou na invasão de rios e lagos da região. Esta invasão pode trazer prejuízos para a fauna nativa, uma vez que o *Clarias gariepinus* é um potencial predador de topo de cadeia.

Invasões não ocorrem apenas entre países diferentes. Estas também podem ocorrer entre diferentes regiões de um mesmo país. No Brasil, um exemplo disto pode ser dado pelos sagüis pertencentes ao gênero *Callithrix*. *Callithrix jacchus* é nativo do nordeste brasileiro, ao norte do Rio São Francisco e ao leste do Rio Parnaíba, ao passo que *Callithrix penicillata* é nativo do cerrado brasileiro (Auricchio, 1995). Atualmente estas espécies têm sido introduzidas em várias matas do Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, através do tráfico ilegal de animais (Auricchio, 1995; Cerqueira *et al.* 1998; Ruiz-Miranda *et al.*, 2000; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006). Estes animais vivem muito bem em florestas secundárias ou que sofreram algum tipo de perturbação antrópica, como por exemplo, a fragmentação (Auricchio, 1995; Kinzey, 1997). Indivíduos dessas espécies geralmente não são encontrados em extensas áreas de floresta primária e apresentam uma alta taxa de sobrevivência em habitats fragmentados (Kinzey, 1997), o que facilita o sucesso da sua invasão.

1.2-*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*

Callithrix jacchus e *C. penicillata* (sagüi de tufo branco e sagüi de tufo preto, respectivamente) são espécies de primatas pertencentes à família Callitrichidae. Hershkovitz (1977), baseado na morfologia, dividiu o gênero *Callithrix* em dois grupos de espécies: o grupo “*jacchus*” (*C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. jacchus*, *C. geoffroyi*, *C. penicillata* e *C. kuhli*) que engloba as espécies do nordeste brasileiro, da Mata Atlântica mais ao sul do país e também espécies do interior do cerrado brasileiro; o grupo “*argentata*” (*C. argentata*, *C. melanura*, *C. humeralifer*, and *C. mauesi*) que ocupa a região amazônica do Brasil, da Bolívia e do Paraguai. Stevenson e Rylands (1988) estão de acordo com Hershkovitz (1977), quando consideram as espécies do grupo “*jacchus*” (*C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. jacchus*, *C. geoffroyi*, *C. penicillata* e *C. kuhli*) como espécies distintas. Análises filogenéticas da família Callitrichidae foram realizadas por Tagliaro *et al.* (1997). Os dados gerados através da análise de seqüências da região controle do DNA mitocondrial mostraram que existe suporte molecular para uma divisão entre as espécies da região amazônica (grupo “*argentata*”) e as espécies da Mata Atlântica (grupo “*jacchus*”). Rylands (1993) com base em características ecológicas e fenotípicas sub-dividiu o grupo “*jacchus*” em dois grupos: o grupo “*aurita*” (*C. aurita* e *C. flaviceps*) e o grupo “*jacchus*” (*C. jacchus*, *C. geoffroyi*, *C. penicillata* e *C. kuhli*). Contudo, Rylands *et al.* (2000) considera *C. aurita*, *C. geoffroyi*, *C. penicillata*, *C. jacchus* e *C. kuhli* como espécies plenas, mas *C. flaviceps* parece ser uma subespécie de *C. aurita*.

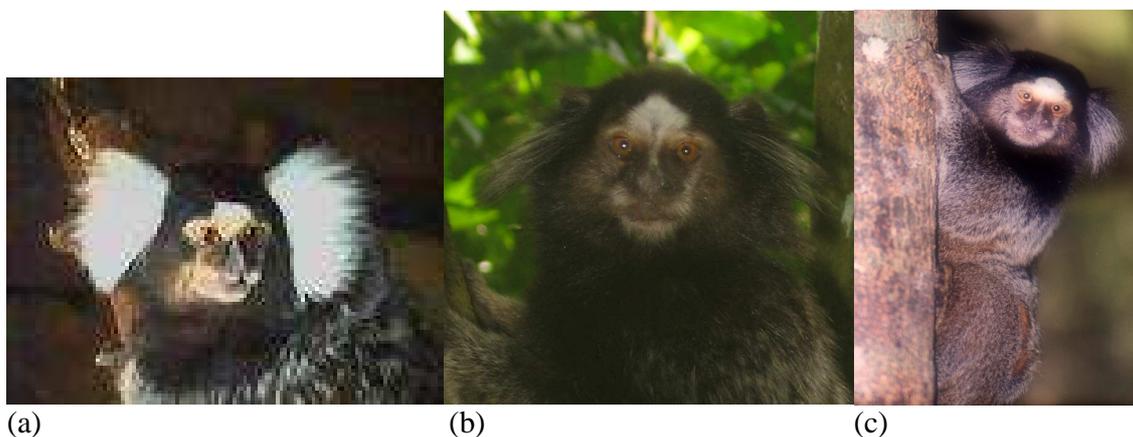
C. jacchus e *C. penicillata* são animais muito semelhantes fenotipicamente, mas facilmente diferenciados pelos tufos. Apresentam pequeno porte, pesando entre 300 e 450 gramas, possuem cauda comprida e garras ao invés de unhas. De acordo com Hershkovitz (1977) e Stevenson & Rylands (1988) a fêmea atinge a maturidade sexual por volta dos 18 meses, e a gestação dura em torno de 140 dias. A taxa reprodutiva dessas espécies é alta, sendo 2,2 a média de filhotes por ninhada, sendo que 90% dos partos são de gêmeos, o que ocorre pelo menos uma vez ao ano.

A alimentação de *C. jacchus* e *C. penicillata* é composta principalmente por exudatos de árvores, como as gomas, pequenos animais invertebrados, e com menor frequência por frutas e ovos (Kinzey, 1997; Hershkovitz, 1977; Stevenson & Rylands, 1988). Por não dependerem tanto das frutas para sua alimentação, essas espécies se adaptam bem em lugares com pouca disponibilidade de frutas e podem realizar diariamente um pequeno percurso (0.5 a 1.0 Km) na busca por recursos alimentares (Kinzey, 1997). Estas características podem influenciar nos padrões de dispersão destas espécies, e conseqüentemente, no fluxo gênico e na estrutura genética dos grupos. Dados gerados por Faulkes *et al.* (2003) corroboram a idéia de que o fluxo gênico pode ocorrer tanto para machos quanto para fêmeas. Eles ainda observaram que existe uma estrutura genética acentuada entre os grupos de uma mesma população e também entre as populações de *C. jacchus* que ele estudou (próximas de Natal, Rio Grande do Norte).

A organização social desses animais é baseada em grupos familiares normalmente de dois a oito indivíduos. Segundo Kinzey (1997), esses grupos geralmente são constituídos por apenas uma fêmea reprodutora (fêmea alfa) que pode se acasalar com mais de um macho, o que caracteriza a poliandria. Existem machos e fêmeas adultos no grupo que fazem parte da prole da fêmea reprodutora. O parentesco é um fator importante na formação e na dinâmica de cada grupo (Faulkes *et al.*, 2003). A presença da fêmea alfa no grupo pode inibir a reprodução nas outras fêmeas. Todos os indivíduos do grupo, cooperativamente, ajudam no cuidado com os filhotes, sendo este o principal papel das fêmeas não reprodutoras (Auricchio, 1995; Faulkes *et al.*, 2003). No entanto, estudos com DNA nuclear (microssatélites) em três grupos de *Callithrix jacchus* no Rio Grande do Norte mostraram a existência de duas fêmeas reprodutoras e um macho reprodutor por grupo (Nievergelt *et al.*, 2000). Existem indícios de que a formação de novos grupos pode ocorrer através da divisão de um grupo e de sua área de uso, ou também através de indivíduos que foram expulsos de seus grupos (Stevenson & Rylands, 1988).

Segundo Hershkovitz (1977) e Stevenson & Rylands (1988) *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* podem sobrepor seus habitats, por serem ecologicamente semelhantes. Isso ocorreu na região costeira, imediatamente ao norte de Salvador, Bahia (Stevenson & Rylands, 1988). Uma das conseqüências dessa sobreposição é o cruzamento entre indivíduos das duas espécies, o que leva ao surgimento natural de populações de híbridos. Hershkovitz (1977) listou a ocorrência de híbridos entre essas e outras espécies do mesmo gênero. Esta hibridação pode ocorrer tanto em animais de cativeiro quanto em animais selvagens. Para *C. jacchus* e *C. penicillata* foi relatada a ocorrência de cruzamento tanto de *C. jacchus* macho e *C. penicillata* fêmea quanto o contrário (Hershkovitz, 1977). Na área de estudo deste trabalho, região destinada à preservação do mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*), já foi observada a presença de *C. jacchus*, *C. penicillata* e possíveis híbridos entre essas duas espécies (Ruiz-Miranda *et al.*, 2006). Em nosso trabalho, os sagüis amostrados não foram separados geneticamente em *C. Jacchus*, *C. Penicillata* e híbridos. Sendo assim, todos os animais amostrados foram considerados como *Callithrix spp* (Fig.1).

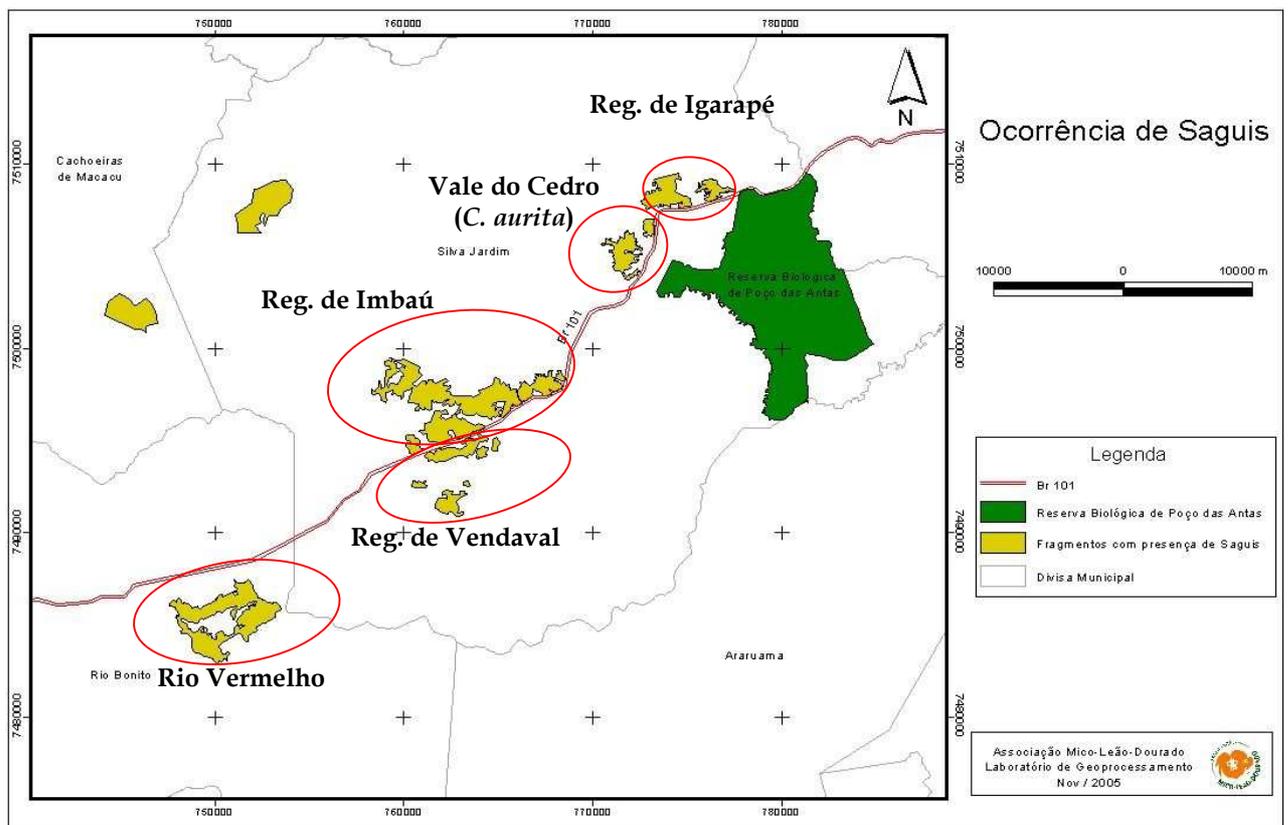
Fig.1: Exemplos de (a) *Callithrix jacchu*, (b) *Callithrix penicillata* e (c) *Callithrix spp*.



1.3-*Callithrix spp.* introduzidos na região do mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*)

Desde 1985, sagüis têm sido observados na região de ocorrência atual do mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*), que compreende fragmentos de mata nos municípios de Silva Jardim, Rio Bonito, Casimiro de Abreu, Rio das Ostras, Cabo Frio, Armação dos Búzios, Saquarema, e Araruama, interior do Estado do Rio de Janeiro (AMLD, 2003; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006), próximos à Reserva Biológica Poço das Antas. Originalmente os sagüis não eram encontrados nessa região (Hershkovitz, 1977; Auricchio, 1995). A BR-101 que passa na região, divide os fragmentos em dois grupos: um grupo que fica ao nordeste da BR-101 (Imbaú, Vale do Cedro e Igarapé), e o outro grupo que fica ao sudoeste (Rio Vermelho e Vendaval) (Fig.2).

Figura 2: Localização dos cinco grupos de sagüis amostrados na região estudada.



Os sagüis estão presentes em vários fragmentos de mata onde existem grupos de mico leão dourado (Fig.2). Os sagüis são muito semelhantes ao mico leão dourado no que diz respeito ao comportamento e à ecologia, podendo ser competidores em potencial. De acordo com Ruiz-Miranda *et al.* (2000), os sagüis foram avistados utilizando comedouros do projeto de conservação do mico leão dourado, e tanto comportamentos agressivos quanto afiliativos foram observados. Nesses comedouros são colocadas frutas para complementar a alimentação das populações de micos leões dourados reintroduzidos. Podemos ver então, que em alguns momentos, existe uma competição entre as espécies em questão. Ruiz-Miranda *et al.* (2006) estudaram os sagüis em dois fragmentos de mata da região e puderam observar que: (1) a densidade de sagüis nos dois fragmentos é maior que a densidade de micos leões dourados; (2) a população de sagüis é uma população saudável; (3) a interação entre sagüis e o mico leão dourado nos comedouros provoca uma mudança no comportamento da espécie nativa. Com essas observações eles concluíram que existe uma maior competição entre a espécie não nativa e a nativa durante o inverno, quando os recursos alimentares ficam mais escassos. A análise genética, realizada através da análise do fragmento de DNA mitocondrial, Andrade, 2004, mostrou que os sagüis de duas populações (Rio Vermelho e região de Imbaú) estão divididos em duas populações distintas, ou seja, os sagüis não estão se dispersando pela região estudada.

A interação negativa entre a espécie nativa e a introduzida reforça a necessidade da elaboração de planos de manejo para os sagüis, uma vez que estes ainda não estão se dispersando. Com a informação sobre o fluxo gênico, pode-se inferir em qual fase se encontra a introdução dos sagüis na região estudada. Segundo Allendorf & Lundquist (2003) os estudos genéticos são de grande importância para entender e identificar as fases da invasão de uma determinada espécie, e também para inferir se esta poderá trazer prejuízos para a região onde foi introduzida. Para cada fase de uma invasão, Sakai *et al.* (2001) propõe uma forma de lidar com a espécie não nativa. Métodos de prevenção com relação à

espécie não nativa só são indicados se a espécie ainda não se estabeleceu no novo habitat. Depois do estabelecimento da espécie não nativa e antes que ela se espalhe na região da introdução, *Sakai et al.* (2001) sugere que os animais sejam erradicados. O controle da espécie não nativa só é indicado se a espécie introduzida já se dispersou pela região.

1.4 -Marcadores moleculares e estrutura populacional

A inferência da estrutura genética de uma população pode ser realizada através de marcadores moleculares, como os microssatélites. Microssatélites são regiões do DNA genômico que possuem blocos de um a quatro nucleotídeos que se repetem várias vezes seguidas no genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Avise, 2004; Goldstein & Goldstein, 1999). Estas regiões altamente polimórficas são distribuídas pelo genoma dos eucariotos, sendo menos representativas nas regiões codificadoras e talvez nos telômeros (Goldstein & Goldstein, 1999). A taxa de mutação dos microssatélites varia entre as espécies, mas pode ser considerada entre 10^{-3} e 10^{-5} por *locus* em cada geração (Avise, 2004; Goldstein & Goldstein, 1999). De acordo com Kashi & King (2006) e Goldstein & Goldstein (1999), estas mutações podem ocorrer durante a replicação ou durante a recombinação entre os cromossomos homólogos (“crossing-over”) que não ficaram devidamente alinhados. As mutações podem excluir ou adicionar unidades de repetição dentro da região do microssatélite. Os microssatélites eram considerados ‘DNA lixo’, mas esse conceito tem sido questionado (Kashi & King, 2006; Goldstein & Goldstein, 1999). Trabalhos têm mostrado que o número das repetições nos microssatélites pode influenciar a regulação de genes, a transcrição e a função de proteínas, podendo estar assim, associados às variações fenotípicas (Kashi & King, 2006; Goldstein & Goldstein, 1999).

O uso de marcadores moleculares (entre eles microssatélites) em estudos de conservação é recente, mas tem se tornado uma metodologia frequentemente aplicada nesta área. Os microssatélites são mais apropriados para estudos que

envolvem hibridação, história populacional, filogeografia, estrutura social, fluxo gênico como medida de dispersão (estrutura genética populacional), e até mesmo na identificação da procedência de indivíduos (métodos de atribuição) para as mais diversas espécies (Goldstein & Goldstein, 1999; Avise, 2004; Pritchard *et al.*, 2000; Manel *et al.*, 2005). A estrutura genética populacional é estudada a partir de divergência genética entre as populações. Quando existe uma alta estruturação genética entre populações significa que estas estão isoladas, no que diz respeito ao fluxo gênico; e quando não existe estruturação genética entre populações significa que estas são panmíticas, ou seja, geneticamente se comportam como uma única população.

Vários trabalhos têm utilizado os marcadores moleculares com o intuito de conhecer a estrutura genética de uma população (Eizirik *et al.*, 2001; Grativol *et al.*, 2001; Chappell *et al.*, 2004; Triant *et al.*, 2004; Goossens *et al.*, 2005; Vallinoto *et al.*, 2006).

Chappell *et al.* (2004) analisaram a estrutura genética entre as populações de carcaju (*Gulo gulo*) do norte do Canadá. As análises do DNA microssatélite mostraram que não existia estrutura genética entre as populações desta espécie estudada. Eizirik *et al.* (2001) analisaram amostras de onças (*Panthera onca*) do México até o sul do Brasil. Para as análises de amostras entre a América Central e o norte da América do Sul, regiões estas separadas pelo rio Amazonas, a análise do DNA microssatélite mostrou que não existia uma estrutura genética entre os animais amostrados dessas regiões. Grativol *et al.* (2001) utilizaram quatro *loci* de microssatélites para analisar quatro populações de mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*) num cenário de fragmentação recente. Eles observaram que existe uma divergência genética alta, 31% de diferenciação, entre as populações estudadas. Goossens *et al.* (2005) analisaram populações de orangotango (*Pongo pygmaeus*) dos dois lados do rio Kinabatangan em Sabah, Malásia. Através da análise do DNA microssatélite eles concluíram que o rio Kinabatangan funcionava como uma barreira natural para o fluxo gênico desses animais. Vallinoto *et al.*

(2006) testaram se o rio Tocantins funciona como uma barreira para o fluxo gênico de sagüis-pretos (*Saguinus niger*) utilizando o DNA mitocondrial. Eles concluíram que o rio em questão, funciona como uma barreira geográfica e ainda estaria tornando as populações tão divergentes que estas poderiam representar entidades taxonômicas distintas. Triant *et al.* (2004) analisaram amostras de ursos pretos (*Ursus americanus luteolus*) de dois locais do estado de Luisiana, EUA, através do DNA microssatélite. Os resultados que eles encontraram mostraram que existia uma estrutura genética moderada causada pela ausência de fluxo gênico entre essas duas regiões. Eles ainda verificaram que uma das populações estudadas, na qual em 1964 ocorreram introduções de ursos pretos de Minnesota, possuía uma maior diversidade quando comparada com a outra população. Esses trabalhos exemplificam a diversidade de aplicações dos marcadores moleculares com uma importância significativa no estudo da dinâmica de populações.

2- OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi inferir a estrutura genética das populações de sagüis introduzidos nos diversos fragmentos de mata na área de proteção ambiental da Bacia do Rio São João/Mico leão dourado, por meio da análise do DNA com o uso de marcador molecular (microssatélite).

Como objetivos secundários temos:

- Inferir o número de populações de sagüis existentes na região e o fluxo gênico entre elas
- Verificar se os sagüis foram introduzidos a partir de uma ou várias introduções;
- Inferir se a BR101 funciona como uma barreira geográfica para os sagüis;

Essas informações irão contribuir para a elaboração de planos de manejo para a espécie não nativa em questão, *Callithrix spp.*.

3- METODOLOGIA

3.1-Área de estudo

A área deste estudo compreende fragmentos de Mata Atlântica localizados na área ambiental da Bacia do Rio São João/Mico leão dourado, no interior do Estado do Rio de Janeiro (Fig.2). É uma região de Mata Atlântica de baixada costeira do Estado do Rio de Janeiro, que pode ser classificada como Floresta Estacional Tropical, ou como Floresta Úmida de Baixada (AMLD, 2006). A região sofreu intenso desmatamento, portanto possui vários fragmentos de mata. Existem várias Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN), em diferentes estados de conservação (vegetação primária ou secundária), que são de grande importância para a conservação do mico leão dourado, além das Reservas Biológicas de Poço das Antas e União.

3.2-Coleta das amostras

Foram coletadas e utilizadas 81 amostras de pêlos de sagüis (*Callithrix spp.*) para este trabalho. As coletas ocorreram em vários fragmentos de mata próximos da Reserva Biológica Poço das Antas, em Silva Jardim - RJ (Fig.2). Para este estudo, os fragmentos foram agrupados de acordo com a proximidade e a conectividade entre eles. Cinco grupos foram formados: Rio Vermelho, Região de Imbaú, Região de Vendaval, Região de Igarapé, e Vale do Cedro (Fig.2). Estes locais, foram amostrados 18, 20, 19, 21 e 3 indivíduos, respectivamente. As amostras foram coletadas pela equipe do projeto dos sagüis da AMLD em colaboração com a Universidade Estadual do Norte Fluminense. Essas amostras foram coletadas de acordo a licença concedida pelo IBAMA. Estas encontram-se armazenadas na coleção de DNA da fauna e flora silvestres, no Laboratório de Ciências Ambientais da UENF. Essa coleção está credenciada junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) como fiel depositária.

3.3-Extração de DNA

O DNA foi extraído da raiz dos pêlos coletados no campo. A extração foi realizada seguindo o protocolo para o Kit de extração de DNA (Dneasy) da QIAGEN. Os pêlos foram colocados num tubo de microcentrífuga e em seguida foram acrescentados 180 µL do tampão para lisar o tecido (Buffer ATL), e 20 µL de proteinase K, enzima que catalisa a lise do tecido. Este material foi incubado a 55°C durante a noite. Posteriormente, foram adicionados 200 µL do tampão para lisar as células (Buffer AL). As amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos. Logo depois, 200 µL de etanol absoluto foram acrescentados ao material. Toda a solução foi pipetada e transferida do tubo de microcentrífuga para uma coluna (spin columns). Este material foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto, e o que passou pela coluna foi descartado. Foram adicionados 500 µL do primeiro tampão de lavagem (Buffer AW1), novamente centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e descartado o que passou pela coluna. Foram adicionados 500 µL do segundo tampão de lavagem (Buffer AW2). Neste ponto o material foi centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos, descartando o que passou pela coluna. Essas colunas foram retiradas do tubo coletor e encaixadas em tubos de microcentrífuga novos e devidamente identificados. Por último, foram acrescentados 150 µL do tampão de eluição (buffer AE) e depois de 5 minutos o material foi centrifugado a 8000 rpm por 2 minutos. O DNA eluído passou para o micro tubo do tipo Ependorff.

3.4-DNA Microssatélite

A genotipagem dos indivíduos amostrados e a análise da variabilidade genética destes foi realizada no Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves - IB/USP. Para essa análise regiões de DNA microssatélites foram amplificadas através da reação de PCR (reação em cadeia da polimerase). Para esta reação foram testados 28 “primers”, entre específicos e heterólogos. Destes, oito foram usados, sendo cinco específicos (CJ1, CJ6, CJ7, CJ13 E CJ14) descritos por Nievergelt *et al.* (1998); e três heterólogos (BLTMS2, BLTMS3, e BLTMS10) que são

específicos para *Leontopithecus chrysopygus* (Calithichidae) e foram descritos por Perez-Sweeney *et al.* (2005).

No presente trabalho foi utilizada uma forma alternativa para a marcação do "primer" com fluorescência - "primer tail M13", descrito por Ganache *et al.*, 2001. Esta técnica consiste em utilizar três "primers" na reação de PCR: o "primer" DR, o "primer" UP que tem em sua extremidade 5' uma cauda com a seqüência M-13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'), e o terceiro "primer", que é apenas a seqüência da cauda M-13, marcado com fluorescência. As principais vantagens desta técnica são: apenas um "primer", o M-13, precisa ser marcado com fluorescência, pois ele pode ser combinado com qualquer outro "primer", o que proporciona uma economia nos primers com fluorescência; e uma menor ocorrência de artefatos, o que facilita a identificação dos alelos verdadeiros.

A reação de PCR com os "primers" para microssatélites também segue o protocolo padrão, com algumas modificações na concentração dos reagentes e na temperatura de anelamento dos "primers", de acordo com a melhor condição para cada "primer". Portanto, a reação de PCR foi otimizada para cada primer. O total de cada reação de PCR é de 10 µL que contém 0,05 U de Platinum polimerase, 0,8mM de cada dNTP, 2,0 mM de magnésio (em alguns casos 1,5mM) (tabela 1), 10 µg/µL de BSA, e 2,0 µL da mistura dos três "primers" (M13, UP-M13 e DR) na proporção 15:1:15, respectivamente.

Essa reação é submetida a um aquecimento a 94°C por 10 minutos iniciais, e logo após é submetida a 30 ou 40 ciclos (dependendo do "primer" utilizado) com as seguintes fases: 94°C por 40 segundos para desnaturar o DNA, X°C (temperatura específica de cada "primer") (tabela 1) por 40 segundos para o anelamento dos primers, 72°C por 40 segundos para a extensão do fragmento, e no final dos 35 ciclos, 72°C por 30 minutos para finalizar a reação. O produto final da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% no seqüenciador automático modelo ABI 377 (Applied Biosystems).

Tabela 1: Temperatura de anelamento e concentração de Magnésio otimizadas para cada “primer”.

“Primers”	CJ1	CJ6	CJ7	CJ13	CJ14	BLTMS2	BLTMS3	BLTMS10
Temp. °C	58	58	58	58	58	56	60	60
[Mg]/mM	2,0	2,0	2,0	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0

3.5-Análise dos dados

Os dados gerados pelo seqüenciador automático foram interpretados pelo programa Genotyper 2.1 (Applied Biosystems). Este programa gera uma imagem de cada pico, que representa um alelo para cada indivíduo.

A genotipagem dos indivíduos, mesmo quando feita através de um programa específico, pode conter erros causados pela degradação do DNA, baixa concentração de DNA ou por mutações na região dos ‘primers’ (Oosterhout *et al.*, 2004). Os dados gerados foram analisados pelo programa MicroChecker 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004) para a identificação destes possíveis erros e sua correção. Este programa identifica a existência de alelos nulos (alelos que não são amplificados por causa de alguma mutação no sítio de ligação do “primer”, em uma das fitas do DNA), de artefatos e a dominância de alelos pequenos. De acordo com Oosterhout *et al.* (2004) o programa constrói uma distribuição aleatória dos genótipos baseada na distribuição observada dos alelos para cada *locus* em cada população, e usa a heterozigiosidade para identificar os erros. Por exemplo, para identificar a ocorrência de alelos nulos, os testes realizados devem mostrar a existência de um significativo excesso de homozigotos distribuídos por todas as possíveis classes de homozigotos para aquele *locus* e população em questão. Mas se todos os *loci* apresentarem excesso de homozigotos, o programa interpreta que as populações encontram-se estruturadas e esse excesso então, seria esperado. Portanto o MicroChecker identifica os erros de genotipagem sem pressupor condições de fluxo gênico entre as populações. Finalmente, a freqüência dos alelos nulos podem ser estimadas e corrigidas aleatoriamente para cada *locus* em cada

população. Para as análises, as amostras foram agrupadas de acordo com os fragmentos onde foram amostrados.

A formação dos grupos (Rio Vermelho, Região de Imbaú, Região de Vendaval, Vale do Cedro, e Região de Igarapé) encontrada na figura 2 foi adotada para todas as análises realizadas. A população de Vale do Cedro não pôde ser analisada por este programa devido ao baixo número de indivíduos amostrados nela. Foi então, considerado que esta população não apresenta nenhum dos erros em questão.

Com os dados corrigidos, foram realizadas as análises para verificar a estrutura genética entre as populações estudadas. Através do programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) foi calculado o índice de fixação, F_{st} que mostra o valor da divergência genética entre populações (Slatkin, 1995). Este valor é calculado a partir das frequências gênicas encontradas em certa população em comparação com a que foi encontrada em todas as populações; através da seguinte expressão: $F_{st} = H_t - H_s/H_t$; sendo, H_t a heterozigosidade total, e H_s a heterozigosidade em uma certa subpopulação ou grupo (Avise, 2004). Por exemplo, a frequência encontrada em Vale do Cedro foi comparada com a que foi encontrada em cada um dos outros quatro grupos. Assim uma matriz com os valores de F_{st} comparados par a par foi gerada. Foram obtidos valores de F_{st} para cada dupla de populações, e ainda agrupando as populações ao noroeste e ao sudeste da BR-101. De acordo com Slatkin (1995), valores de F_{st} entre 0,15 e 0,25 mostram uma estruturação genética moderada; valores maiores que 0,25, uma alta estruturação; e valores menores que 0,15 indicam a ausência de estrutura genética. Os valores de F_{st} são dados como significativos ou não através de um Teste T realizado automaticamente através do programa Arlequin.

O programa Structure 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) foi utilizado para averiguar a estrutura genética existente entre as populações a partir de uma análise de agrupamentos baseada em modelos (model-based clustering). O método assume que existe um número K de populações (agrupamentos), cada

qual com a sua frequência alélica característica. O número K de populações é calculado utilizando inferência Bayesiana de probabilidade, geralmente dentro do intervalo de um a cinco. Além de inferir o número de agrupamentos mais provável, o programa atribui (probabilisticamente) os indivíduos amostrados a cada um dos K agrupamentos, a partir dos seus genótipos. Cada agrupamento é formado por indivíduos semelhantes geneticamente. Para estas análises, a divisão dos grupos adotada anteriormente foi mantida, mas não foi possível incluir a população de Vale do Cedro, uma vez que esta não foi corrigida pelo MicroChecker e o método utilizado pelo programa Structure parte do pressuposto de que não existem alelos nulos nas populações (Pritchard *et al.*, 2000).

4- RESULTADOS

Nas populações de sagüis estudadas foi encontrado um total de 65 alelos para os oito “primers” utilizados. Na tabela 2, pode-se observar que o “primer” CJ7 e o BLTMS2 foram os que apresentaram o menor número de alelos. CJ14 foi o “primer” que apresentou um maior número, com 15 alelos. A média de alelos por *locus* foi de aproximadamente oito alelos (8,125). Os alelos que só ocorrem numa determinada população são chamados alelos restritos. Nas análises realizadas neste trabalho foram encontrados 19 alelos restritos (tabela 3). O “primer” com maior número de alelos foi o CJ14 com 15 alelos, e o “primer” com menor número de alelos foi o CJ7 e o BLTMS2 com 2 alelos cada. A população de Imbaú foi a que apresentou o maior número desses alelos. A ausência de alelos restritos não ocorreu em nenhuma população.

Tabela 2: Número de alelos encontrados para cada “primer” e a variação em pares de bases desses alelos.

“Primers”	CJ1	CJ6	CJ7	CJ13	CJ14	BLTMS2	BLTMS3	BLTMS10
Nº alelos	11	08	03	12	15	03	09	04
Var. (pb)	120-156	132-158	109-123	244-282	120-182	328-332	203-243	251-259

Tabela 3: Números de alelos encontrados para cada “primer” e o número de alelos restritos em cada população.

Populações	Rio Vermelho	Imbaú	Vendaval	Igarapé	Vale do Cedro
“Primer” CJ1	06	05	06	07	03
“Primer” CJ6	05	06	06	05	03
“Primer” CJ7	02	02	03	01	01
“Primer” CJ13	06	10	05	07	03
“Primer” CJ14	06	10	07	11	03
“Primer” BLTMS2	02	03	02	02	02
“Primer” BLTMS3	04	05	05	08	03
“Primer” BLTMS10	02	03	03	02	01
Nº de alelo restritos	01	09	03	05	01

Os possíveis erros desta genotipagem foram verificados pelo programa MicroChecker. Nas quatro populações analisadas por este programa foi detectada apenas a ocorrência de alelos nulos. Para a população de Vale do Cedro, essa análise não foi realizada por causa do baixo número de indivíduos amostrados. Pela verificação manual dos indivíduos desta população, foi possível admitir a inexistência de alelos nulos nesta população. Para as populações analisadas foram encontrados alelos nulos em três “primers”, como mostra a tabela 4. Os alelos nulos foram corrigidos, pelo programa, aleatoriamente.

Tabela 4: Frequência dos alelos nulos inferidos pelo Microchecker.

População	‘Primer’	Freq. Alelo nulo
Imbaú	CJ 6	0,1787
Rio Vermelho	CJ 13	0,1744
Vendaval	BLTMS 10	0,2269

Com a frequência dos alelos corrigida, foram realizadas as análises para verificar a estrutura genética entre as populações. Através do programa Arlequin, foram obtidos valores de F_{st} para cada dupla de populações (tabela 5). Estes

índices mostraram diferentes níveis de diferenciação genética entre as populações estudadas. Todos os valores de F_{st} foram significativos ($P < 0,05$).

Tabela 5: Valores de F_{st} gerado para cada dupla de populações.

Populações	Rio Vermelho	Imbaú	Vendaval	Igarapé
Rio Vermelho	0			
Imbaú	0,1084	0		
Vendaval	0,0538	0,1221	0	
Igarapé	0,1664	0,0881	0,1392	0
Vale do Cedro	0,2500	0,1946	0,2318	0,1680

Como pode ser visto na tabela 5, a população que mais se diferenciou foi Vale do Cedro. Esta população apresentou uma estrutura genética alta, quando comparada com Rio vermelho, e moderada em relação às outras populações. As populações mais semelhantes foram Rio Vermelho e Vendaval. Quando comparada com Igarapé, a população Rio Vermelho apresentou uma estrutura genética moderada.

O valor do F_{st} gerado quando as populações foram agrupadas em duas, uma ao noroeste (Imbaú, Vale do Cedro e Igarapé) e outra ao sudoeste (Rio Vermelho e Vendaval) da Br 101 foi de 0,1436. Esse valor é muito próximo do limite mínimo (0,15) para a existência de uma estrutura genética moderada entre os dois grupos (Slatkin, 1995).

A análise de agrupamentos realizada pelo programa Structure 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000) sugere que as populações estudadas (Rio Vermelho, Imbaú, Vendaval e Igarapé) dividem-se em três grupos ('clusters'), pois foi o valor de K com maior probabilidade *a posteriori* logaritmizada ($\log P(X|K)$) (Tabela 6). O grupo 1 foi formado, principalmente, por indivíduos provenientes da população de Igarapé. O grupo 2, em sua maioria, por indivíduos provenientes de Rio Vermelho e Vendaval. O grupo 3 foi formado por indivíduos provenientes de Imbaú (Tabela 7).

Ainda na tabela 6, pode-se observar que o valor médio do parâmetro alfa (proporção de mistura) para $K = 3$ foi de 0,0521. Este valor sugere uma baixa mistura entre populações; ou seja, as populações não estão completamente misturadas ($\alpha > 1$) ou separadas ($\alpha = 0$).

Tabela 6: Valor dos logaritmos das probabilidades *a posteriori* ($\log P(X|K)$) e alpha médio para cada K.

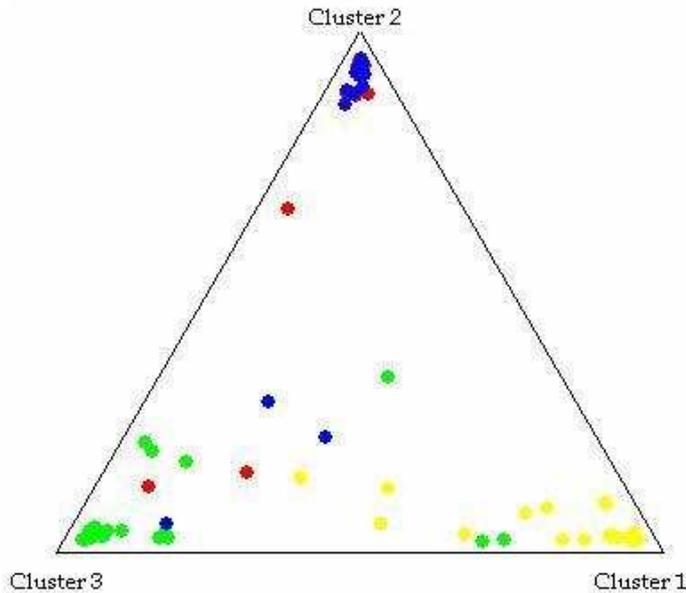
K	LogP (X K)	alpha médio
4	-1565,4	0,0603
3	-1530,1	0,0521
2	-3229,1	2,0603

Tabela 7: Proporção de classificação de indivíduos provenientes de diferentes populações mostrando a composição de cada grupo inferido pelo programa Structure. População RV (Rio Vermelho), Imb (Imbaú), Vd (Vendaval), Ig (igarapé).

Pops	Nº indvs	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
RV	18	0,033	0,849	0,119
Imb	20	0,140	0,060	0,801
Vd	19	0,050	0,830	0,119
Ig	21	0,834	0,037	0,129

O agrupamento dos indivíduos provenientes de cada população nos três grupos é mostrado na figura 3. Cada ponto representa um indivíduo, e a proximidade destes com os vértices do triângulo mostra a proximidade genética com cada grupo. No vértice que representa o grupo 2, ocorreu uma sobreposição entre a maioria dos indivíduos da população de Rio Vermelho e Vendaval. Os pontos que foram encontrados próximos a outro grupo mostram a possibilidade de imigrantes ou de descendentes de imigrantes recentes.

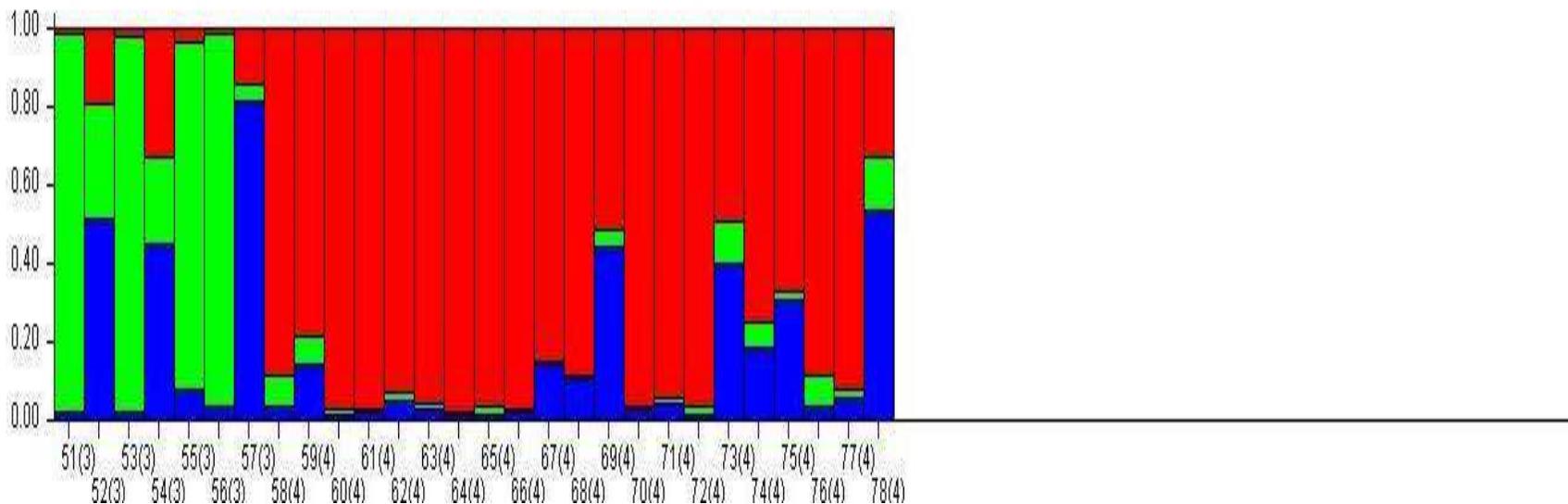
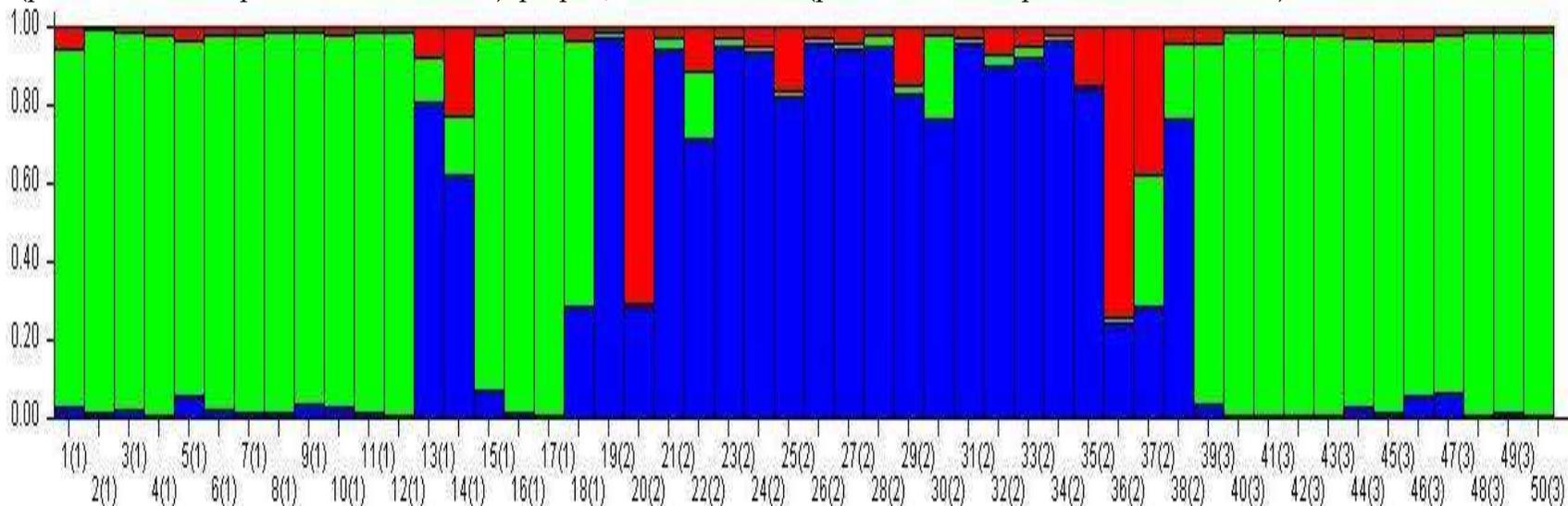
Figura 3: Representação esquemática da disposição dos indivíduos em relação a cada grupo. Pontos azuis (indvs de Rio vermelho), vermelho (indvs de Vendaval), verde (indvs de Imabú), amarelo (indvs de Igarapé).



Outra análise realizada no Structure 2.0 foi o teste de atribuição (figura 4). Nesta figura, cada linha vertical corresponde a um indivíduo. A probabilidade de um indivíduo pertencer ao 'cluster' 1 é dada pela proporção vermelha da barra, a do 'cluster' 2 é dada pela proporção verde, e a do 3 pela proporção azul.

Os resultados desta análise estão em concordância com os resultados mostrados na figura 3. A maior parte dos indivíduos foi atribuída corretamente ao grupo representado pela sua população de origem (onde as amostras foram coletadas). Apenas nove indivíduos em um total de 81 foram atribuídos a grupos diferentes. As porcentagens de classificação mostraram que 16,6% dos indivíduos provenientes da população de Rio Vermelho foram atribuídos ao grupo 3 (Imbaú); 15% dos indivíduos de Imbaú foram atribuídos ao grupo 1 (Igarapé), 15,7% dos indivíduos de Vendaval foram atribuídos ao grupo 3 (Imbaú), e finalmente, 4,7% dos indivíduos de Igarapé foram atribuídos ao grupo 3 (Imbaú).

Figura 4: Representação da probabilidade de um indivíduo pertencer a cada agrupamento. Número (1) - Rio Vermelho; (2)- Imbaú; (3) - Vendaval; (4) -Igarapé. Proporção vermelha da barra (probabilidade de pertencer ao 'cluster'1), proporção verde da barra (probabilidade de pertencer ao 'cluster'2), proporção azul da barra (probabilidade de pertencer ao 'cluster'3).



5- DISCUSSÃO

O número de alelos encontrados para os “primers” CJ1, CJ6, CJ13 e CJ14 (espécie específicos) (tabela 2) foi, no geral, maior do que o encontrado por Nievergelt *et al.* (1998). A variação desses alelos também foi maior do que a encontrada por e também Nievergelt *et al.* (1998). Isto era esperado, uma vez que os sagüis analisados por eles eram animais de cativeiro, provavelmente endogâmicos e com baixa variabilidade. Os animais analisados pelo presente trabalho são animais introduzidos que possuem uma alta diversidade genética, não apresentando características endogâmicas, como a baixa variabilidade; e podem ser originados de diferentes regiões do Brasil.

A estrutura genética das populações inferida pelos valores de F_{st} (tabela 5), mostra que existem vários níveis de estrutura, dependendo das populações em questão. De acordo com valores de F_{st} entre 0,15 e 0,25 mostram uma estruturação genética moderada; valores maiores que 0,25, uma alta estruturação; e valores menores que 0,15 indicam a ausência de estrutura genética. Em comparação com os valores definidos por Slatkin (1995), neste trabalho foi possível encontrar populações com estrutura genética alta, moderada e também a ausência de estrutura genética (tabela 5).

Em nosso estudo, a ausência de estrutura genética foi encontrada entre as seguintes populações: Rio Vermelho e Imbaú, Rio Vermelho e Vendaval, Imbaú e Vendaval, Imbaú e Igarapé, e entre Igarapé e Vendaval (tabela 5).

As populações de Rio Vermelho e Vendaval estão geograficamente distantes, e são separadas por uma matriz aberta. Mesmo assim essas populações apresentaram uma estruturação genética muito baixa ($F_{st} = 0,053$), ou seja, não estão estruturadas. Isto gera indícios de que a ocorrência dos sagüis na região ocorreu por meio de várias introduções. Nessas diferentes introduções, sagüis geneticamente semelhantes podem ter sido introduzidos nos diferentes fragmentos, gerando assim, essas duas populações não estruturadas. Existe um corredor florestal que está sendo implantado nesta região e vai ligar o fragmento

de Rio Vermelho à Reserva Biológica (REBIO) Poço das Antas. Este tem por intuito facilitar a locomoção do mico leão dourado. Vale ressaltar, que os sagüis também terão mais facilidade para atravessar a matriz através desse corredor. Isto pode aumentar a possibilidade dos sagüis se dispersarem ainda mais pela região e chegar à REBIO Poço das Antas e a outros fragmentos de mata, aumentando assim, o número de fragmentos com a presença de sagüis. De acordo Ruiz-Miranda *et al.* (2006) a competição entre os sagüis e o mico leão dourado pode ser vista como uma interação negativa.

As populações de Rio Vermelho e Imbaú, além de também estarem separadas por uma matriz aberta, estão localizadas em lados opostos da rodovia BR-101 (figura 2). A distância geográfica entre Rio Vermelho e Imbaú é muito semelhante à encontrada entre Rio Vermelho e Vendaval. É interessante observar que apesar da semelhança entre essas distâncias, o valor de F_{st} foi maior entre a população de Rio Vermelho e Imbaú ($F_{st} = 0,108$). Isto pode ser consequência de uma possível barreira geográfica causada pela rodovia, uma vez que as populações de Rio Vermelho e Vendaval estão do mesmo lado da BR-101. Mas entre esses fragmentos também não se pode descartar a possibilidade de terem ocorrido diferentes solturas de sagüis geneticamente semelhantes.

Outra evidência que ressalta a possibilidade da BR-101 influenciar os valores de F_{st} reside no fato de que, apesar de Imbaú e Vendaval serem as populações mais próximas geograficamente, porém separadas pela BR-101, elas apresentam maior valor de F_{st} do que o observado entre populações mais distantes, como a população de Imbaú e Rio Vermelho, ou Vendaval e Rio Vermelho (tabela 5), fugindo à expectativa de um modelo de simples isolamento por distância. O valor de F_{st} gerado quando as populações foram divididas em dois grupos, ao noroeste e ao sudeste da BR-101 foi de 0,1436, o qual aponta para a ausência de estrutura genética mas encontra-se perto do valor que determina uma estrutura moderada. É preciso manter em perspectiva que essas populações foram formadas por indivíduos introduzidos, e a ausência de estruturação genética neste

caso, pode ser consequência da introdução de animais geneticamente semelhantes nos diferentes fragmentos de mata. Como consequência da suposta ausência de fluxo provocado pela BR-101, as populações estariam se diferenciando cada vez mais com o passar do tempo, uma vez que os sagüis foram introduzidos há pouco tempo, relativamente.

As populações de Imbaú e de Igarapé estão localizadas no mesmo lado da BR-101, ao noroeste, e podem ser consideradas distantes geograficamente (aproximadamente 40 Km). O valor de F_{st} (0,088) entre essas duas populações mostra que elas são bem semelhantes, não existindo assim, uma estrutura genética entre elas. As populações de sagüis estudadas por Faulkes *et al.* (2003) em regiões do nordeste do Brasil, distantes aproximadamente 40 Km, apresentaram uma estrutura genética alta, pois o valor de Φ foi 0,48 (análogo do F_{st}). Eles sugeriram que os sagüis não seriam capazes de se dispersar por regiões tão distantes. Sendo assim, a expectativa de fluxo de sagüis entre essas duas populações (Imbaú e Igarapé) é baixa, o que nos leva a supor que a semelhança entre elas seria consequência de introduções independentes na região. Isto é reforçado pela seqüência cronológica do registro da presença de sagüis nos diferentes fragmentos. A data desses registros dos sagüis em Imbaú foi no ano de 2002, em Igarapé foi no ano de 2003 e 2004 (Fig.1). Geograficamente, entre essas duas populações, existe a população de Vale do Cedro para a qual o registro dos sagüis só ocorreu no ano de 2004. Se a presença dos sagüis nos diferentes fragmentos fosse consequência da dispersão dos mesmos, o fragmento de Vale do Cedro deveria ter sido ocupado antes do fragmento de Igarapé e sua população seria geneticamente semelhante às de Imbaú e Igarapé. Como pode ser visto na tabela 5, a população de Vale do Cedro é a mais diferente de todas. Essas observações, juntamente com o número de alelos observados, sugerem a ocorrência de várias introduções independentes de sagüis geneticamente semelhantes nos diferentes fragmentos de mata estudados. O que está em concordância com Andrade (2004) que inferiu (a partir da utilização de

outro marcador molecular - DNAm) que as várias introduções de sagüis nos fragmentos analisados (Rio Vermelho e Imbaú) ocorreram de forma independente.

O modelo para distribuição dos genótipos com maior verossimilhança foi o de três agrupamentos com baixa mistura. O primeiro agrupamento é formado pelas populações Rio Vermelho e Vendaval, que são as mais semelhantes geneticamente, como mostra o valor de F_{st} ; o segundo agrupamento é formado pelos fragmentos da região de Imbaú; e o terceiro por Igarapé. A população de Vale do Cedro não pôde ser analisada por causa do pequeno número de indivíduos, mas por ser a mais divergente, representaria um quarto grupo neste cenário. Portanto, a separação geográfica dos fragmentos (figura 2) não corresponde ao padrão observado de diferenciação genética.

A semelhança genética entre os indivíduos de Rio Vermelho e Vendaval fica clara na figura 3. A maioria dos indivíduos destes fragmentos estão bem agrupados, ocorrendo sobreposição entre os indivíduos, e próximos ao vértice do triângulo que representa o grupo ("cluster") 2. Alguns indivíduos se encontram mais próximos aos indivíduos do grupo 3 (Imbaú), justificando a baixa estrutura genética entre esses três fragmentos. Os indivíduos de Igarapé encontram-se próximos ao vértice do triângulo correspondente ao grupo 1, sendo que alguns estão espalhados na direção do grupo 3. Isso se reflete no valor de F_{st} encontrado para as populações de Imbaú e Igarapé, que mostrou a existência de uma baixa estruturação entre estas populações. Pode-se ainda ver, que a semelhança entre as populações de Rio Vermelho e Vendaval é maior que a semelhança entre Imbaú e Igarapé.

Esses dados apresentam três cenários possíveis para explicar os resultados observados. Em primeiro lugar, teríamos evidência de mistura entre alguns fragmentos a partir de migrantes ou descendentes recentes de migrantes entre essas populações, o que explicaria a baixa estrutura genética. Por outro lado, como este trabalho trata de populações introduzidas, a aparente mistura observada entre as populações, pode ser resultado de introduções independentes de sagüis

geneticamente semelhantes nos diversos fragmentos de mata estudados; ou ainda a novas introduções que podem estar ocorrendo. O terceiro cenário (e provavelmente mais correspondente à realidade) é que os padrões de estrutura observados sejam resultado de uma combinação entre as introduções independentes e a migração natural de indivíduos entre os fragmentos de mata.

Parte da divergência genética pode estar sendo causada pela ausência de fluxo entre fragmentos separados por grandes distâncias ou pela rodovia BR-101, mas o tempo evolutivo é pequeno para verificar uma estruturação entre esses fragmentos. Os trabalhos desenvolvidos por Faulkes *et al.*, 2003 (citado anteriormente) e por Grativol *et al.* (2001) mostram que a estrutura genética entre populações separadas por grandes distâncias geográficas pode ser consequência da ausência de fluxo. O valor de R_{st} (um análogo do F_{st}) encontrado por Grativol *et al.* (2001) foi de 0,31, o que mostra uma estrutura genética alta entre as populações de mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*) estudadas. Estes animais foram estudados na sua área de ocorrência natural, em diversos fragmentos de mata também separados por grandes distâncias geográficas por consequência do desmatamento da Mata Atlântica. Ainda em concordância com a possível ausência de fluxo dos sagüis, os estudos de campo realizados mostraram que nenhum sagüi foi encontrado em fragmentos de mata que não fosse aquele onde os animais foram capturados pela primeira vez (Morais, MM; comunicação pessoal).

Neste trabalho, a estrutura genética mais alta foi encontrada entre as populações de sagüis de Rio Vermelho e Vale do Cedro ($F_{st} = 0,25$). Todas as outras populações quando comparadas com Vale do Cedro apresentaram uma estrutura genética moderada (tabela 5). Sendo assim, a população de Vale do Cedro é a população mais divergente. Os sagüis de Vale do Cedro possuem características fenotípicas diferentes dos animais das outras populações, principalmente em relação à pelagem e ao padrão do tufo. Os animais do Vale do Cedro possuem uma pelagem mais densa e apresentam uma coloração mais amarelada do que a encontrada nas outras populações; além disso, o padrão dos

tufos é indefinido tanto em relação à distribuição quanto em relação à coloração (Morais, MM; comunicação pessoal). Uma hipótese que emerge em função dessas observações seria uma possível hibridação de *C. jacchus* com *Callithrix aurita*. Os valores de *Fst* encontrados nesse trabalho reforçam essa hipótese, uma vez que a população do Vale do Cedro foi a mais divergente. Hershkovitz (1977) registrou a ocorrência de híbridos entre espécies do gênero *Callithrix* tanto na natureza quanto em cativeiro. *Callithrix aurita* ocorre naturalmente na Mata Atlântica, em regiões mais altas, e está ameaçada de extinção. Os animais da população do Vale do Cedro, prováveis híbridos com *C. aurita*, não poderiam ocorrer naturalmente na região, uma vez que *C. aurita* é nativo de regiões mais altas. Estes animais foram introduzidos por ação antrópica, e mostram a possibilidade da formação de híbridos, envolvendo *C. aurita*. Os dados sobre esta população são preliminares, uma vez que o tamanho amostral é baixo devido ao pequeno número de animais que a constituem.

6- IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS

Os resultados gerados por este trabalho mostram que os sagüis introduzidos na região de estudo possuem uma variabilidade genética alta. Isso é possivelmente, consequência de várias introduções de animais provenientes de diferentes lugares. Esse padrão de introdução faz com que as populações acabem sendo geneticamente semelhantes, mas as populações, no geral, não possuem um intenso fluxo gênico, ou seja, são populações separadas. Esse fato, quando não observado, pode gerar conflitos quanto às medidas a serem tomadas no plano de manejo da espécie. De acordo com Ruiz-Miranda *et al.* (2006), os sagüis podem ser uma ameaça para a conservação do mico leão dourado, o que mostra a importância de se obter sucesso com o plano de manejo dos sagüis introduzidos na região estudada.

De acordo com Sakai *et al.* (2001) os sagüis estariam no início da fase da colonização, uma vez que eles foram grupos, populações, se reproduzem, mas

ainda não se dispersam pela região. Uma das causas dessa possível ausência de dispersão dos sagüis é o fato destes animais terem sido introduzidos em uma região de Mata Atlântica fragmentada. Com a conectividade entre os fragmentos de mata comprometida, o fluxo, a dispersão dos sagüis fica dificultada pelos perigos que uma matriz aberta oferece aos animais, como a vulnerabilidade a predadores. Esta ausência de fluxo é um fator positivo para o manejo dessa espécie, uma vez que é mais complexo elaborar um plano de manejo para uma espécie que se dispersa com facilidade no ambiente.

A implementação do corredor florestal que ligará o fragmento de Rio Vermelho à Reserva Biológica Poço das Antas aumentará a conectividade entre os fragmentos de mata que serão ligados por este corredor e, conseqüentemente, poderá proporcionar aos sagüis uma maior possibilidade de dispersão entre esses fragmentos. Os sagüis poderão, até mesmo, chegar mais rapidamente até a Rebio Poço das Antas. Essa dispersão ocorrendo, seria um dos fatores que dificultaria o manejo dos sagüis na região.

Para cada fase de uma invasão, Sakai *et al.* (2001) propõe uma forma de lidar com a espécie não nativa. Métodos de prevenção com relação à espécie não nativa só são indicados se a espécie ainda não se estabeleceu no novo habitat. Depois do estabelecimento da espécie não nativa e antes que ela se espalhe na região da introdução, eles sugerem que os animais sejam erradicados. O controle da espécie não nativa só é indicado se a espécie introduzida já se dispersou pela região. Como os sagüis introduzidos na área de proteção ambiental da bacia do rio São João-Mico Leão Dourado encontram-se na fase de colonização, ou seja, se estabeleceram na região, mas ainda não estão se dispersando, sugere-se que métodos de erradicação sejam adotados no plano de manejo. Se os sagüis presentes na região forem erradicados e outros sagüis continuarem chegando na região, a população estará sempre sendo renovada, o que dificultaria ainda mais o plano de manejo dessa espécie. Por isso, é preciso que sejam adotadas medidas para que novas solturas desses animais não ocorram na região.

7- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que:

- O melhor cenário para representar as populações genéticas na área estudada foi o que apresentou quatro populações em cinco regiões geograficamente definidas. Essas quatro populações estariam divididas da seguinte forma: fragmentos de Rio Vermelho e Vendaval como uma única população, regiões de Imbaú, Vale do Cedro e Igarapé como populações distintas.
- A introdução dos sagüis no diferentes fragmentos de mata estudados ocorreu por meio de várias introduções independentes. Podendo, os sagüis semelhantes, terem sido introduzidos em diferentes fragmentos e mascarando uma ausência de estrutura genética, como no caso de Imbaú e Igarapé.
- A comparação de resultados obtidos independentemente pelos programas utilizados sugere que a rodovia BR-101 tem potencial para ser uma barreira geográfica para os sagüis. No entanto, isto ainda não está muito claro, devido ao pequeno tempo evolutivo decorrido e às introduções que podem estar ocorrendo de forma contínua durante os anos.
- Foi observada a existência de possíveis migrantes ou descendentes de migrantes recentes entre alguns fragmentos de mata. Isto reforça a baixa estrutura genética encontrada entre algumas populações.
- A população do Vale do Cedro é a mais divergente. Isso, aliado aos dados de observações independentes, sugere a hipótese de que os animais dessa população podem ser híbridos com *C. aurita*, o que ainda deve ser estudado em maior detalhe.
- Com a implantação do corredor florestal que ligará o fragmento de Rio Vermelho até a Reserva Biológica Poço das Antas, os sagüis poderão se dispersar mais facilmente pela região, o que traria

prejuízo para a conservação do mico leão dourado, uma vez que estas espécies competem por território e alimentos.

- Os sagüis encontram-se na fase da colonização, portanto sugere-se que sejam adotados métodos de erradicação da espécie. Medidas para que os sagüis não continuem sendo constantemente introduzidos na região também precisam ser adotadas.

8- BIBLIOGRAFIA

Andrade, C. C. F. Análise genética das populações do sagüi (*Callithrix spp.*) introduzidos na área de ocorrência do mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*). Monografia apresentada no Curso de Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 27 pp. 2004.

Avice, J. C. **Molecular Markers, natural history, and evolution.** 2nd ed. Sinauer. Sunderland. 684 páginas. 2004.

AMLD; Relatório anual da Associação Mico Leão Dourado. 2003.

URL: http://www.micoleao.org.br/arquivos/relatorios/AMLD_Relatorio_Anual_2003.pdf

AMLD; Site oficial da Associação Mico Leão Dourado. 2006.

URL: <http://www.micoleao.org.br>

Auricchio, P. **Primates do Brasil.** Págs. 57-63, 84-87. Parma Ltda, São Paulo. 1995.

Allendorf, W. F.; Lundquist, L.L. Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. **Conservation Biology**, 17(1), p 24-30. 2003.

Cerqueira, R.; Marroig, G.; Pinder, L. Marmosets and Lion -Tamarins Distribution (*Callithrichidae*, Primates) in Rio de Janeiro State South - eastern, Brazil. **Mammalia**, v. 62(2), p. 213-226. 1998.

Chappell, D. E.; Van Den Bussche, R. A.; Krizan, J.; Patterson, B. Contrasting levels of genetic differentiation among populations of wolverines (*Gulo gulo*) from northern Canada revealed by nuclear and mitochondrial *loci*. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 759-767. 2004.

- Eizirik, E.; Kim, J. H.; Menotti-Raymond, M.; Crawshaw Jr, P. G.; O'Brien, S. J.; Johnson, W. E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, v.10, p. 65-79. 2001.
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.45-50. 2005.
- Falush, D.; Stephens, M., and Pritchard, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. **Genetics** 164: 1567-1587. 2003.
- Faulkes, C. G.; Arruda, M. F.; Monteiro da Cruz, M. A. O. Matrilineal genetic within and among populations of the cooperatively breeding common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Molecular Ecology**, 12, p. 1101-1108. 2003.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Editora: EMBRAPA-CENARGEN, Brasília. 220 páginas. 1998.
- Ganache, I. B.; Raposo, M.; Raymond, M.; Deschepper, C. F. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. **BioTechniques**, v. 31 p. 25-28. 2001.
- Goldstein, D. B.; Schlotterer, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University press. New York. 352 páginas. 1999.
- Goossens, B.; Chikhi, L.; Jalil, F.; Ancrenaz, M.; Lackman-Ancrenaz, I.; Mohamed, M.; Andau, P.; Bruford, M. W. Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orangutan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 441-456. 2005.
- Grativol, A. D., Ballou, J. D., Fleischer, R. C. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**, v. 2, p. 1-9. 2001.

- Hershkovitz, P. **Living New World Monkeys (Platyrrhini)**. University of Chicago Press, Chicago. 1117 páginas. 1977.
- Jaksic, F. M.; Iriarte, J. A.; Jiménez, J. E.; Martínez, D. R. Invaders without frontiers: cross-border invasions of exotic mammals. **Biological Invasions**, v. 4, p.157-173. 2002.
- Kashi, Y.; King, D. G. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trend in Genetics**, v. 22 (5), p. 253-259. 2006
- Kinzey, W. G. **Synopsis of New World Primates (16 Genera)** in New World Primates. Aldine De Gruyter. New York. 436 páginas. 1997.
- Manel, S.; Gaggiotti, O. E.; Waples, R. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. **Trend in Ecology and Evolution**, v. 20 (3), p.136-142. 2005.
- Nievergelt, C. M.; Mundy, N. I.; Woodruff, D. S. Microsatellite primers for Genotyping common marmosets (*Callithrix jacchus*) and others callitrichids. **Molecular Ecology**, v. 7, p.1431-1439. 1998.
- Nievergelt, C. M.; Digby, L. J.; Ramiakrishnan, U.; Woodruff, D. F. Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population. **International Journal of Primatology**, v.21, p. 01-20. 2000.
- Oliveira, M. D.; Takeda, A. M.; Barros, L. F.; Barbosa, D. S.; Resende, E. K. Invasion by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) of the Pantanal wetland, Brazil. **Biological Invasions**, v. 8, p. 97-104. 2006.
- Oosterhout, C. V.; Hutchinson, W. F.; Wills, D. P. M. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p. 535-538. 2004.
- Perez-Sweeney, B. M.; Valladares-Padua, C.; Burrell, A. S.; Di Fiori, A.; Satkoski, J.; Groot, P. J. V. C.; Boag, P. T.; Melnick, D. J. Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5(2), p. 198-201. 2005.

- Primack, R. B.; and Rodrigues, E. **Biologia da Conservação**. Editora Vida, Londrina. 328 páginas. 2002.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959. 2000.
- Ruiz, G. M.; Rawlings, T. K.; Doobs, F. C.; Drake, L. A.; Mulladay, T. Global Spread of microorganisms by ships. **Nature**, v. 408, p.49-50. 2000.
- Ruiz-Miranda, C. R.; Affonso, A. G.; Martins, A.; Beck, B. Distribuição do sagüi (*Callithrix jacchus*) nas áreas de ocorrência do Mico-Leão-Dourado (*Leontopithecus rosalia*). **Neotropical primates**, v. 8, p. 98-101. 2000.
- Ruiz-Miranda, C. R.; Affonso, A. G.; Morais, M. M.; Verona, C. E.; Martins, A.; Beck, B. Behavioral and ecological interactions between reintroduced golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus, 1766) and introduced marmosets (*Callithrix spp*, Linnaeus, 1758) in Brazil's atlantic coastal forest fragments. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 49 (1), p. 99-109. 2006.
- Rylands, A. B.; Coimbra-Filho, A. F.; Mittermeier, R. A. Systematics, geographic distribution, and some notes on conservation status of the Callitrichidae. In: **Marmosets and Tamarins: Systematics, Ecology and Behavior** (Rylands, A.B., ed.). University Press, Oxford, p. 11-77. 1993.
- Rylands, A. B.; Schneider, H.; Langguth, A.; Mittermeier, R. A.; Groves, C. P.; Luna, E. R. An Assessment of the Diversity of New World Primates. **Neotropical Primates**, v. 8 (2), p. 61-80. 2000.
- Sakai, A. K.; Allendorf, F. W.; Holt, S. J.; Lodge, M.; Molofsky, J.; With, A. K.; Baughman, S.; Cabin, R. J.; Cohen, J. E.; Ellstrand, N. C.; McCauley, D. E.; O'Neil, P.; Parker, I. M.; Thompson, J. N.; Weller, S. G. The Population Biology of Invasive Species. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 32, p. 305-332. 2001.
- Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p.457-462. 1995.

- Stevenson, M. F.; Rylands, A. B. The Marmosets, Genus *Callithrix*. In: **Ecology and behavior of neotropical primates** (Mittermeier, R. A.; Coimbra-Filho, A. F.; Fonseca, G. A. B. eds.). World Wild Liffe Fund, New York, v. 2, p. 131-222. 1988.
- Tagliaro, C. H.; Schneider, M. P. C.; Schneider, H.; Sampaio, I. C.; Stanhope, M. J. Marmosets Phylogenetics, Conservation Perspectives, and Evolution of the mtDNA Control Region. **Molecular Ecology and Evolution**, v. 14 (6), p. 674-684. 1997.
- Triant, D. A.; Pace, R. M.; Stine, M. Abundance, genetic diversity and conservation of Lousiana black bears (*Ursus americanus luteolus*) as detected through noninvasive sampling. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 647-659. 2004.
- Vallinoto, M.; Araripe, J.; Rego, P. S.; Tagliaro, C. H.; Sampaio, I.; Schneider, H. Tocantins river as an effective barrier to gene flow in *Saguinus niger* populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29 (2), p. 215-219. 2006
- Vitule, J. R. S.; Umbria, S. C.; Aranha, J. M. R. Introduction of the African catfish *Clarias gariepinus* (BURCHELL, 1822) into Southern Brazil. **Biological Invasions**, p. 01-05. 2006.
- Wilcove, D. S.; Rothstein, D.; Dubow, J.; Phillips, A.; Losos, E. Quantifying Threats to imperiled species in the United States. **BioScience**, v. 48, p. 607-615. 1998.
- Willianson, M. Ecological consequences of invasions. In: **Biological Invasion**. p.115-149. Chapman & Hall, London. 1996.