



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

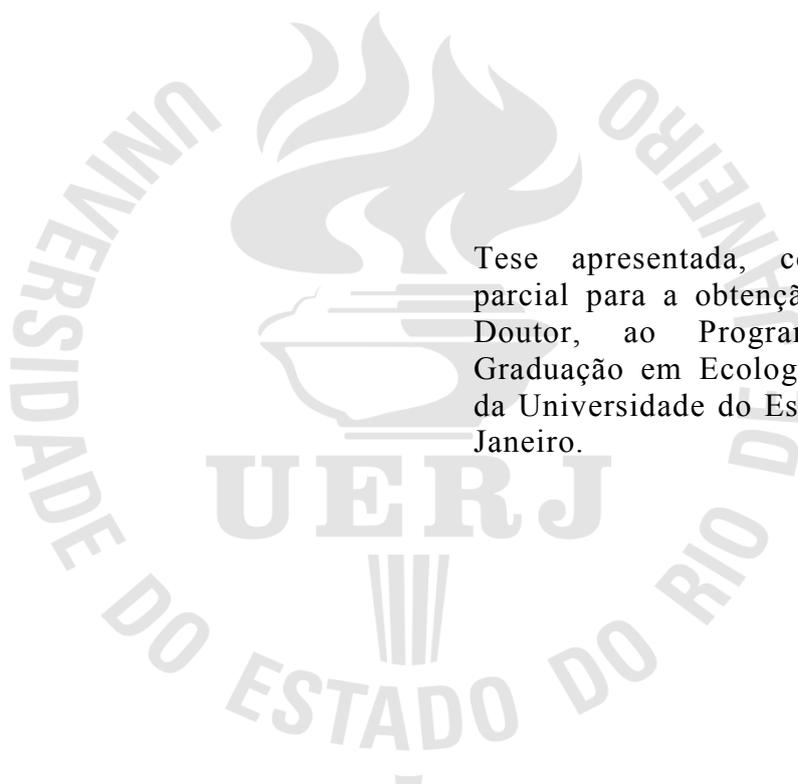
Rodrigo Salles de Carvalho

**Conservação do sagüi-da-serra-escuro – *Callithrix aurita*
(Primates): uma análise molecular e colorimétrica de populações
do gênero *Callithrix* e seus híbridos**

Rio de Janeiro
2015

Rodrigo Salles de Carvalho

Conservação do sagüi-da-serra-escuro – *Callithrix aurita* (Primates): uma análise molecular e colorimétrica de populações do gênero *Callithrix* e seus híbridos



Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Helena de Godoy Bergallo
Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

C331 Carvalho, Rodrigo Salles de.
Conservação do sagüi-da-serra-escuro – *Callithrix aurita* (Primates): uma análise molecular e colorimétrica de populações do gênero *Callithrix* e seus híbridos / Rodrigo Salles de Carvalho. – 2015.
213f. : il.

Orientadora: Helena de Godoy Bergallo
Coorientador: Elizeu Fagundes de Carvalho
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Callithrix - Teses. 2. Saguis - Teses 3. Primatas - Teses. 4. Mata Atlântica - Teses 5. Ecologia animal - Teses. I. Bergallo, Helena de Godoy. II. Carvalho, Elizeu Fagundes de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 599.821

Autorizo para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rodrigo Salles de Carvalho

Conservação do sagüi-da-serra-escuro – *Callithrix aurita* (Primates): uma análise molecular e colorimétrica de populações do gênero *Callithrix* e seus híbridos

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada no dia 30 de novembro de 2015

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Helena de Godoy Bergallo (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Albert Rahul Eugene Antão Nobre de Menezes
Instituto Nacional do Câncer

Prof. Dr. Alcides Pissinatti
Centro de Primatologia do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Leonardo de Carvalho Oliveira
Faculdade de Formação de Professores - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico o resultado destes anos de estudo às minhas filhas Isabel e Claudia, minha mulher Laura, minha segunda mãe Isa e pai Roberto. Também a outros primatas (pequenitos) que têm lutado uma batalha injusta e inglória por sua permanência neste planeta

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES e ao povo brasileiro pelo apoio financeiro à pesquisa;

Agradeço imensamente aos meus orientadores Helena de Godoy Bergallo, Elizeu Fagundes de Carvalho e Dayse A. Silva que me acolheram e encaminharam por uma nova jornada de conhecimentos, com apoio intelectual e técnico;

O acolhimento é um elemento fundamental criador de espaços reais e subjetivos para o pesquisador e sua produção científica, e muitos foram aqueles que, de formas variadas, acolheram minhas dúvidas, demandas, angústias, tempos, solicitações, intrusões, etc.. Quero agradecer:

Àqueles que me abriram as portas de suas casas com carinho e confiança para que eu capturasse e tirasse amostras biológicas de “seus bichinhos”: Ao Michel e à família da Luzia, Aninha, Augusto, Ana, Liu, Bia e Maria; ao Otávio e sua família; à Sílvia e suas filhas; à Romilda e sua família; à Magda, Maria Eduarda e ao Matias; Ao Andreas e sua família;

Àqueles que me acolheram e abrigaram sob seus tetos com o calor de alma: Ao meu velho amigo Júlio e seus filhos, Rosinha, João e Bento; à Maria Thereza Jorand; ao meu irmão Eduardo, Luciana, e minhas sobrinhas Bia e Luna; ao Luiz Paulo e Ângela; à Maria Helena; aos cunhados Maíra, Rodrigo e minhas sobrinhas Carolina e Ana; à Márcia, Gustavo, Duda e Manuela; à Magali e família; ao amigo Moisés; aos contraparentes Gon e Inês, Ju e Marcinha; ao meus primos Olga, Rider e família;

Àqueles que estiveram próximos com seu apoio, preocupação e torcida: ao Jacob e à Lourdes; aos também cunhados Raquel e Jean e sobrinha Chantal; ao meu irmão André, à Valeria e ao meu sobrinho Diego; ao meu tio Roberto, Dayse e Yara; ao Marlon; ao Lúcio Viana; à minha tia Sônia; à minha tia Vitória; ao Pedro e à Tereza;

Ao meus companheiros e colegas “auritólogos”: Daniel Pereira, Nathália Detogne e Marcelo Ciscouto; e aos extra-orientadores: Dra. Leonor Gusmão e Dr. Antônio Amorim;

Aos que me ajudaram com discussões e apoio intelectual Dr. Cezar Amaral, Dr. Leonardo Oliveira (a este também por me ajudar com amostras biológicas), Dra. Maja Kajin, Dra. Karina Morelli e Dra. Gisele Hajdu;

Àqueles que me acompanharam em campo: Bianca Costa, Thais Brener, Juliano, Nina, Regina;

Aos funcionários (e ex-funcionários) do PARNASO (sede Petrópolis) que foram de fundamental importância para o sucesso das capturas, e em particular ao: Mariano, Alessandro, Paulinho e Juca;

Àqueles que me deram suporte na bancada: Talyta, Thamiris, Filipa e sobretudo à Andréa pelo apoio próximo durante todo o processo;

À Silvia Loiola, que além do constante suporte foi companheira e colaboradora na produção de artigos;

Aos sempre prestimosos colegas do LDD: Anna Carolina, Juliana, Fernanda Manta, Fernanda Miranda, Jannuzzi, João, Esther, Patricia, Cris, Ana Paula, Yasmin, Vanusca, Saulo, Holly, Márcia e Celso, pela companhia, ajuda e preciosos momentos de descontração;

Ao professor Dr. Antônio Carlos (Acaf), à professora Dra. Márcia e ao professor Dr. Artur Moes, por me ajudarem no universo das imagens digitais; e à Dra. Cláudia Peixoto pelo apoio estatístico;

Ao Dr. Marcelo Weksler e ao Museu Nacional do Rio de Janeiro por cederem material biológico;

À Cecília Cronemberger e ao Parque Nacional da Serra dos Órgãos (ICMBio) por todo suporte logístico, apoio de campo e ajuda com as amostras biológicas;

À Cecilia Dias, à Dra. Marília Barros e ao Centro de Primatologia da UnB pelo apoio e pelas amostras biológicas;

Ao Dr. Pissinatti, à Sílvia Bahadian e ao CPRJ (INEA) por ceder amostras biológicas e fotográficas;

À Cláudia Igayara e sua equipe, e ao Zôo Municipal de Guarulhos pela parceria;

À turma que me ajudou nas coletas do Recife: À Bruna Bezerra; à Maria Clara Feitosa; ao Yuri Valença e sua equipe, e ao Santuário de Animais Silvestres de Recife pelo apoio e permissão de coletas de amostras;

À Juliana da Silva e ao Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, pelas amostras cedidas;

Aos colegas do LEMA (Laboratório de Ecologia de Mamíferos) pela prontidão para qualquer tipo de ajuda;

À profa. Fernanda Barbosa, ao Prof. Daniel e à Universidade Estácio; e a todos aqueles colaboradores que têm enviado fotos georreferenciadas de sagüis na região sudeste;

E finalmente ao apoio incondicional da minha família de sangue e estendida.

RESUMO

CARVALHO, Rodrigo Salles. **Conservação do sagüi-da-serra-escuro – *Callithrix aurita* (Primates)**: uma análise molecular e colorimétrica de populações do gênero *Callithrix* e seus híbridos. 2015. 213 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O sagüi-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*) é um pequeno primata, endêmico das regiões de floresta de altitude da Mata Atlântica do Sudeste do Brasil, e que, além de estar classificado como “em perigo” pela Lista Nacional de Espécies Ameaçadas, tem sido objeto de preocupação adicional por parte dos conservacionistas. A perda de habitat e sobretudo o acelerado processo de invasão do seu território por sagüis de outras espécies, introduzidos pelas ações humanas, tem resultado em extinções locais e/ou no aparecimento de indivíduos híbridos entre o *C. aurita* e seus congêneres. A percepção da rápida expansão destes fenômenos tem demandado estudos que aumentem o conhecimento sobre a espécie nativa e seu relacionamento com o meio ambiente. Os objetivos deste trabalho são: realizar uma revisão sobre as análises moleculares como ferramenta de pesquisa e conservação de primatas, implementar uma caracterização molecular com o uso de marcadores de linhagem (COI e SRY) dos sagüis do gênero *Callithrix* – invasores, híbridos e “puros” – que atualmente ocorrem no Estado do Rio de Janeiro, identificar primatas neotropicais do gênero *Callithrix* com o uso de mini-amplicons de COI em amostras de museu, e realizar uma caracterização colorimétrica dos sagüis-da-serra-escuro, invasores e híbridos presentes na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo através do uso de imagens fotográficas padronizadas. Para isso, além da pesquisa bibliográfica, 121 amostras biológicas foram retiradas de indivíduos de vida livre e de cativeiro, e 16 amostras de diferentes tecidos foram tiradas de 10 espécimes preservados em museus. Imagens fotográficas foram feitas de todos os indivíduos vivos. As análises genéticas usaram os marcadores moleculares COI e SRY, sendo que o COI resultou em 114 sequências de 595 pb e o SRY resultou em fragmentos de 196 pb para *C. aurita* e de 205 pb para as outras espécies. Os mini-amplicons de COI geraram cinco sequências sobrepostas de aproximadamente 200 pb. As análises moleculares revelaram mais haplótipos que as espécies consideradas válidas e comprovaram casos de hibridação em São Paulo, no Rio de Janeiro e em Minas Gerais, sendo que, somente no Rio de Janeiro e em São Paulo, com a espécie nativa. As amostras de museu foram amplificadas com sucesso e a análise colorimétrica separou as três espécies *C. aurita*, *C. jaccus* e *C. penicillata*, mas não conseguir uma identificação exclusiva para os híbridos da espécie nativa.

Palavras-chave: *Callithrix*. Conservação. Sagüi. Citocromo oxidase. SRY. Imagens digitais.

ABSTRACT

CARVALHO, Rodrigo Salles. **Conservation of the buffy-tufted-ear marmoset – *Callithrix aurita* (Primates)**: analyses in molecular biology and colorimetry of populations of the genus *Callithrix* and its hybrids. 2015. 213 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*) is a small primate endemic to the mountainous regions of the South-Eastern Brazilian Atlantic forest. In addition to being classified as "endangered" on the National List of Threatened Species, it has been the subject of particular concern amongst conservationists. Habitat loss and, above all, the rapid invasion of its territory by other species of marmosets introduced by human actions, has resulted in local extinctions and/or the appearance of individuals which are hybrids between *C. aurita* and its congeners. The perception of a rapid increase in these phenomena has necessitated studies to increase our knowledge about native species and their relationship with the environment. Our objectives are: to review molecular analysis as a tool for research on and conservation of primates; to implement a molecular characterization using lineage markers (COI and SRY) of marmosets of the genus *Callithrix* – invaders, hybrids, and "pures" – which are currently taking place in the state of Rio de Janeiro; to identify neotropical primates of the genus *Callithrix* using mini-amplicons of COI in museum samples; and to carry out a colorimetric characterization of the Buffy-tufted-ear marmosets, invaders and hybrids currently present in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Minas Gerais, and São Paulo, through the use of standardized photographic images. For these purposes, in addition to bibliographical research, 121 biological samples have been taken from individuals in the wild and in captivity, and 16 samples of different tissues were taken from 10 specimens preserved in museums. Photographic images were taken of all of the living individuals. The genetic analyses used the molecular markers COI and SRY: the COI resulted in 114 sequences of 595 bp, and the SRY resulted in fragments of 196 bp for *C. aurita*, and 205 bp for other species. The mini-amplicons of COI generated five overlapping sequences of approximately 200 bp. Molecular analysis revealed more haplotypes than are considered valid for the species, and confirmed the cases of hybridization in São Paulo, Rio de Janeiro and Minas Gerais, including hybridization with native species in Rio de Janeiro and São Paulo. The museum samples were successfully amplified, and colorimetric analysis separated the three species *C. aurita*, *C. jaccus*, and *C. penicillata*, but did not provide a unique ID for hybrids of native species.

Keywords: Conservation. Marmosets. *Callithrix*. Cytochrome Oxidase. SRY. Colorimetry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo esquemático mostrando as seis espécies de <i>Callithrix</i>	21
Figura 2 - Distribuição do gênero <i>Callithrix</i> : <i>Callithrix jacchus</i> , <i>C. penicillata</i> , <i>C. kuhlii</i> , <i>C. geoffroyi</i> , <i>C. aurita</i> , e <i>C. flaviceps</i>	22
Figura 3 - Mapa de diferentes tipos de registros de <i>Callithrix aurita</i>	24
Figura 4 - Distribuição e concentração (mais escuro = maior n. de espécies) de espécies de primatas no mundo.	38
Figura 5 - Árvore da família dos primatas e do tempo das separações evolutivas a partir de um ancestral comum a 85 milhões de anos atrás.	39
Figura 6 - Árvore evolutiva dos primatas segundo Perelman <i>et al</i> (2011).	40
Figura 7 - Mapa de distribuição das espécies de primatas e a porcentagem de espécies ameaçadas por região	41
Figura 9 - Mapa das localizações geográficas dos 5 primatas mais ameaçados dos Neotrópicos	43
Figura 10 - Evolução do uso de marcadores moleculares mitocondriais, autossômicos e microssatélites através de quatro décadas.....	48
Figura 11 - Distribuição do número de artigos separados pelo marcador mitocondrial utilizado desde o ano de 1992 até 2015.	49
Figura 12 - Quantidade de artigos produzidos nos últimos 23 anos divididos por tipo de genoma amostrado e por gênero de primatas neotropicais pesquisados.....	50
Figura 13 - Quantidades de artigos publicados divididos pelo tipo de marcadores alvo e pelos temas de discussão deste estudo.	50
Figura 14 - Representação esquemática da molécula de DNA mitocondrial	63
Figura 15 – Eletroferogramas para SRY mostrando <i>C. jacchus</i> e <i>C. penicillata</i> com picos de 205 pb e <i>C. aurita</i> com 196 pb.	72
Figura 16 - Árvore dos haplótipos de <i>Callithrix</i> separados pelas diferenças de nucleotídeos entre os grupos ressaltando transversões, mutações recorrentes, mutações reversas e mutações não sinônimas. Esta árvore mostra a opção de agrupamento pela reversão da base 139 (As áreas das circunferências são proporcionais ao número de indivíduos dentro dos grupos).....	75

Figura 17 - Árvore dos haplótipos de <i>Callithrix</i> separados pelas diferenças de nucleotídeos entre os grupos ressaltando transversões, mutações recorrentes e mutações não sinônimas estão diferenciadas (esta árvore mostra a opção de agrupamento pela recorrência da base 298. As áreas das circunferências são proporcionais ao número de indivíduos dentro dos grupos).	76
Figura 18 - Trecho do alinhamento do haplótipos de CO I.....	77
Figura 19 - Network de distância genética por diferença de nucleotídeos entre 11 haplótipos de <i>Callithrix</i> sp. com referência a um haplótipo de ancestral hipotético (H_1). ...	78
Figura 20 – Árvore (produzida pelo software Geneious 6.0) do marcador COI usando o modelo de Neighbor-Joining e HKY de substituição de nucleotídeos, para 595 pb de 11 haplótipos de <i>Callithrix</i> sp. Os valores sobre os nós representam a porcentagem de 500 repetições do teste de confiabilidade (<i>bootstrap</i>).....	79
Figura 21 - Árvore (produzida pelo software Geneious 6.0) do marcador COI usando o modelo de Neighbor-Joining e HKY de substituição de nucleotídeos, para 595 pb de 11 haplótipos de <i>Callithrix</i> sp. Os valores sobre os nós representam a porcentagem de 1000 repetições do teste de confiabilidade (<i>bootstrap</i>).....	80
Figura 22 - Árvore (produzida pelo software Geneious 6.0) do marcador COI usando máxima verossimilhança e modelo K2P para 595 pb de 11 haplótipos de <i>Callithrix</i> sp. Os valores sobre os nós representam a porcentagem de 1000 repetições do teste de confiabilidade (<i>bootstrap</i>).	81
Figura 23 - Trecho de uma imagem gerada pelo software Geneious mostrando os picos (em azul) dos fragmentos de SRY de 196 pb (<i>C. aurita</i>) e os de 205 pb (demais espécies) gerados pela análise de tamanho de fragmento.....	84
Figura 24 - Sequenciamento (produzido pelo software Geneious 6.0) do marcador SRY mostrando a família mista de sagüis cujo pai (Nog_1) é da espécie <i>C. aurita</i> , e tem a deleção de nove pb, a mãe (Nog_2), que é <i>C. jacchus</i> com a inserção de 9 pb, dois filhos machos (Nog_3 e Nog_4) com o mesma deleção paterna; e uma filha fêmea também com a deleção paterna. As repetições vistas na imagem são réplicas para garantir que não houve erro nas etapas de laboratório.	85
Figura 25 - Mapa sobre a área de ocorrência do <i>C. aurita</i> mostrando os locais de registro do <i>C. aurita</i> isoladamente ou junto a sagüis de outras espécies e/ou híbridos. Pinos representam sagüis genotipados, e círculos representam somente registro fotográfico (de colaboradores – sem captura). Cores: rosa – <i>C. aurita</i> ; amarelo – <i>Callithrix</i> sp. (não-aurita); azul – híbridos (com <i>C. aurita</i>).	89

Figura 26 - Mapa mostrando os locais de registro do <i>C. aurita</i> isoladamente, próximo ou junto a sagüis de outras espécies e/ou híbridos na região serrana onde foram concentradas as capturas. Pinos representam sagüis genotipados, e círculos representam somente registro fotográfico (de colaboradores – sem captura). Cores: rosa – <i>C. aurita</i> ; amarelo – <i>Callithrix</i> sp. (não-aurita); azul – híbridos (com <i>C. aurita</i>).	90
Figura 27 - Conjunto dos 10 primers elaborados para a amplificação de 5 fragmentos intercalados do COI (708 pb) de sagüis.....	109
Figura 28 - Eletroferogramas (produzidos com o software Geneious 6.0) dos sequenciamentos de cada um dos 10 primers (elaborados para a confecção do COI de sagüis) utilizando uma amostra referência de sangue de um indivíduos vivo.....	115
Figura 29 - Alinhamento (produzidos com o software Geneious 6.0) das 10 sequências produzidas com os cinco pares de primers de COI, entre duas sequências de referência de <i>Callithrix aurita</i> (NOG_1) e <i>C. jacchus</i> (BB_7) com tamanho total de 708 pb.....	116
Figura 30 - Detalhe do sequenciamento do segundo fragmento do COI da amostra MN2 (1931) mostrando as bases de diferenciação entre <i>C. aurita</i> e <i>C. jacchus</i> com picos ambíguos.	117
Figura 31 - Árvore gerada usando o modelo de Neighbor-Joining (Jukes-Cantor) (software Geneious 6.0) mostrando os agrupamentos do alinhamento entre as sequências geradas utilizando os pares de primers em amostras de sagüis do Museu Nacional.	117
Figura 32 – Árvore (NJ – K2P) (feita com o software Geneious 6.0) mostrando os agrupamentos das amostras do Museu Nacional que geram sequências comparáveis.	118
Figura 33 - Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro onde ocorreu o maior esforço de captura de animais de vida livre.....	131
Figura 34 - Armadilhas na sede do PARNASO; B – Armadilhas montadas na região periurbana de Nogueira.....	132
Figura 35 - <i>C. aurita</i> sendo fotografado no CPRJ.....	132
Figura 36 - A – Cativeiro, e B - Área de manejo dos sagüis no Centro de Primatologia de Brasília (CP-UnB)	132
Figura 37 – Indivíduos de <i>Callithrix aurita</i> no Zoológico de Guarulhos (SP); B – Sagüis em fase de adaptação para soltura no Santuário dos Três Reinos em Recife (PE)....	133

Figura 38 - Armadilhas com sagüis adaptados à ceva (Juiz de Fora – MG).	134
Figura 39 – Sequência de metodologia desde a observação do sagüi, preparação da armadilha, suspensão da plataforma até a captura de um indivíduo.....	135
Figura 42 - Imagem do programa Fotoshop aberto na foto antes de igualar os valores de R, G e B do padrão cinza-escuro (setas) do ColorChecker.....	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total de Família, Gênero, Espécie e a soma total de primatas nas quatro regiões e a porcentagem de ameaçados.	44
Tabela 2 – Crescimento do número de espécies reconhecidas.....	45
Tabela 3 – Palavras utilizadas na busca (inclusivas) e aquelas utilizadas para excluir artigos não desejados (exclusivas).....	46
Tabela 4 - Quantidade de artigos produzidos nos últimos 24 anos (contados a partir de 1991) relacionados ao marcador molecular mitocondrial utilizado.	48
Tabela 5 - Artigos publicados que usaram marcadores moleculares como abordagem sobre o gênero <i>Callithrix</i>	51
Tabela 6 - Relação dos marcadores moleculares com os temas abordados no conjunto total de estudos sobre primatas.....	52
Tabela 7 – Locais de captura e quantidade de sagüis amostrados.....	60
Tabela 8 - Iniciadores de PCR utilizados na amplificação do fragmento do DNA mitocondrial COI e do fragmento de DNA nuclear SRY usados em amostras de sagüis.....	64
Tabela 9 – Reagentes combinados na preparação do <i>MIX</i> para as reações de PCR dos marcadores de SRY e de COI de sagüis (valores de referência para 1 reação).....	65
Tabela 10 - Condições termocíclicas das PCRs utilizadas neste trabalho.....	65
Tabela 11 – Protocolo para o <i>Mix</i> usado nas reações de sequenciamento.	67
Tabela 12 - Condições termocíclicas para as reações de sequenciamento dos marcadores de mtDNA de sagüis.....	67
Tabela 13 - Resultado das concentrações de DNA de dois sagüis obtidas no NanoDrop a partir de três métodos de extração.....	71
Tabela 14 - Distâncias entre pares de haplótipos em valores absolutos, de diferença nucleotídeos sobre o valor em porcentagem (na metade inferior), e em valores de distância genética segundo o modelo K2P (na metade superior).....	83
Tabela 15 – Tabela das linhagens materna e paterna dos indivíduos por localidade. São mostrados em ordem: o número de ordenação (N), o código de identificação dos indivíduos, a espécie (haplótipo de COI) da mãe, a espécie (haplótipo de SRY) do pai, e o sexo dos indivíduos. Sobre cada tabela é mostrado o nome do agrupamento com referência à localidade de origem. Indivíduos híbridos com <i>C. aurita</i> são vistos nos pares azul /vermelho.....	87
Tabela 16 - Dados da coleta de exemplares de sagüis depositados no Museu Nacional/RJ ..	108

Tabela 17 - Reagentes combinados na preparação do <i>MIX</i> para as reações de PCR dos marcadores de COI de sagüis (valores de referência para 1 reação).	110
Tabela 18 - Condições termocíclicas das PCRs utilizadas neste trabalho.....	110
Tabela 19 - Protocolo para a confecção do <i>Mix</i> para uma reação de sequenciamento.....	111
Tabela 20 - Condições termocíclicas para as reações de sequenciamento dos marcadores de mtDNA de sagüis.....	112
Tabela 21- Características dos iniciadores (primers).	113
Tabela 22- Pares de primers que resultaram em pares de sequências (F e R) limpas para as amostras do Museu Nacional.....	119
Tabela 23 - Localidades onde houve amostragem de sagüis.....	143
Tabela 24 - Tabela de probabilidade de reconhecimento da espécie pela média de azul do recorte fotográfico de um determinado indivíduo.	153
Tabela 25 - Níveis de significância (p) do Teste de Tukey para cada par de fenótipo dentro de cada cor (R, G e B).	158

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AIC	Akayke Information Criterion
B	Blue
COI	Citocromo oxidase unidade I
COII	Citocromo oxidase unidade II
Cyt b	Citocromo b
CPRJ	Centro de Primatologia do Rio de Janeiro
CP UnB	Centro de Primatologia da Universidade de Brasília
DNA	cido desoxirribonucleico
EI	Espécies Exóticas Invasoras
EXO	Exonuclease I
G	Green
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservao da Biodiversidade
IUCN	Uno Internacional para a Conservao da Natureza
K2P	Kimura 2 parâmetros
HKY	Hasegawa, Kishono e Yano
LDD	Laboratório de Diagnóstico por DNA
mtDNA	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ng	nanograma
NJ	Neighbor-Joining
PARNASO	Parque Nacional da Serra dos rgos
PCR	Reao em cadeia da Polimerase
R	Red
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
SAP	Fosfatase Alcalina do camarão
SRY	Região Determinadora do Sexo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
WWF	World Wide Fund for Nature

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	17
1	ANÁLISES MOLECULARES COMO FERRAMENTA DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PRIMATAS: UMA REVISÃO	36
1.1	Introdução	36
1.2	Objetivos	45
1.3	Metodologia	45
1.4	Resultados	47
1.5	Discussão	52
1.6	Conclusão	54
2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SAGÜIS DO GÊNERO CALLITHRIX OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – INVASORES, HÍBRIDOS E “PUROS”	55
2.1	Introdução	55
2.2	Objetivos	59
2.3	Metodologia	59
2.3.1	<u>Referências geográficas</u>	60
2.3.2	<u>Análise Molecular</u>	60
2.3.2.1	Coleta de material biológico	61
2.3.2.2	Extração	61
2.3.2.3	Deteção em gel de agarose	62
2.3.2.4	Amplificação de fragmentos de DNA por PCR	63
2.3.2.5	Amplificação por PCR	64
2.3.2.6	Visualização dos produtos da PCR.....	65
2.3.2.7	Análise por eletroforese capilar de fragmentos e sequências de DNA	66
2.3.2.8	Análise por sequenciamento do marcador COI	66
2.3.2.9	Sequenciamento	67
2.3.2.10	Purificação dos produtos da reação de sequenciamento em resina <i>Sephadex</i> G-50	68
2.3.2.11	Preparação das amostras e eletroforese capilar	68
2.3.2.12	Alinhamento e análise das sequências	69
2.3.2.13	NETWORK e Critério de seleção de modelo (AIC)	70
2.3.2.14	Árvores filogenéticas	70
2.3.2.15	Tabela de identificação de híbridos	70
2.4	Resultados	71
2.4.1	<u>Padronizações laboratoriais</u>	71
2.4.2	<u>Análise do marcador COI para amostras de sagui</u>	73
2.4.3	<u>SRY</u>	83
2.4.4	<u>Análise de linhagem através dos marcadores COI e SRY</u>	85
2.5	Discussão	91
2.5.1	<u>Filogenia – identidade dos grupos</u>	91
2.5.1.1	AURITA	91

2.5.1.2	JACCHUS	91
2.5.1.3	PENICILLATA	92
2.5.1.4	GEOFFROYI	93
2.5.1.5	KUHLII?	94
2.5.1.6	HAPLOTIPO 5_?	95
2.5.1.7	HAPLOTIPO JF_8 e HAPLOTIPO “LORENA”	95
2.5.1.8	Análise de mutação na cadeia de proteína	96
2.5.2	<u>Análise de distâncias genéticas</u>	97
2.5.3	<u>Híbridos e hibridação</u>	101
2.5.4	<u>Conservação</u>	103
2.6	Conclusão	104
3	IDENTIFICAÇÃO DE PRIMATAS NEOTROPICAIS (<i>CALLITHRIX</i> SPP.) COM O USO DE MINI-AMPLICONS EM AMOSTRAS DE MUSEU.	106
3.1	Introdução	106
3.2	Objetivo	107
3.3	Metodologia	108
3.3.1	<u>Alinhamento e análise das sequências</u>	112
3.4	Resultados	113
3.5	Discussão	119
3.6	Conclusão	122
4	CARACTERIZAÇÃO DOS SAGÜIS-DA-SERRA-ESCUROS, INVASORES E HÍBRIDOS PRESENTES NA MATA ATLÂNTICA DO SUDESTE ATRAVÉS DO USO DE IMAGENS FOTOGRÁFICAS DIGITAIS PADRONIZADAS	123
4.1	Introdução	123
4.2	Objetivo	129
4.2.1	<u>Objetivos específicos</u>	130
4.3	Material de métodos	130
4.3.1	<u>Área de Estudo</u>	130
4.3.2	<u>Forma de captura de animais de vida livre</u>	133
4.3.3	<u>Análise colorimétrica das imagens fotográficas</u>	139
4.4	Resultados	143
4.4.1	<u>Resultados sem os híbridos</u>	144
4.4.1.1	Operações com os dados	147
4.4.1.2	Modelo de regressão logística nominal	151
4.4.2	<u>Resultados considerando os híbridos</u>	153
4.4.2.1	Análise das médias R, G e B	153
4.5	Discussão	160
4.5.1	<u>Validação</u>	160
4.5.2	<u>Sem híbridos</u>	160
4.5.3	<u>Com híbridos</u>	166
4.6	Conclusão	168
5	DISCUSSÃO GERAL	169

CONCLUSÃO GERAL	171
REFERÊNCIAS	173
APÊNDICE A – Validação	188
APÊNDICE B – Prancha de Fotos	189
APÊNDICE C – Artigo publicado com parte dos resultados da tese	205
APÊNDICE D – Artigo publicado com parte dos resultados da tese	207
APÊNDICE E - Alinhamento das sequencias de COI (595bp)	210
APÊNDICE F - Tabela das médias de R, G e B relacionadas à origem de linhagem genética	211
APÊNDICE G – Relação entre a referência dada aos indivíduos coletados no CPRJ e seu número de tombo nesta instituição	213

INTRODUÇÃO GERAL

O principal objeto de estudo deste trabalho é a espécie de pequeno primata conhecida popularmente como sagüi-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*) endêmico da Mata Atlântica do sudeste brasileiro que está em risco de extinção pela perda de seu habitat e pela competição e hibridação com outros sagüis trazidos do nordeste e do centro-oeste pelo tráfico de animais.

Contexto global

Vivemos em um mundo cada vez mais preocupado e dedicado às questões ambientais. Muito tem sido falado e escrito sobre a relação muito estreita entre a saúde dos seres-humanos e a saúde dos ecossistemas. O crescimento populacional da nossa espécie implica não só em grandes pressões por causa da ocupação (e destruição) de habitats de outras espécies, mas também por causa do desenvolvimento tecnológico e sua conseqüente apropriação e transformação de recursos naturais — um processo que devolve ao sistema matérias transformadas e poluentes, assim como águas e ares poluídos. Hoje, uma parte crescente da sociedade humana luta para ampliar ações de preservação do meio ambiente e para reverter séculos de uma cultura de exploração que dissociou homem e natureza.

Dois relatórios globais publicados recentemente, por duas das mais representativas instituições da atualidade, a Secretariado da Convenção da Diversidade Biológica (CDB) da Organização das Nações Unidas (ONU), em parceria com a Organização Mundial da Saúde (OMS), e o outro pela Rockefeller Foundation, dos Estados Unidos, em colaboração com a revista Lancet, do Reino Unido, se complementam e sintetizam o atual e vasto conhecimento científico acumulado sobre as relações de saúde e meio ambiente. Esses relatórios apontam que a rápida degradação dos sistemas naturais tem causado a perda da biodiversidade, implicando no declínio de serviços ecossistêmicos no mundo, o que vem comprometendo o fornecimento de água, alimentos e ar limpo. Essa cadeia de eventos, além de representar uma ameaça crescente para a saúde humana, com o

potencial para reverter as conquistas das últimas décadas (como por exemplo, o aumento da expectativa de vida), também compromete a sustentabilidade econômica do planeta (Romanelli *et al.*, 2015; Whitmee *et al.*, 2015).

Um bom exemplo da relação estreita entre sociedade humana e natureza é mostrado por um estudo patrocinado pela WWF (World Wide Fund for Nature) que revela que aproximadamente 1/3 das maiores cidades do mundo (33 em 105) dependem de áreas de proteção ambiental próximas para ter água potável para suas populações (Dudley e Stolton, 2003).

No Brasil, e em particular dentro do que é considerado o bioma Mata Atlântica, hoje vivem 123 milhões de pessoas (67% dos aproximadamente 200 milhões de todo Brasil), cuja qualidade de vida depende da preservação dos ecossistemas florestais remanescentes (MMA, 2010)(SOSMA, 2013), sendo que 21 milhões de hectares de florestas tropicais desaparecem por ano resultando em um grave panorama mundial de fragmentos florestais isolados (Laurance, 1999; Whitmore, 1997) e altos índices de extinção local (Canale *et al.*, 2012).

A importância da preservação da biodiversidade é que, quanto maior a quantidade e diversidade de ramos da árvore da vida, tanto mais garantimos potencial e possibilidades de adaptação ou recuperação de ecossistemas diante de mudanças, sejam elas antropogênicas, climáticas ou estocásticas. A manutenção, portanto, da biodiversidade proporciona não só o funcionamento dos serviços ecossistêmicos que nos beneficiam, como garantem o fluxo desses benefícios para as gerações futuras (Faith, 2015).

Em um recente estudo Ceballos *et al.* (2015) reavaliam estudos anteriores (Frankham, Ballou e Briscoe, 2002) que chegaram a propor que a taxa atual de extinção chegaria ser 1000 vezes maior do que a anterior ao antropoceno. Esses autores afirmam que mesmo com uma avaliação conservadora a taxa de extinção deste último século ainda seria no mínimo 100 vezes maior, e que isso configura que estamos promovendo a sexta extinção em massa desde o surgimento da vida neste planeta, incluindo a própria espécie humana entre as que não tardarão a desaparecer.

A luta pela conservação da natureza aglutina tanto os valores antropocêntricos, que têm no ser humano como beneficiário principal das vantagens de se viver em um ambiente provedor e belo, quanto os valores biocêntricos, que percebem a vida de todo e cada ser vivo (com todo o processo evolutivo que os moldou) como merecedores de terem seus destinos biológicos cumpridos. Cada

projeto, trabalho e estudo voltados para a conservação da natureza compõe um elo de uma corrente que resiste aos avanços do consumo depauperante dos recursos naturais.

Brasil – Mata Atlântica

Originalmente, no Brasil, a Floresta Atlântica cobria uma área de aproximadamente 1.200.000 km² (cerca de 12% do país): atualmente, entretanto, restam apenas uma pequena porção da cobertura original como remanescentes florestais isolados, dispersos em uma paisagem dominada pela agropecuária (Brown e Brown, 1992; Ribeiro *et al.*, 2011).

Embora os remanescentes de Mata Atlântica maiores que três hectares ocupem 12,5% do que foi originalmente à época da chegada dos portugueses, somente alarmantes 8% da área são considerados como grandes e bem conservados o suficiente para a manutenção, a longo prazo, de sua biodiversidade (MMA, 2010; Ribeiro *et al.*, 2009, 2011; SOSMA, 2013)

Existem diferentes estratégias empregadas em ações de conservação e um dos mais renomados trabalhos neste sentido foi o que reconheceu as principais áreas do globo onde se concentram os índices mais elevados de biodiversidade: os “hotspots” (pontos de concentração de diversidade). São 34 “hotspots” que resguardam cerca de 44% das plantas vasculares e 35% dos vertebrados existentes sobre 1,4% da superfície terrestre (Mittermeier *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2000). O *hotspot* Mata Atlântica abriga 185 espécies de vertebrados ameaçados de extinção e programas de conservação destas espécies são também estratégias fundamentais na luta de preservação desse vital ecossistema.

Primatas

A Mata Atlântica abriga 15 espécies e 24 subespécies de primatas, dos quais 80% são endêmicas (Rylands, Mittermeier e Rodriguez-Luna, 1997; Rylands *et al.*,

1996; 2000; Chiarello, 2003). Os primatas nativos, em seus respectivos ecossistemas, fazem parte integrante e fundamental para o equilíbrio e manutenção de seus habitats, em particular como dispersores de sementes, entre outras funções (Chapman e Onderdonk, 1998). Primatas neotropicais são especialmente afetados pela perda de florestas uma vez que eles são essencialmente arborícolas (Chiarello e Melo, 2001) e, se consideramos que, para a maioria das espécies de mamíferos, apenas reservas maiores que 20.000 ha podem sustentar populações suficientemente grandes para escapar de extinção em longo prazo (Chiarello e Melo, 2001; Chiarello, 1999, 2000) e que, de todas as reservas biológicas e parques naturais da Mata Atlântica brasileira, apenas cerca de 20% têm mais que 20.000 ha (IBGE, 1993), a situação específica dos primatas neotropicais evidencia-se bastante crítica.

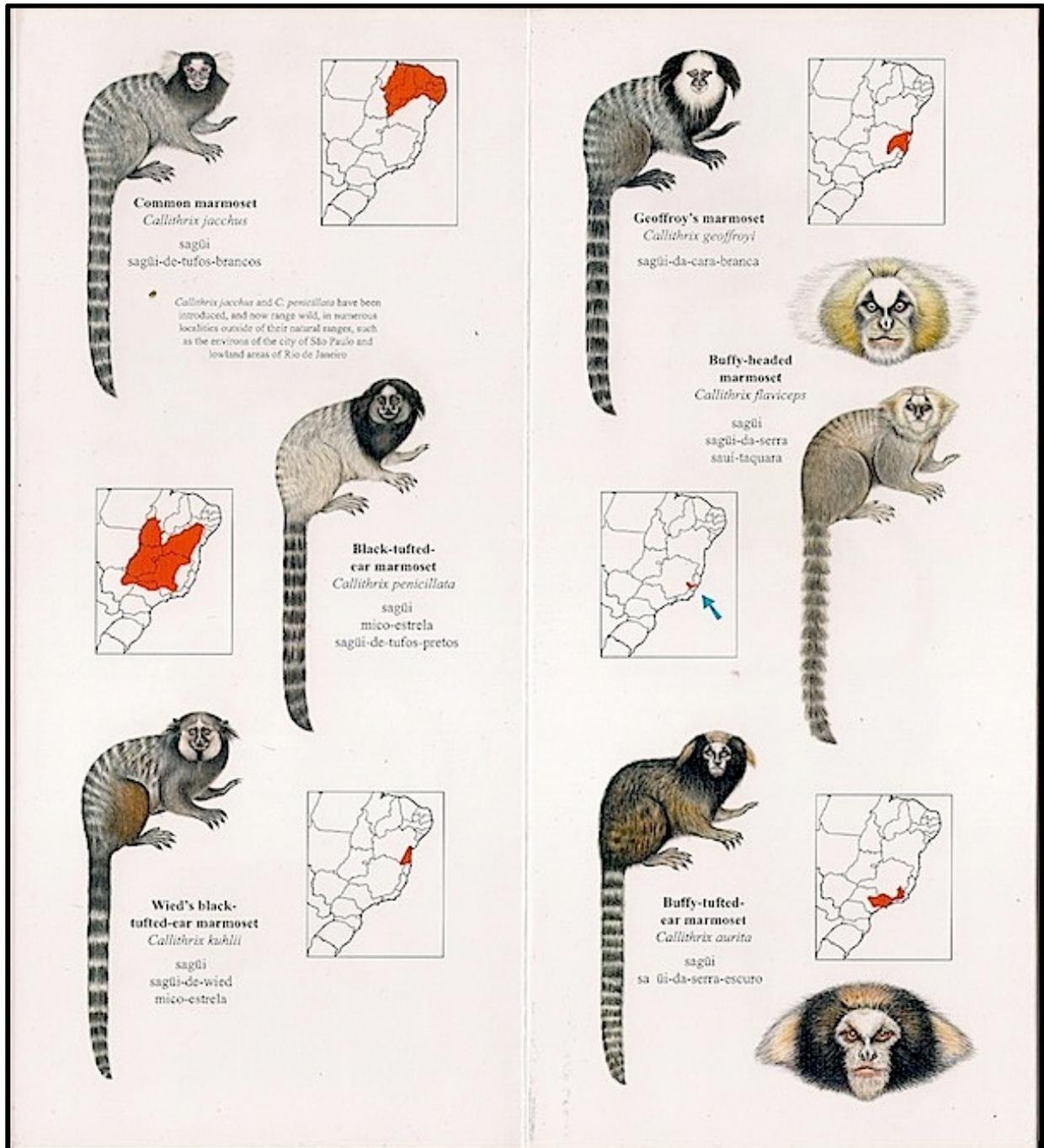
Hoje, a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2012) cataloga, entre as 420 espécies do mundo, 206 espécies de primatas divididos nas categorias *vulnerável* (VU), *em perigo* (EN) e *criticamente em perigo* (CR), sendo o número de espécies para cada categoria 79, 85 e 42 respectivamente. Estes dados, divididos por regiões, mostram o número de 57 espécies ameaçadas para a América do Sul, sendo que no Brasil são 32.

O gênero *Callithrix*

O gênero *Callithrix* pertencente à família Callitrichidae, segundo Rylands *et al.* (2000), possui seis espécies de pequenos primatas (Figura 1), todas endêmicas da parte leste e centro do Brasil, abaixo da Amazônia (Figura 2): *Callithrix aurita* (É. Geoffroy in Humboldt, 1812); *C. flaviceps* (Thomas, 1903); *C. geoffroyi* (É. Geoffroy in Humboldt, 1812); *C. kuhlii* (Coimbra-Filho, 1985); *C. penicillata* (É. Geoffroy, 1812) e *C. jacchus* (Linnaeus, 1758).

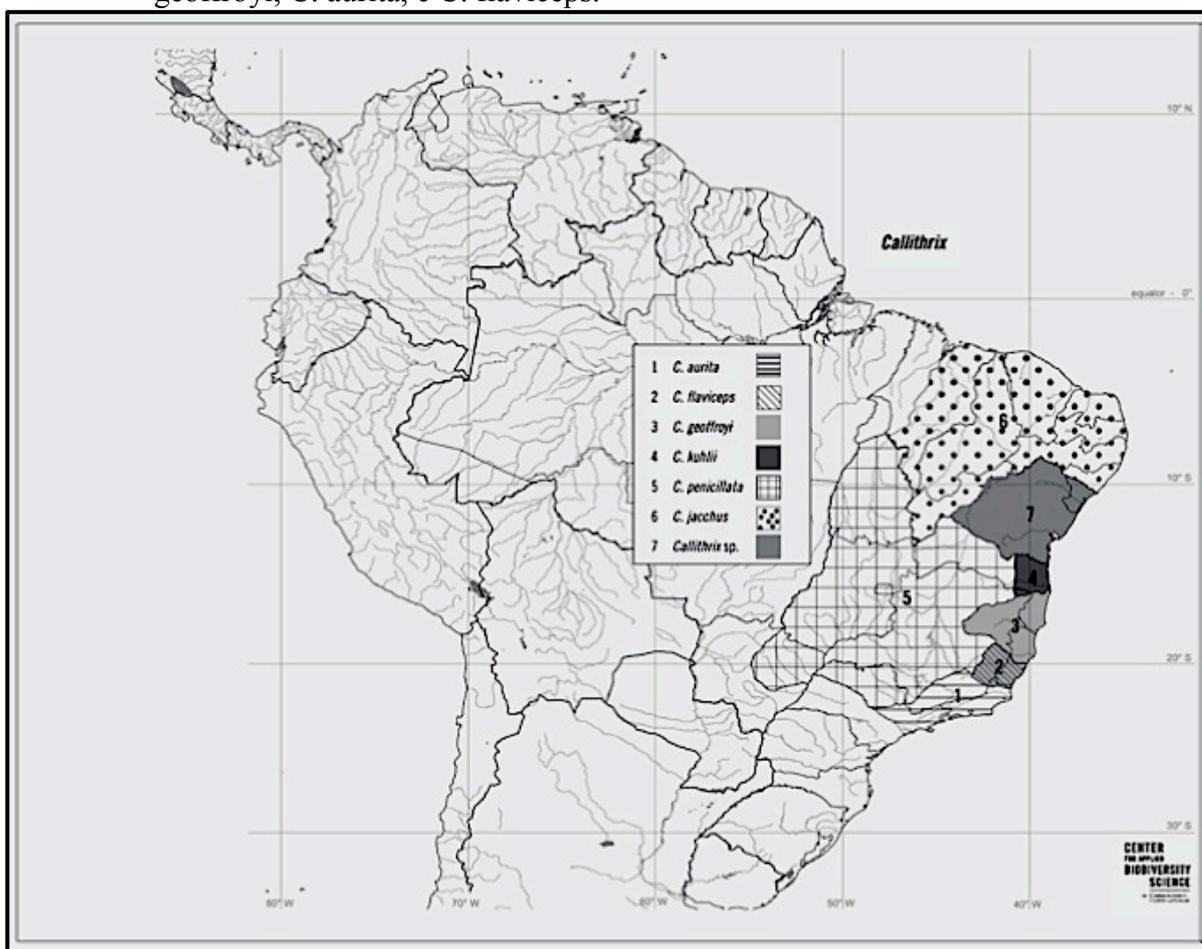
As espécies *C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi* e *C. kuhlii* ocorrem exclusivamente na Mata Atlântica, enquanto *C. jacchus* ocorre na Mata Atlântica e Caatinga, e *C. penicillata*, na Caatinga e Cerrado (Coimbra-Filho, 1990) (Figura 2).

Figura 1 – Modelo esquemático mostrando as seis espécies de *Callithrix*



Fonte: Conservation International

Figura 2 - Distribuição do gênero *Callithrix*: *Callithrix jacchus*, *C. penicillata*, *C. kuhlii*, *C. geoffroyi*, *C. aurita*, e *C. flaviceps*.



Fonte: Rylands, Coimbra-Filho e Mittermeier, 2009.

Os indivíduos deste gênero, conhecidos como sagüis têm porte pequeno com peso variando de 300 a 450g (Stevenson e Rylands, 1988). Têm incisivos inferiores adaptados a perfuração de árvores gomíferas e são considerados espécies flexíveis ecologicamente, ocupando florestas primárias e secundárias, habitats de borda, florestas de galeria e clareiras nos três biomas: Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (Rylands, 1996). A proporção de cada item na dieta das espécies do gênero *Callithrix* varia conforme a disponibilidade e a qualidade do habitat, mas é principalmente composta por frutos, insetos, e exsudatos de plantas, podendo também apresentar pequenos vertebrados, néctar, ovos de aves, flores, sementes, e fungos (Castro, 2003; Côrrea, Coutinho e Ferrari, 2000; Corrêa, 1995; Raboy, Canale e Dietz, 2008).

O cuidado cooperativo da prole é uma característica deste gênero que é incomum entre os demais primatas (Digby e Barreto, 1993). Rylands e Faria (1993) dividem as espécies desse gênero em três grupos ecológicos:

- *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* vivem em habitats menos produtivos, usam área de vida menor, ocorrem em florestas semidecíduas, e florestas de planície costeira, sendo os mais especializados e dependentes de árvores gomíferas;
- *C. kuhlii* e *C. geoffroyi* que ocorrem florestas de vegetação Baixo Montana e planície costeira, e têm um grau intermediário de gomivoria;
- *C. aurita* e *C. flaviceps* que vivem em florestas tropicais de fisionomia Montana e Baixo Montana, têm áreas de vida maiores e são altamente frugívoros, reflexo da abundância de frutos destas regiões, sendo que são pouco adaptados para usar goma como alimento.

Sagüi-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*)

O *Callithrix aurita* é uma espécie de primata de pequeno porte endêmico da Mata Atlântica do sudeste brasileiro, sendo encontrado sobretudo em altitudes acima de 700 metros (Auricchio, 1995; Bernardo e Galetti, 2004; Coimbra-Filho, 1983, 1991; Grelle e Cerqueira, 1999; Mello, 1999; Mendes, 1997; Rylands e Chiarello, 2003; Rylands *et al.*, 2010; Rylands, 1993, 1994; Stevenson e Rylands, 1988)

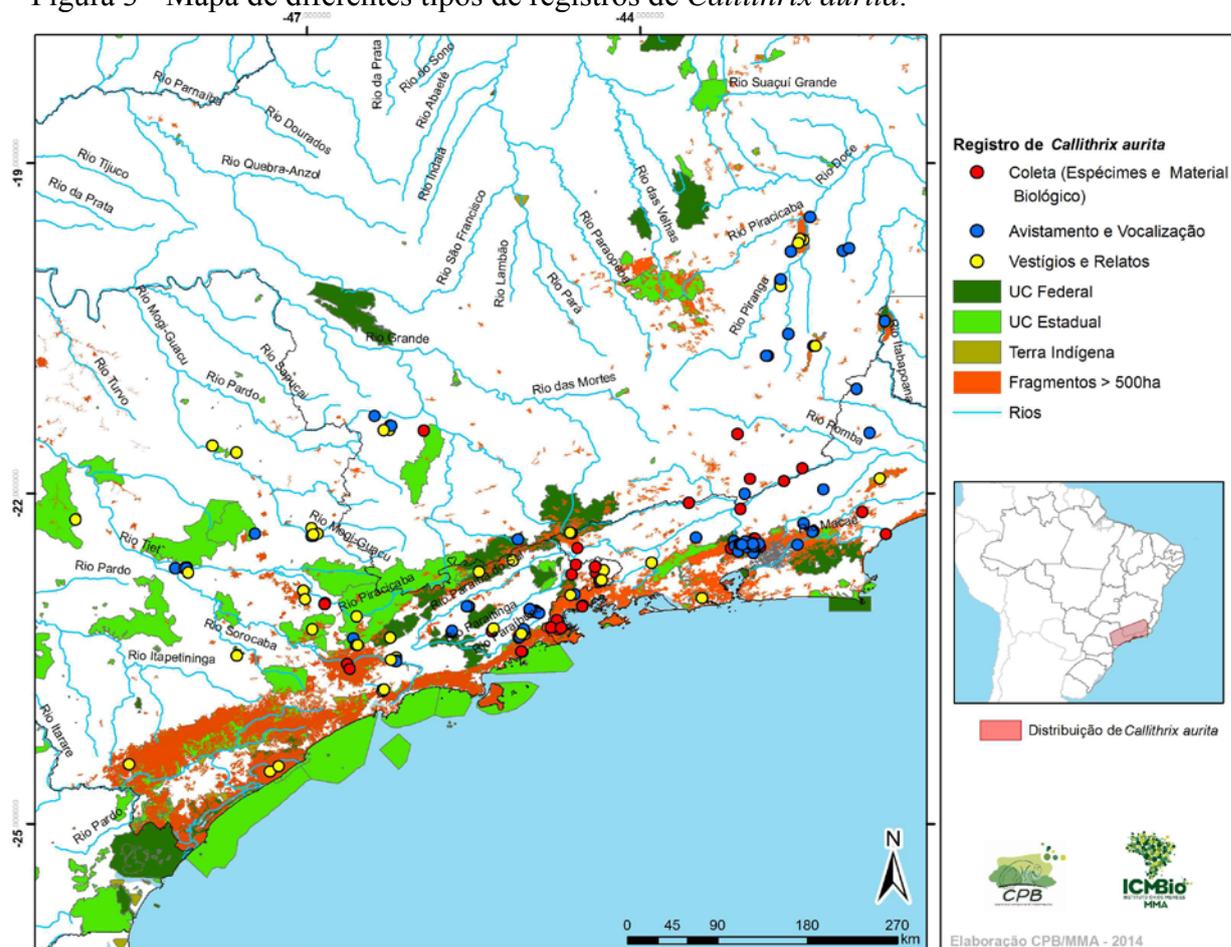
O *C. aurita* é o único que apresenta a região dorsal sem listras, com coloração que varia de tons pardacentos avermelhados ao inteiramente negro, sendo bem mais escuro do que *C. flaviceps* (seu congênere mais próximo) (Coimbra-Filho, 1990; Melo e Rylands, 2008). Apresenta uma máscara brancacenta distinta na face, com a presença de tufos intra-auriculares de cor clara (branco ou amarelado), afunilados em forma de cone, semelhantes aos de *C. flaviceps* (Melo e Rylands, 2008), e a cauda com anéis alternados em cinza e preto (Coimbra-Filho, 1990) (Figura 1).

O limite de distribuição geográfica da espécie, ao norte, parece ser o rio Piracicaba, em Minas Gerais, junto a sua foz com o rio Doce. A oeste, o *C. aurita* parece ocorrer nas áreas de transição com o Cerrado em São Paulo e até a Serra do

Espinhaço em Minas Gerais. A leste, a espécie se distribui até as partes superiores das encostas da serra do Mar, no Rio de Janeiro; ao sul do Estado, contudo, *C. aurita* pode ser encontrado quase ao nível do mar. A espécie também aparece ao norte da cidade de Campos dos Goytacazes (RJ), em regiões florestais de encosta, muitas vezes inferiores a 300 m de altitude (Melo e Rylands, 2008; Melo *et al.*, 2005). O limite ao sul é incerto; o maciço de Paranapiacaba (SP), pode abrigar populações (Melo & Rylands, 2008). Aparentemente, sua distribuição avança pela margem sul do rio Tietê, sem definição exata de seu limite, aparentemente mais ecológico do que geográfico (Hershkovitz, 1997; Mendes, 1997b; Olmos e Martuscelli, 1995).

Estudos mais recentes registraram *C. aurita* no noroeste do Estado do Rio de Janeiro em partes do Cerrado e Mata Atlântica em São Paulo e em áreas do sul e sudeste de Minas Gerais (Bechara, 2012; Bernardo e Galetti, 2004; Norris *et al.*, 2011; Oliveira, 2012; Silva *et al.*, 2015) (Figura 1).

Figura 3 - Mapa de diferentes tipos de registros de *Callithrix aurita*.



Fonte CPB/MMA, 2014.

Grelle e Cerqueira (2006) postulam sobre o fator climático como limitante da distribuição espacial desta espécie. Bechara (2012), em seu estudo de modelagem aponta a “sazonalidade da temperatura” como a variável que mais influenciou a distribuição da espécie. Através de pesquisa em literatura e buscas em registros de museus, Brandão e Develey, (1998) afirmaram que a espécie pode ocorrer em altitudes com variação de 100 a 1375m; contudo, Norris *et al.* (2011) encontraram uma forte associação de adequação de habitat para a espécie para as altitudes entre 608 e 1023 m, e para altitudes acima de 800 metros nas Serras do Mar e da Mantiqueira no trabalho de Bechara (2012).

Em termos de fisionomia vegetal, as Florestas Montanas com canópia em torno de 15m, e sub-bosque denso com emaranhados de lianas ou bambus foram descritos por Olmos e Martuscelli (1995) como o habitat preferencial de *Callithrix aurita*, em florestas primárias e secundárias.

Os hábitos alimentares do gênero *Callithrix* inclui frutos, flores, sementes, fungos, exsudatos vegetais (também chamados de goma) e presas animais (alguns invertebrados e pequenos vertebrados), uma dieta denominada de frugívora-insetívora-gomívora (Côrrea, Coutinho e Ferrari, 2000; Martins e Setz, 2000).

Em relação à área de vida desta espécie Corrêa (1995) propôs 35,3 ha depois de um estudo de dois anos acompanhando um grupo de 6 a 11 indivíduos no Parque Estadual da Serra do Mar em São Paulo. Martins (1998) sugere 16, 5 ha em um estudo de quatro indivíduos em um fragmento florestal com 17 hectares no Estado de Minas Gerais. Rylands e Faria (1993) referenciando Torres de Assumpção (1983) aponta mais de 11 a 16 ha como área de uso em um estudo no Estado de São Paulo.

Embora até recentemente classificada como “vulnerável” pela Lista de espécies ameaçadas de extinção do Estado do Rio de Janeiro (Bergallo et al., 2000) e pela Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (Rylands e Chiarello, 2003; Melo e Rylands, 2008), esta espécie hoje tem o status de “em perigo” (EN) pela "Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2014).

“*Callithrix aurita* é endêmica à Mata Atlântica do sudeste, com distribuição concentrada na Serra do Mar e entorno. Infere-se que a espécie está sofrendo uma redução populacional de pelo menos 50% em um intervalo de 18 anos (três gerações) devido à perda e fragmentação

de habitat e, principalmente, à competição e hibridação com espécies invasoras, que estão ampliando sua distribuição. Sendo assim, a espécie foi categorizada como Em Perigo (EN) A3ce + 4ce.”.

Esta espécie já vem sendo alvo da preocupação em relação ao seu desaparecimento de longa data e há décadas está classificada como ameaçada de extinção (Coimbra-Filho, 1983; Mittermeier e Coimbra-Filho, 1981; Rocha *et al.*, 2004) e já foi considerada como aparentemente extinta no Estado do Rio de Janeiro (Coimbra-Filho, 1991; Mittermeier e Coimbra-Filho, 1981). Apesar disso, a espécie ainda perdura neste Estado, segundo Pereira (2006), o *C. aurita* está certamente em um estágio crítico de risco de extinção no Estado do Rio de Janeiro, haja vista o avançado processo de invasão pelos congêneres *C. jacchus*, *C. penicillata* e os híbridos dentro de sua região de ocorrência.

Espécies invasoras

Os problemas causados pelas “espécies invasoras” – na maioria das vezes espécies que rompem suas barreiras naturais em consequência de ações humanas – chegaram a tamanhas proporções de impacto, tanto para os interesses sociais como ambientais, que, hoje, ocupam grandes espaços em organismos e discussões internacionais. Uma quantidade expressiva de trabalhos científicos já foi publicada direta e indiretamente relacionada a este assunto.

O conceito de espécies exótica invasora (EEI) é atribuído à espécies ou subespécies que foram levadas (introduzidas) para além de sua área de distribuição natural, para outros ecossistemas, onde geram algum grau de ameaça à biodiversidade nativa local (Brand e Matthews, 2005; IUCN, 2000; Ziller e Galvão, 2002). O rompimento de limites biogeográficos provocado pelo relativamente recente e generalizado transporte de espécies causou rápida e radical mudança nas comunidades biológicas, incluindo múltiplas extinções (Veitch e Clout, 2002). Os efeitos de espécies exóticas invasoras sobre a biodiversidade foi descrito como "imenso, insidioso e geralmente irreversível" (IUCN, 2000).

Segundo Mack *et al.* (2000) não há dúvida de que as espécies invasoras podem causar graves danos econômicos e ecológicos. Elas podem, em breve, superar a perda do habitat como a principal causa de deterioração ecológica em termos globais (IUCN, 2000; Vitousek *et al.*, 1997) e são, provavelmente, já a causa principal de extinções em ecossistemas insulares (Veitch e Clout, 2002)

As invasões bióticas hoje alteram as comunidades naturais do mundo e as suas características ecológicas a um ritmo sem precedentes e quanto mais demore ou se evite implementar estratégias eficazes para reduzir os impactos prejudiciais de espécies invasoras, tanto maior o risco de empobrecer e homogeneizar notavelmente os ecossistemas (Mack *et al.*, 2000). Pimentel *et al.* (2000) estimam que cerca de 42% das espécies classificadas como ‘ameaçadas’ ou ‘em perigo’ de extinção, estão em risco por causa de espécies introduzidas. Outros autores mostram números menores afirmando que entre as espécies da fauna e da flora em risco de extinção, aproximadamente 18% são ameaçadas por espécies invasoras (Morsello, 2001; Pough, Janis e Heiser, 2003). Menores, mas não menos impactantes, se constituindo-se na segunda maior causa de perda de biodiversidade no mundo (Brand e Matthews, 2005; Pough, Janis e Heiser, 2003)

Trabalhos realizados por autores como (Simberloff, 2003; Genovesi e Bertolino, 2001) demonstram que quanto mais demorada a decisão para eliminar a espécie invasora maior a dificuldade em tornar esta ação efetiva, devido à evolução do processo de invasão, sugerindo que atitudes neste sentido devem ser avaliadas rapidamente, para evitar o agravamento e diversas dificuldades posteriores. Zalba (2005) e Zalba e Ziller (2007) apontam que as ações voltadas para a conservação da biodiversidade não podem esperar até que se tenha um completo conhecimento dos fatores vinculados a cada situação e, tampouco, o de suas relações precisas. A extensão dos impactos causados pela espécie humana sobre a biodiversidade e a urgência em agir compelem a que pressupostos imprecisos sejam sancionados e que alternativas sejam postas em prática na corrida para salvar o máximo possível do nosso patrimônio natural e evolutivo (Forest *et al.*, 2015).

Veitch e Clout (2002) consideram que a opção de erradicar uma espécie invasora, quando isso é viável, é bem mais aceitável do ponto de vista de uma ética ambiental do que um controle em longo prazo, onde toxinas, armadilhas e caça com armas podem causar muito mais sofrimento e mortes, além de representar um risco maior para o meio ambiente. Estes autores lembram que os mamíferos, quando

espécies invasoras, estão entre os mais devastadores e também os mais fáceis de erradicar.

A Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica (CDB) afirma que os países signatários desta convenção devem:

“Envolver proativamente as partes interessadas, comunidades indígenas e locais na erradicação, a prevenção de introduções, e atenuação do impacto de espécies exóticas invasoras, incluindo ações de sensibilização e formação, bem como a concepção e implementação de medidas de incentivo adequadas" (CDB, 2004).

Em estudos recentes (Simberloff, 2014, 2015) sumarizam uma “explosão” de estudos demonstrando os danos que as espécies invasoras causam por predação, competição, parasitismo, infecção e hibridação sobre as espécies nativas, e ainda outros que revelam impactos mais generalizados em populações, comunidades e ecossistemas. O autor afirma que os últimos 25 anos de crescentes estudos nesta área demonstram que os impactos são inúmeros e, frequentemente, de enorme importância ecológica e econômica. Além disso Simberloff (2014, 2015) atesta que as metodologias de combate às espécies invasoras tiveram grande avanço e têm garantido muitos casos de sucesso, fazendo valer o esforço, sendo que os maiores impedimentos não são científicos ou tecnológicos e sim políticos e econômicos.

A Mata Atlântica tem sofrido com diversos casos de introdução de espécies exóticas que se tornam ameaças a outras espécies e ao ecossistema como um todo, e primatas estão entre essas espécies introduzidas na Mata Atlântica (Carvalho *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2005; Nunes, 2015; Oliveira e Grelle, 2012; Olmos e Martuscelli, 1995; Pereira, 2010; Rocha *et al.*, 2003). O grande desenvolvimento das rodovias e dos transportes iniciados na década de 20 e intensificados nas décadas seguintes aumentou significativamente o tráfico de animais silvestres, entre eles os de sagüis que foram continuamente trazidos de outras regiões do Brasil para serem vendidos ou presenteados na região sudeste. Atualmente, essas espécies estão ampla e notadamente disseminadas nesta região, onde são vistas tanto nas florestas como nas regiões urbanas. (Auricchio, 1995; Brandão e Develey, 1998; Carvalho *et al.*, 2013; Cerqueira, Marroig e Pinder, 1998; Codenotti e Silva, 2004; Coimbra-Filho, 1990;

Malukiewicz *et al.*, 2014, 2015; Nunes, 2015; Paula *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2003; Ruiz-Miranda *et al.*, 2000; Rylands e Chiarello, 2003; Rylands, 1994a; b; Stevenson e Rylands, 1988).

As espécies de sagüis introduzidos que foram marcadas e repetidamente reconhecidas nos estados do sudeste foram o *Callithrix jacchus* (sagüi-do-tufo-branco) e o *C. penicillata* (sagüi-do tufo-preto). Estas espécies são consideradas generalistas, isto é, têm hábitos flexíveis e adaptáveis, tanto para obtenção de alimentos, como para ambientação a novos habitats (Begotti e Landesmann, 2008; David, 2005; Lyra-Neves *et al.*, 2007; Melo-Júnior e Zara, 2007; Miranda e Faria, 2001; Modesto e Bergallo, 2008; Pontes *et al.*, 2007; Silva, Alvarenga e Boere, 2008; Vilela e Faria, 2002) e por isso têm um enorme potencial invasor (Bovendorp e Galetti, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Guerra, Takase e Santos, 1998; Padrone, 2004; Passamani *et al.*, 1997; Ruiz-Miranda *et al.*, 2000; Soraia e Castro, 2003), competindo, expulsando, hibridizando e potencialmente transmitindo doenças para espécies nativa *C. aurita* (sagüi-da-serra-escuro) nos nichos de maior altitude (Pereira, 2010; Carvalho *et al.*, 2013, Nunes, 2015), ou nas áreas de baixada, ameaçando outro primata nativo, de outro gênero mas da mesma família (Callitrichidae), o mico-leão-dourado – *Leontopithecus rosalia* – (Morais Jr., 2010; Morais Jr. *et al.*, 2008; Moura-Britto e Patrocínio, 2005; Pereira, Oliveira e Ruiz-Miranda, 2008; Ruiz-Miranda *et al.*, 2006).

Hibridação

Hibridação é um fenômeno particularmente controverso, uma vez que é considerado tanto como uma ameaça capaz de comprometer a adaptabilidade de populações “puras” dentro do seus ecossistemas, como também é vista como fonte de introdução e enriquecimento da variabilidade genética, com capacidade para recuperar o potencial evolutivo de espécies geneticamente depauperadas. A hibridação e introgressão (assimilação de genes de outra espécie através de cruzamentos e retrocruzamentos com indivíduos vindos de outra espécie) permitem um aumento da diversidade genética através da produção de novos genótipos recombinantes, provavelmente mais rapidamente do que é possível através do

processo proveniente das mutações. Teoricamente aumentar os níveis de variabilidade poderia permitir que os seres vivos se adaptassem às mudanças ambientais com mais facilidade, podendo surgirem novas espécies a partir dos híbridos, levando a um aumento das taxas de evolução (Dowling e Secor, 1997).

Por outro lado a hibridação também é vista como um fator degenerador de complexos de genes coadaptados e especializados através de longos períodos evolutivos, o que rapidamente produziria populações com baixa adaptabilidade. Até recentemente, este fenômeno era tido como marginal no contexto da evolução animal; contudo, os estudos de genética molecular realizados nas últimas duas décadas têm revelado que introgressão e especiação de híbridos são mais comuns do que se imaginava (Zinner, Arnold e Roos, 2011a). De acordo com (Mallet, 2005), pelo menos 25% de espécies de plantas e 10% de espécies de animais, sobretudo das espécies mais recentes, estão envolvidos em processos de hibridação e de introgressão potencial com outras espécies.

A hibridação natural ocorre em todos os principais clados de primatas (prossímios, társios, primatas do Novo Mundo, primatas do Velho Mundo), e mesmo para a linhagem humana, a hibridação tem sido sugerida como um importante mecanismo de evolução (Zinner, Arnold e Roos, 2011a).

A hibridação também faz parte dos eventos transformadores do meio ambiente que têm aumentado dramaticamente, promovida pelas ações humanas (como translocações e mudanças no habitat) em todo o mundo. Contudo, como a hibridação natural tem sido avaliada como um fator evolutivo importante em animais e plantas, é crucial, para fins de conservação, determinar as origens antropogênicas deste fenômeno (Allendorf *et al.*, 2001). Detwiler, Burrell e Jolly (2005), a partir de uma revisão de casos de hibridação em primatas da subfamília cercopithecinae, apontam que, contrariamente senso comum, os seres humanos também têm eliminado, pelo menos tantas zonas de hibridação natural quanto as artificiais que eles criaram.

Interpretar a importância e significância evolutiva da hibridação e determinar o papel de populações híbridas em projetos de conservação é uma tarefa extremamente complexa e subdimensionada (Allendorf, 2001). Este autor afirma que os eventos de hibridação promovidos pelas crescentes ingerências humanas têm causado a extinção em vários grupos taxonômicos (espécies, subespécies e populações com adaptações locais), tanto por substituição da espécie nativa, como pela mistura genética. Alguns autores apontaram que populações pequenas são

particularmente vulneráveis tendendo a desaparecer se seus indivíduos hibridassem extensivamente com o congênere mais abundante (Rhymer e Simberloff, 1996) (Allendorf *et al.*, 2001) (Sakai *et al.*, 2001).

Harbicht, Wilson e Fraser (2014) mostra um estudo onde uma população (peixes) híbrida foi testada adaptativamente ao longo do tempo, afirmando que depois de cinco a onze gerações os genes “invasores” foram removidos da população. Este estudo salienta a importância das espécies locais (e seus genes) co-adaptadas através da escala temporal evolutiva, à diversidade de ambientes gerados pelas inúmeras forças do tempo geológico.

Diversidade filogenética é uma denominação para os braços da árvore da vida pacientemente e laboriosamente desenhados pela não intuitiva escala temporal evolutiva de milhões de anos. A diversidade filogenética considera que o comprimento de cada braço desta “árvore” representa um tempo de caminhada exclusiva de cada táxon e, juntos, representam a biodiversidade global em seus momentos específicos através das eras.

Quanto maior o comprimento de um braço da árvore maior o isolamento e diferencial deste grupo taxonômico e, portanto, maior a perda de distinção em biodiversidade no caso de extinção deste braço. Perde-se o raro e insubstituível. Esta linha de raciocínio que levou a elaboração do conceito de unidades evolutivamente significantes (ESU na sigla em inglês), onde os taxa mais isolados merecem prioridade quando avaliadas ações de manejo e conservação (Ryder, 1986; Vogler e Desalle, 1994). O mesmo raciocínio funciona para os casos de hibridação – quanto maior a distância filogenética das espécies envolvidas, maior a diferença da mistura e maior a descaracterização da espécie localmente adaptada (nos casos de introgressão).

Coimbra-Filho, Pissinatti e Rylands (1993) testaram casos de hibridação entre as espécies do gênero *Callithrix* em cativeiro comprovando a fertilidade das proles. Os primeiros registros de hibridação entre as espécies do gênero *Callithrix* de vida livre, foram observados em grupos híbridos de *C. flaviceps* X *C. aurita* (Ferrari e Mendes, 1991, *apud* Coimbra-Filho *et al.*, 1993); *Callithrix geoffroyi* X *C. penicillata*; *C. kuhlii* X *C. penicillata*; *C. penicillata* X *C. jacchus*; *C. flaviceps* X *C. geoffroyi*, (Hershkovitz, 1977, *apud* Coimbra-Filho *et al.*, 1993). Nos limites de distribuição das espécies (sendo áreas de transição ou não) são encontrados grupos híbridos, (Coimbra-Filho *et al.*, 1993), assim como nas áreas de introdução de uma,

ou ambas, as espécies (Coimbra-Filho *et al.*, 1993; Pereira, 2010; Carvalho *et al.*, 2013; Malukiewicz *et al.*, 2014).

Relatos de hibridação entre *C. aurita* e *C. penicillata* foram feitos nos estados do Rio de Janeiro (Pereira, 2006, Carvalho *et al.*, 2013; Malukiewicz *et al.*, 2014, Detogne 2015), de São Paulo (Mendes, 1997a) e de Minas Gerais (Melo e Rylands, 2008), aparentemente relacionados à introduções frequentes e recorrentes causadas por interferência antrópica.

A grande capacidade generalista e competitiva dos sagüis invasores quanto ao habitat e recursos alimentares (Guerra *et al.*, 1998; Miranda e Faria, 2001; Vilela e Faria, 2002) combinada com a raridade e a baixa densidade populacional descrita para *C. aurita* (Cosenza e Melo, 1998; Coutinho, 1996; Rylands, 1994a), representa um fator de alto risco para a diminuição das já reduzidas e evolutivamente independentes populações de *C. aurita* no Estado do Rio de Janeiro (Pereira, 2006; Cunha, 2007; Detogne 2015).

Buscando responder ao questionamento recorrente sobre a possibilidade de hibridação natural entre sagüis, Cerqueira, Marroig e Pinder (1998) afirmam que na área de ocorrência do *C. aurita*, a hipótese de dispersão natural das espécies – *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* – foi considerada improvável. A primeira, oriunda da Mata Atlântica do nordeste, teria como muito improvável a possibilidade de dispersão por vias naturais até o sudeste e, a segunda, apesar de ser oriunda das matas de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, regiões bem mais próximas, teria que atravessar grandes áreas descontínuas, que funcionaram historicamente como uma barreira de dispersão (Morais Jr. *et al.*, 2008).

Genética da conservação

A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), reconhece a variabilidade genética como um dos três níveis (genética, espécies e ecossistemas) fundamentais da biodiversidade, e considera crucial sua conservação. A genética da conservação atua como uma ciência fundamental para o manejo de populações pequenas maximizando a retenção de diversidade genética e minimizando a endogamia; também é uma parte importante para a resolução de incertezas

taxonômicas e delimitação de linhagens evolutivas prioritárias para manejo; e ainda, através de suas análises moleculares ajuda na compreensão da biologia das espécies e na resolução de problemas forenses. Assim como outros componentes da biologia da conservação, a genética da conservação tem como motivação reduzir a taxa atual de extinção e preservar a biodiversidade (Frankham, 1995).

As ferramentas proporcionadas pelo avanço das tecnologias em biologia molecular vêm aumentando enormemente a quantidade e qualidade de dados do universo da genética capazes de desvendar incertezas em inúmeras áreas da biologia. Dentro do escopo deste estudo, essas ferramentas ajudam a identificar as espécies envolvidas, permitem reconhecer os casos de hibridação e introgressão, e colaboram na distinção de linhagens e dos caminhos evolutivos destas espécies.

Os genes mitocondriais, em particular, servem como marcadores moleculares eficientes para filogenias, e outros estudos, uma vez que têm um elevado número de cópias por célula (o que ajuda a extrair DNA mesmo de amostras muito pequenas ou degradadas), sofrem uma acumulação rápida de mutações (que são as marcas das diferenças entre indivíduos e grupos), não possuem introns, têm uma taxa de recombinação menosprezável e têm herança haplóide (Avice, 1989). Usando dados do marcador molecular mitocondrial citocromo-b de espécies irmãs de mamíferos reconhecidas por estudos morfológicos clássicos, Baker e Bradley (2006) estimaram o número de grupos filogenéticos que existem dentro das espécies de mamíferos, levantando a hipótese de que há mais de 2000 espécies crípticas atualmente não reconhecidas de mamíferos. Esses autores afirmam que tal subestimação afeta significativamente as conclusões sobre a natureza da especiação em mamíferos, assim como sobre os obstáculos associados com a evolução do isolamento genético, sobre as estimativas de biodiversidade, sobre a concepção de iniciativas de conservação, zoonoses, e assim por diante.

Alguns estudos utilizando marcadores moleculares foram realizados sobre o gênero *Callithrix*, considerando temas como filogenia, filogeografia e hibridação, (Schneider *et al.*, 2012; Sena *et al.*, 2002; Tagliaro *et al.*, 1997), contudo, nenhum voltado particularmente para a espécie nativa da Mata Atlântica do sudeste brasileiro: o *C. aurita*

A coexistência das três espécies referidas de primatas na região serrana do estado do Rio de Janeiro, local de ocorrência natural da espécie ameaçada do *C. aurita*, origina questões que exigem um conhecimento tanto sobre o impacto das

espécies invasoras como sobre os aspectos que identificam e caracterizam as espécies assim como o nível de envolvimento entre elas.

O estudo em genética molecular de populações que se encontram dentro e ao redor das áreas de ocorrência do *C. aurita* é uma ferramenta fundamental para gerar dados essenciais (sobre hibridação, origem filogenética, diversidade genética, entre outros) que servirão como base de programas de manejo destes primatas e dos parques em que se encontram.

Imagens fotográficas

Em busca de evitar a extinção do *Callithrix aurita*, alguns biólogos e instituições têm juntado esforços para implementar um projeto de conservação para esta espécie, mas são raros os agentes em campo para fazer um levantamento atualizado da espécie e, além disso, o reconhecimento dos híbridos nem sempre é fácil. A identificação correta das espécies e dos híbridos é crucial para uma gestão adequada e eficiente da fauna nativa nas áreas de preservação e também para os casos de estudos de impactos ambientais e seus respectivos relatórios. Neste último caso, uma identificação equivocada pode levar tanto a um custo ambiental elevado, caso não se reconheça uma espécie local ameaçada de extinção, como a um custo alto para o empreendimento no caso de se identificar uma espécie ameaçada no local equivocadamente.

Indivíduos híbridos podem apresentar características de coloração e pelagem intermediárias das características presentes nos indivíduos que lhes deram origem (Andrade, 2006; Coimbra-Filho, Pissinatti e Rylands, 1993) misturando as características fenotípicas e dificultando a identificação e caracterização dessas espécies, e isso também acontece entre as espécies *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* (Pereira, Oliveira e Ruiz-Miranda, 2008; Traad e Leite, 2012).

Um estudo que relacione a variação de cor, em imagem fotográficas padronizadas, dos diversos tipos de sagüis encontrados na região de ocorrência do *C. aurita* pode trazer respostas sobre o nível de segurança que avaliações de campo podem ter na categorização de indivíduos de diferentes espécies e de seus híbridos, que podem ser objetos de programas de manejo ou controle.

Amostras de museu

Poucas, e com poucos indivíduos, foram as pesquisas genéticas com *Callithrix aurita* e isso abre o questionamento sobre a correspondência de identidade genética entre esses sagüis atuais e sagüis-da-serra-escuros que habitavam o sudeste no passado. Este fato é ainda mais importante dado o cenário atual que demonstra a extensa difusão dos sagüis invasores e dos casos de hibridação com a espécie nativa. Em outras palavras, não sabemos se a introgressão genética promovida por retrocruzamentos já não incorporou nas populações atuais a genética das populações invasoras nem podemos garantir se o que vemos hoje são descendentes de uma mesma linhagem evolutiva. Um estudo do DNA de amostras de museu têm a capacidade de revelar dados comparativos importantes para garantir que os esforços e os investimentos direcionados à conservação do *Callithrix aurita* não estão sendo desperdiçados.

Objetivo geral

Caracterizar geneticamente (marcadores moleculares) e colorimetricamente, de forma sistematizada, as populações de sagüis (*Callithrix aurita*, *C. jacchus*, *C. penicillata* e híbridos) presentes na região serrana do estado do Rio de Janeiro e em seu entorno.

Dentro desse contexto a tese está dividida em quatro capítulos: 1) o primeiro aborda uma revisão sobre as análises moleculares como ferramenta de pesquisa e conservação de primatas; 2) o segundo faz uma caracterização molecular dos sagüis do gênero *Callithrix* da Mata Atlântica que atualmente ocorrem no Estado do Rio de Janeiro – invasores, híbridos e “puros”; 3) o terceiro faz a identificação de primatas neotropicais do gênero *Callithrix* com o uso de mini-amplicons em amostras de museu; e por fim 4) uma caracterização dos sagüis-da-serra-escuro, invasores e híbridos presentes na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo através do uso de imagens fotográficas padronizadas.

1 ANÁLISES MOLECULARES COMO FERRAMENTA DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PRIMATAS: UMA REVISÃO

1.1 Introdução

O conhecimento sobre primatas tem um apelo especial dentro e fora da comunidade científica, sobretudo pelo fato do *Homo sapiens* viajar no mesmo vagão evolutivo dos demais parceiros desta ordem. De forma didática, dois grandes campos de pesquisa sobre primatas divergem deste interesse geral, um direcionado a todos os primatas excluindo-se o *Homo sapiens*, outro ao *Homo sapiens* excluindo-se os demais primatas. O primeiro agrega as pesquisas direcionadas a conservação ambiental, entre outras, e o segundo tem o foco de suas pesquisas direcionadas a questões de saúde, medicina e medicamentos. Claro está, que há interseções frequentes entre estas vertentes (onde tanto características genéticas quando questões filogenéticas e filogeográficas podem ajudar a elucidar problemas da área da saúde).

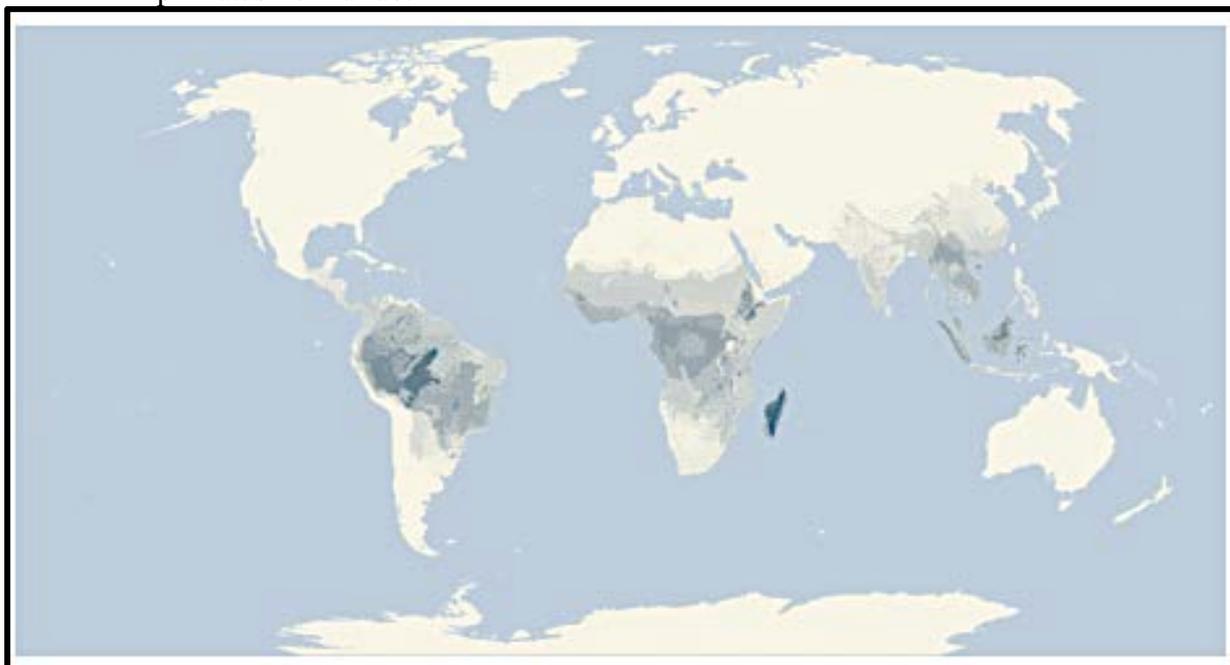
A Ordem Primates se divide nas subordens Anthrooidea (macacos) e Prosimii (prossímios). A subordem Anthrooidea por sua vez se divide nas infraordens Catarrhini (macacos do Velho Mundo e hominóides) e Platyrrhini (macacos do Novo Mundo) (Bicca-Marques, Silva e Gomes, 2006). Os catarrinos (cata = direcionado para baixo, rhini = nariz) possuem as narinas voltadas para baixo em um focinho longo, enquanto os platirrininos possuem as narinas voltadas para o lado, em um focinho mais curto (Verona e Pissinatti, 2007). Os macacos da infraordem Platyrrhini (platy = achatado, rhini = nariz) são os que ocorrem nas Américas do Sul e Central, exclusivamente, são arborícolas, de porte pequeno a médio, e se locomovem predominantemente com os quatro membros (Bicca-Marques et al., 2006). Apresentam extensa variedade geográfica e com frequência grande variedade de coloração, o que em muitos casos gera incerteza em suas classificações taxonômicas (Verona & Pissinatti, 2007).

Perelman e colaboradores (2011) ressaltam que, apesar das revoluções advindas do projeto genoma humano nos campos da genômica, proteômica e medicina, pouco foi feito no campo formal da evolução para que estes dados fossem interpretados em uma hierarquia filogenética de primatas para além dos níveis de

família e gênero locais. Baker e Bradley (2006), por sua vez, apontam que os dados genéticos são únicos na definição de espécies, uma vez que sua utilização: 1) pode quantificar divergência genética a partir de diferentes aspectos do genoma (genes mitocondriais e nucleares, genes codificadores de proteínas, genes regulatórios, DNA móvel, microssatélites, rearranjos cromossômicos, heterocromatina, etc.); 2) pode fornecer valores de divergência que aumentam com o tempo, fornecendo uma estimativa do tempo a partir da divergência; 3) pode fornecer uma perspectiva de genética de população; 4) é menos sujeita a convergência e paralelismo em relação a outros conjuntos de caracteres; 5) pode identificar monofiletismo, taxa irmãos, e a presença ou ausência de introgressão e 6) pode identificar com precisão indivíduos híbridos (parentesco e a fonte de indivíduos híbridos, F1s, retrocruzamentos, direção da hibridação e, em conjunto com outros dados, identificar quais os híbridos que são estéreis ou férteis).

A exclusividade da presença de primatas não humanos a uma faixa quase linear entre latitudes de temperatura menos extremas contrasta com a percepção de uma grande parte do globo desprovido desses indivíduos. As impactadas regiões tropicais concentram as áreas sobre as quais recai a responsabilidade de conservação desses seres (**Error! Reference source not found.**). Compreender a distribuição dos primatas no mundo é relevante, não só para discutir prioridades conservacionistas que perpassam as fronteiras onde se distribuem os primatas não humanos, mas também para visualizar o caminho evolutivo dos nossos genes partilhados em uma grande variedade de formas.

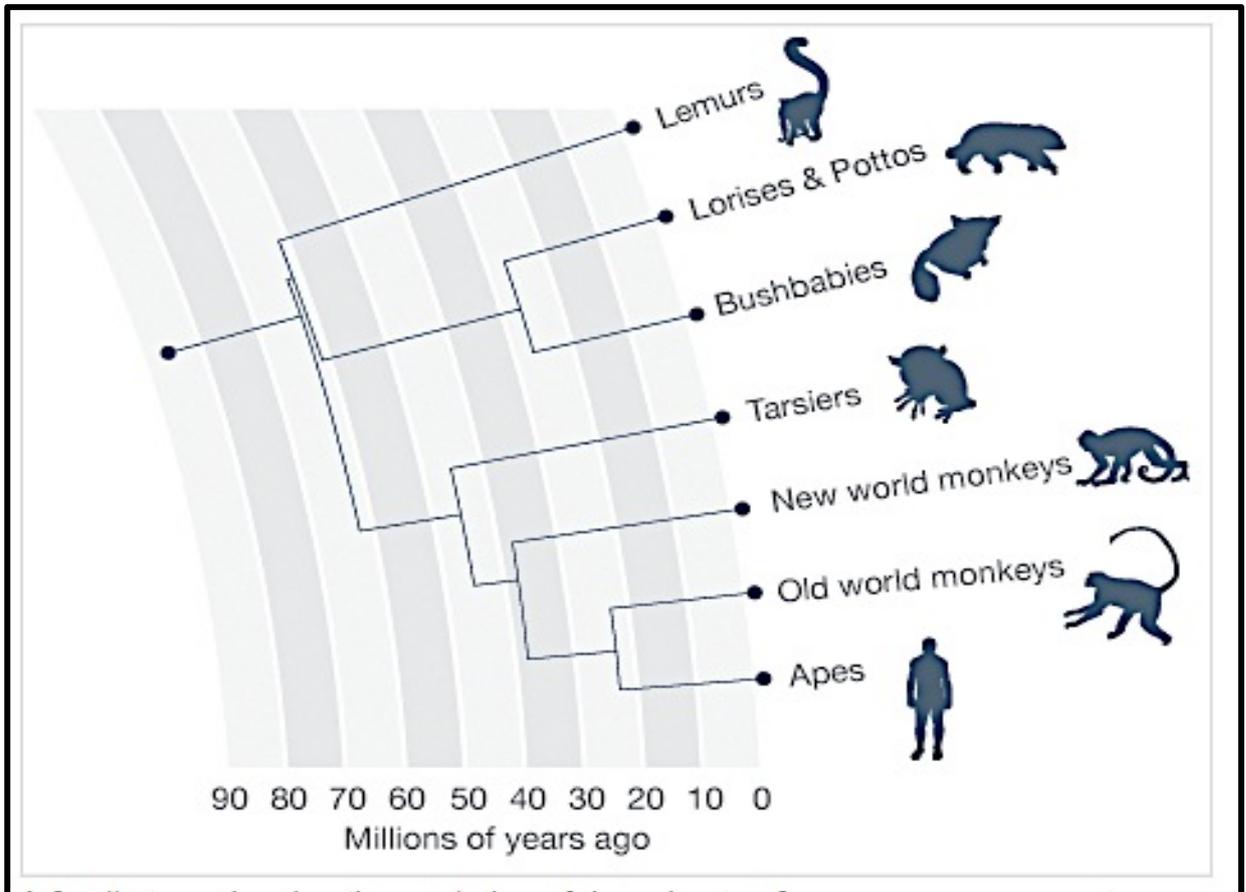
Figura 4 - Distribuição e concentração (mais escuro = maior n. de espécies) de espécies de primatas no mundo.



Fonte: British Broadcasting Corporation - BBC – <http://www.bbc.co.uk/nature/life/Primate>)

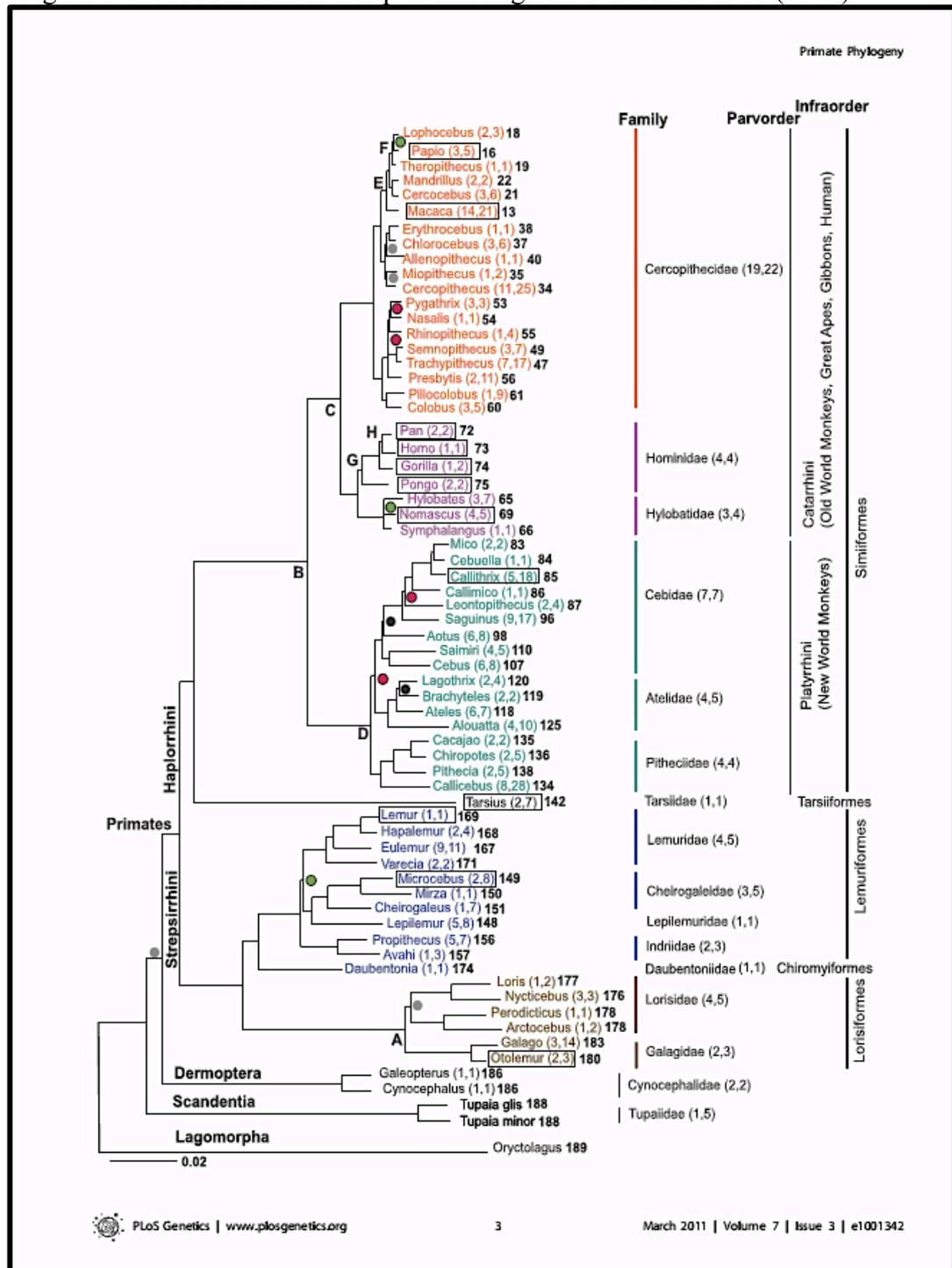
O esclarecimento dos caminhos evolutivos desta ordem particular dos mamíferos, aprofundado e ampliado pela ferramenta molecular aumenta o discernimento necessário para as difíceis decisões sobre quais espécies ameaçadas devem ser priorizadas, sendo que o pertencimento a ramos genéticos mais antigos é um dos critérios para inclusão de espécies em programas de conservação. Agrupamentos e distâncias evolutivas (**Error! Reference source not found.** e **Error! Reference source not found.**) servem para mais um ponto de corte para discussões conservacionistas. Perelman *et al* (2011) oferece uma visão detalhada da hierarquia filogenética dos primatas (Fig. 6) ajudando a fixar a amplitude da ordem *Primates* para além da noção vulgar de macacos.

Figura 5 - Árvore da família dos primatas e do tempo das separações evolutivas a partir de um ancestral comum a 85 milhões de anos atrás.



Fonte: Página da BBC – <http://www.bbc.co.uk/nature/life/Primate> .

Figura 6 - Árvore evolutiva dos primatas segundo Perelman *et al* (2011).

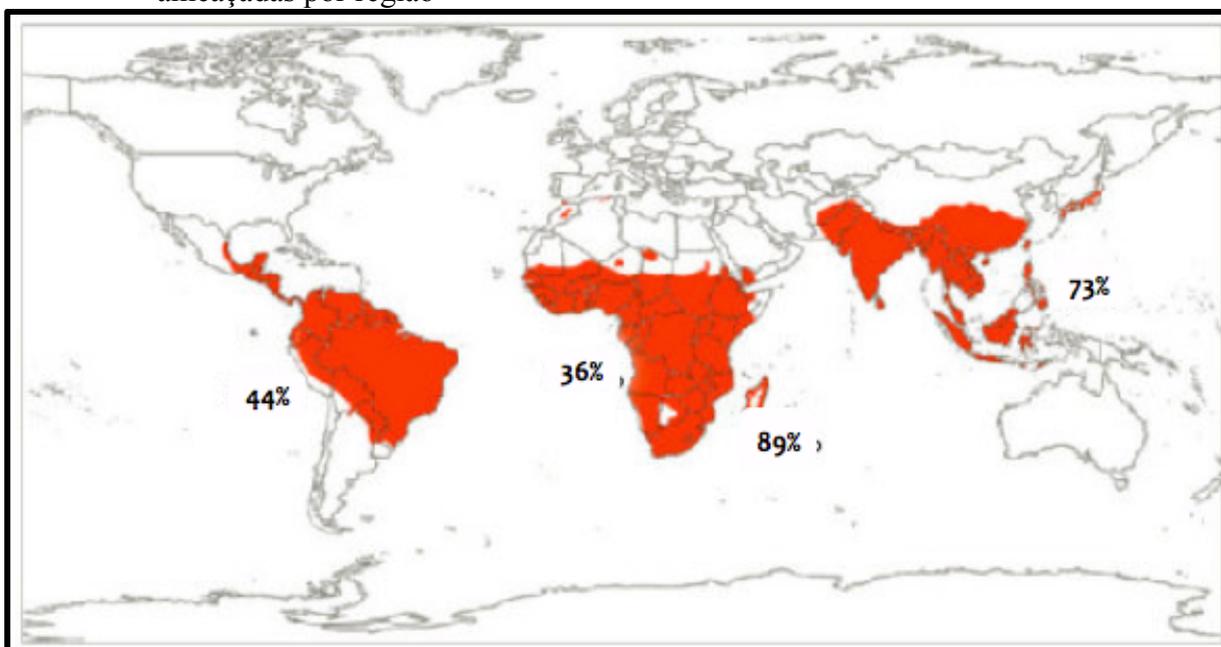


Fonte: Perelman *et al*, 2011.

Dentro do contexto atual, onde se estima que 21 milhões de hectares de florestas tropicais desaparecem por ano, o grave panorama mundial resultante é de fragmentos florestais isolados (Laurance, 1999; Whitmore, 1997) onde encontram-se a quase totalidade das espécies de primatas. Notar caminhos evolutivos permite que se questione sobre os tipos específicos de pressões e ameaças a que grupos diferentes

estão expostos (**Error! Reference source not found.**). Primatas predominantemente arborícolas, como os do novo mundo sofrem as pressões da redução de seu habitat pelo amplo desmatamento que ainda vem ocorrendo (Pinto e Grelle, 2012) enquanto os primatas que se deslocam com maior facilidade sobre o solo, como alguns do velho mundo, se veem em contato direto com o ambiente humano e as ameaças que daí podem advir, como infecção por novos parasitas e competição pelos alimentos dos cultivos agrícolas. Esses tipos de pressões são diferentes e indicam estratégias locais de preservação específicas (Priston, Wyper e Lee, 2012).

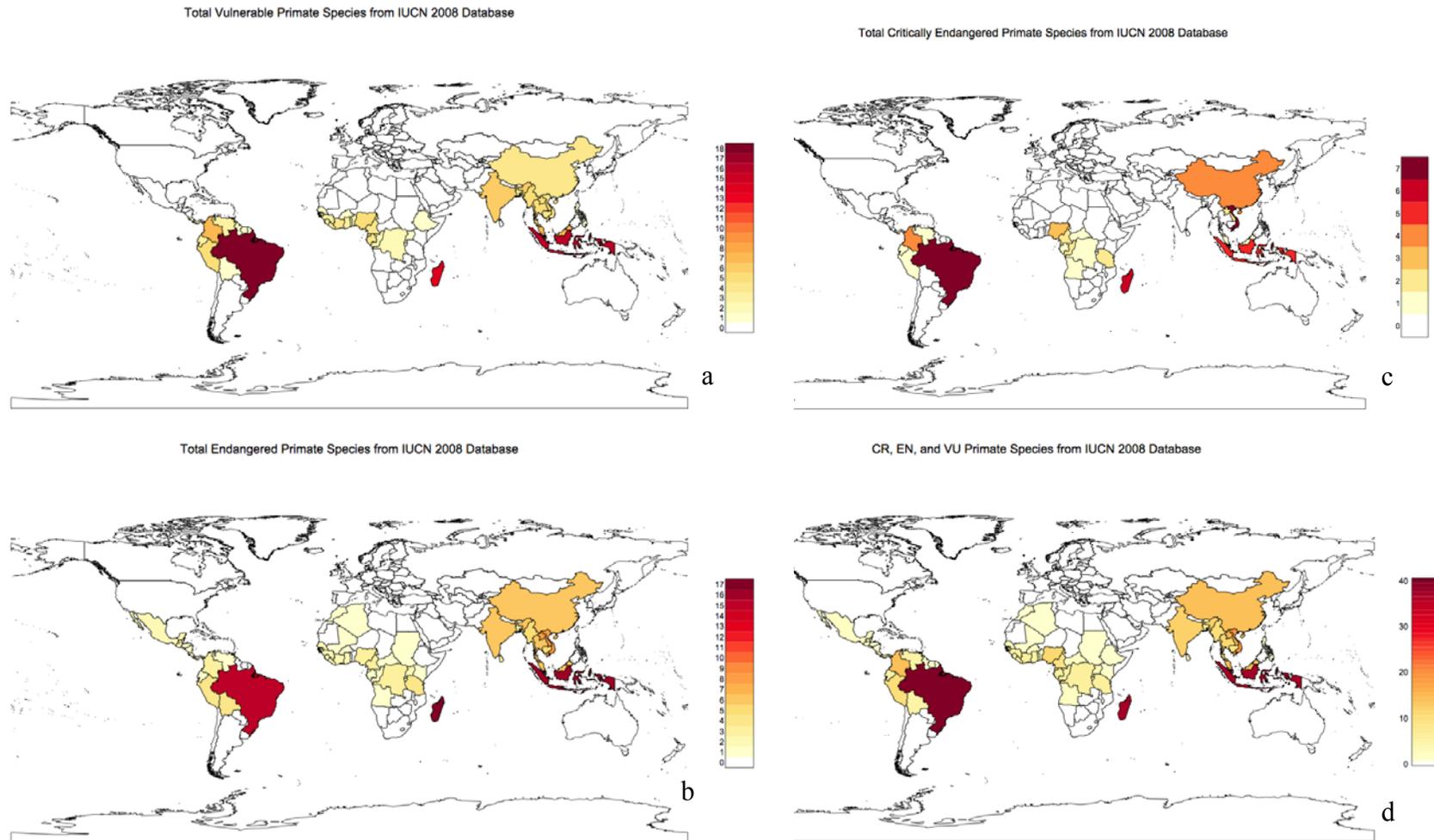
Figura 7 - Mapa de distribuição das espécies de primatas e a porcentagem de espécies ameaçadas por região



Fonte: IUCN, 2015.

O Brasil é o país detentor do maior número de espécies de primatas do mundo e junto com Madagascar e o Sudeste Asiático, possui um maior número de espécies ameaçadas de extinção nas categorias Criticamente Ameaçada (CR), Ameaçada (EN) e Vulnerável (VU) (Figura 8b/c/d/e).

Figura 8 - Mapas relacionando localização geográfica com os graus de ameaça atribuídos aos primatas.



Legenda: A escala de tons avermelhados mostra o grau crescente de número de espécies ameaçadas em dada categoria (a – “vulnerável”; b – “em perigo”; c – “criticamente ameaçada”; d – a soma das três anteriores – VU+EN+CR) relacionadas às fronteiras de países.

Fonte: http://christinaberger.com/notes_code/nc.php?topic=iucn_primate_maps.

O livro “Primatas em Perigo – Os 25 primatas mais ameaçados do mundo 2012 – 2014” (Schwitzer *et al.*, 2014) revela quem são e onde se encontram os primatas que correm o maior risco de extinção na atualidade. A África tem cinco espécies, Madagascar conta com seis, a Ásia tem nove e a região neotropical com cinco, sendo que no Brasil são duas – *Cebus kaapori* e *Alouatta guariba guariba* (**Error! Reference source not found.**).

Figura 9 - Mapa das localizações geográficas dos 5 primatas mais ameaçados dos Neotrópicos



Fonte: Schwitzer *et al.*, 2014

Algumas espécies que estiveram nestas listas de 25 espécies mais ameaçadas, e saíram, mostram os resultados de programas de conservação, como o caso do mico-leão-dourado e do mico-leão-preto, que têm contribuído efetivamente para a recuperação destas populações.

Do ponto de vista de quantidades, as tabelas da IUCN (2014) mostram os neotrópicos como os maiores detentores de diversidade de espécies (Tabela 1). e o Brasil o maior entre todos os países com 103.

Tabela 1 - Total de Família, Gênero, Espécie e a soma total de primatas nas quatro regiões e a porcentagem de ameaçados.

Região	Família	Gênero	Espécie	Soma Total (Espécies e Subespécies)	Porcentagem de ameaçados
África	4	25	111	197	31,5%
Ásia	5	19	119	183	63,8%
Madagascar	5	15	101	105	88,5%
Neotrópicos	5	21	174	218	37,4%
Total	7	76	507	702	50,4%

Fonte: Grupo Especial para Primatas da IUCN – http://www.primate-sg.org/primata_diversity_by_region/ (atualizada com dados de 2015).

Hoje, a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN cataloga, entre as 425 espécies do mundo, 259 espécies de primatas divididos nas categorias *Vulnerável* (VU), *Em Perigo* (EN) e *Criticamente em Perigo* (CR), sendo o número de espécies para cada categoria 59, 117 e 83 respectivamente. Estes dados, divididos por regiões, mostram o número de 59 espécies ameaçadas para a América do Sul, sendo 39 no Brasil. As maiores ameaças aos primatas são a agricultura e pecuária (para 247 espécies) e o uso de recursos biológicos (para 228 espécies). Deste, vale ressaltar o alto valor relacionado a caça e captura de animais.

A partir do ano 2000, o número crescente de análises do DNA realizadas com técnicas de genética molecular tem influenciado de forma crescente no reconhecimento de espécies novas, muitas vezes partindo da situação onde primatas classificados morfologicamente dentro de uma mesma espécie, são reconhecidos como espécies diferentes e, em alguns casos, também o inverso (Tabela 2).

Tabela 2 – Crescimento do número de espécies reconhecidas

	Desde 1990	Desde 2000
Madagascar	50	46
Africa	11	4
Ásia	15	8
Neotrópicos	26	17
TOTAL	102	75

Os esforços voltados para a conservação de espécies ameaçadas vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas, com um aporte político, social e financeiro que demanda igual aumento de garantias científicas que respaldem tal investimento. O vasto universo das informações contidas nos códigos genéticos têm se tornado cada vez mais acessível e rápido, e fornece uma nova e riquíssima fonte de dados que iluminam muitos dos problemas relacionados ao terreno conservacionista. Analisar o que tem sido feito em termos de estudos moleculares com primatas esclarece tanto sobre quais as espécies que têm sido avaliadas quanto os “buracos” taxonômicos que carecem de informações publicadas.

O presente capítulo se limita ao universo da conservação de primatas, filtrado pelo olhar da importância da ferramenta de análises moleculares do DNA como iluminadora de caminhos evolutivos até há poucas décadas inacessíveis.

1.2 Objetivos

Este estudo tem como objetivo realizar uma pesquisa bibliográfica, de modo a promover uma visão do uso de técnicas de análise molecular de DNA em primatas Neotropicais. Um foco particular foi destinado aos primatas do gênero *Callithrix* e para casos de hibridação neste gênero.

1.3 Metodologia

Três bases de busca foram acessadas: *Web of Science*, *Scopus* e *Periódicos Capes*. As palavras chave usadas foram escolhidas de modo a abranger todas as

possibilidades para a inclusão de todos os artigos que tratassem de um mesmo assunto. Isso implicou em utilizar palavras inteiras e suas abreviaturas ou eventuais sinônimos com conectivos tipo “OR”. Para evitar vários outros campos científicos que são vinculados às palavras chave, foram incluídas diversas palavras nas buscas de modo a excluir o maior número de artigos não relacionados ao escopo deste estudo, com conectivos tipo “AND NOT” (Tabela 3).

Tabela 3 – Palavras utilizadas na busca (inclusivas) e aquelas utilizadas para excluir artigos não desejados (exclusivas).

Inclusivas	Exclusivas
primat*	nemat*
mitochondr*	protoz*
control region	bacteria
cytochrome b	virus
Cyt b	chloroplast
coi	human*
cytochrome oxidase i	fungi
cytochrome c oxidase subunit i	neuro*
cox i	parasit*
coii	ocula*
cytochrome oxidase ii	cortex
cytochrome c oxidase subunit ii	chloroplast
Ribosomal gene	Immu*
12S	
16S	
ND	
Complete	
NGS	
Microsatellite*	
STR*	
Nuclear	

Para cada tipo de marcador foi feita uma seleção de palavras com seus sinônimos, diferentes para cada marcador, associadas ao mesmo grupo de palavras restritivas. Depois da resposta do *site*, a seleção primária de artigos foi exportada para uma tabela tipo EXCEL contendo o título, ano de publicação, nome dos autores, resumo (quando disponível) e palavras chave (e outros dados que não foram

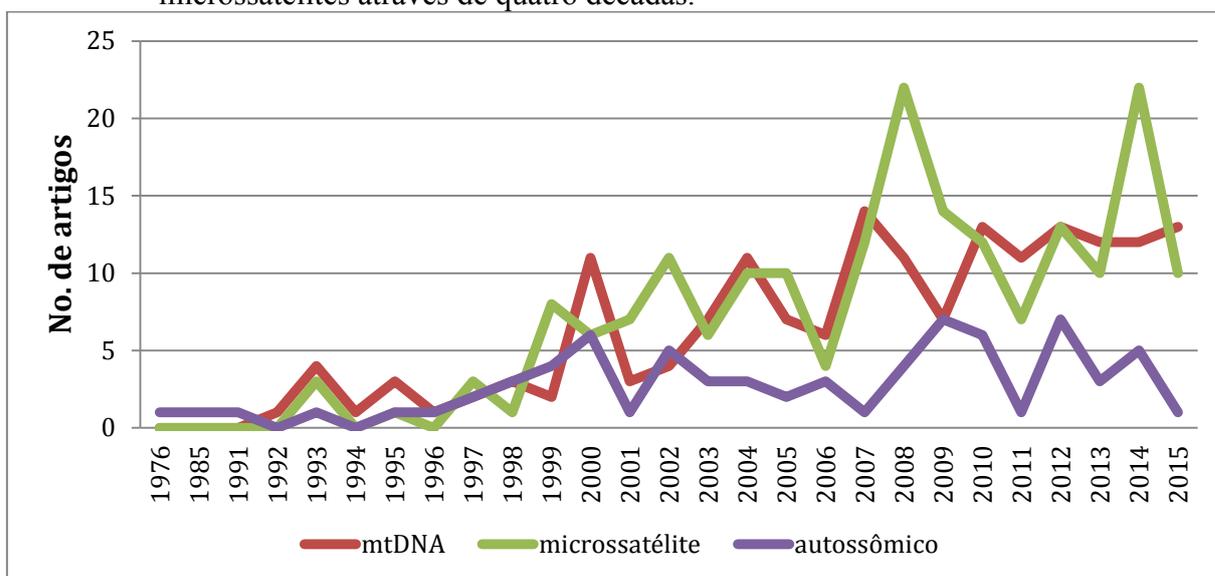
examinados). Uma vez dispostos em uma planilha, uma nova varredura foi feita através da ferramenta “FIND” tanto para excluir artigos fora do escopo do estudo, como para evidenciar, separar e enumerar os artigos de acordo com determinados temas de interesse, usando algumas das palavras de busca iguais às da tabela anterior ou outras como: *neotropic*, *hybrid*, e todos os gêneros de primatas neotropicais (*Aotus*, *Alouatta*, *Ateles*, *Brachyteles*, *Lagothrix*, *Oreonax*, *Cebuella*, *Callibella*, *Callithrix*, *Mico*, *Leontopithecus*, *Sagüinus*, *Callimico*, *Cebus*, *Saimiri*, *Sapajus*, *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao* e *Callicebus*).

Essa busca permitiu criar novas tabelas com artigos selecionados por temas para que informações específicas pudessem ser evidenciadas. Os gráficos foram feitos a partir das tabelas no programa computacional EXCEL versão 14.4.8 da Microsoft.

1.4 Resultados

A pesquisa por artigos nos bancos de dados gerou, no total, 437 resultados divididos entre os relacionados a marcadores mitocondriais com 172 artigos, os relacionados a marcadores de genes autossômicos com 73 artigos, e os relacionados a marcadores em regiões repetitivas (microsatélites) com 192 artigos. Nestas quatro décadas houve um crescimento mais acentuado para o uso de marcadores mitocondriais e de regiões repetitivas, enquanto a tendência do uso de marcadores de genes autossômicos é menos evidente. Este último teve um crescimento constante no final da década de 90, mas depois estabilizou (Figura 10).

Figura 10 - Evolução do uso de marcadores moleculares mitocondriais, autossômicos e microssatélites através de quatro décadas.



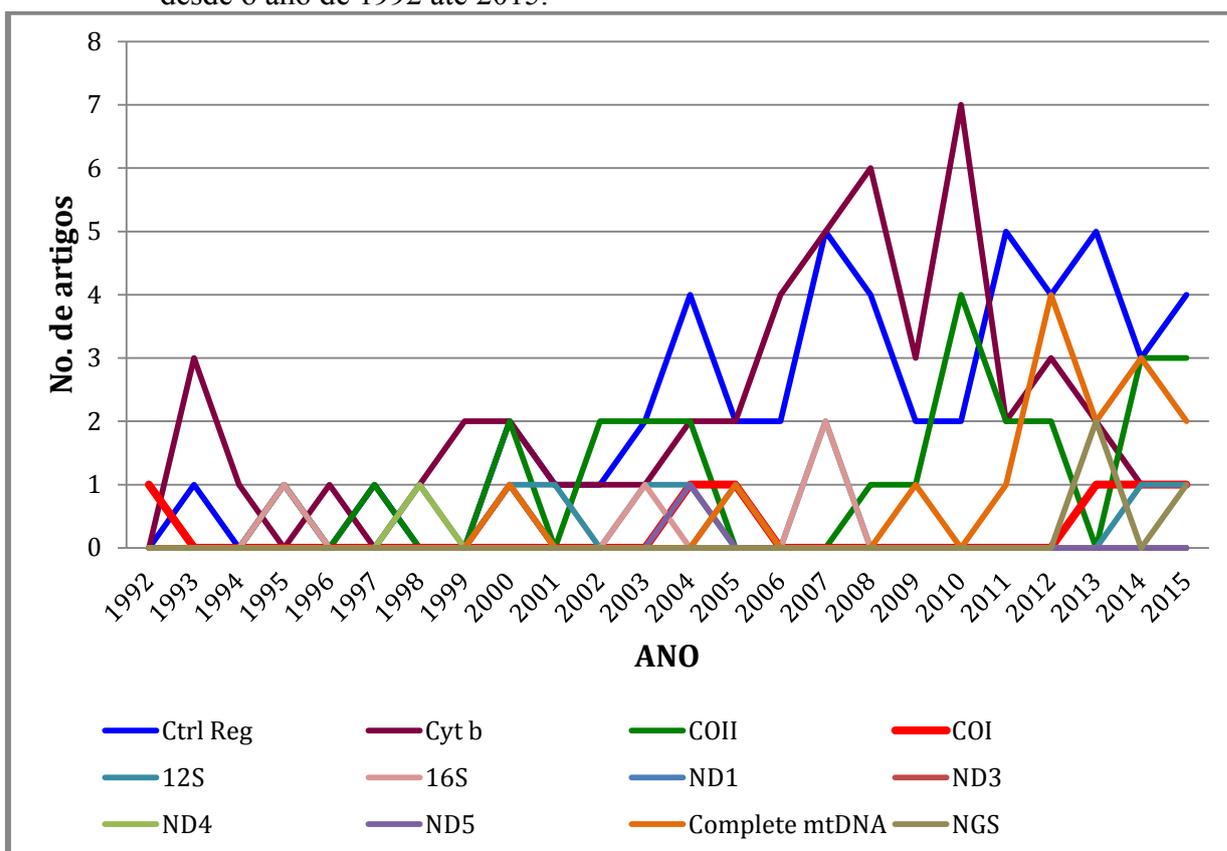
O detalhamento discriminativo do uso de marcadores mitocondriais por tipo, isto é, por regiões do DNA mitocondrial revela uma predominância dos marcadores da região controle em 53 publicações, do citocromo b em 50, e da citocromo c oxidase II em 27. Em menor número, mas acima da casa das dezenas aparece o DNA mitocondrial completo como referência de dados em 15 artigos (Tabela 4).

Tabela 4 - Quantidade de artigos produzidos nos últimos 24 anos (contados a partir de 1991) relacionados ao marcador molecular mitocondrial utilizado.

Marcador Molecular	No. de artigos
ND1	1
ND3	1
ND4	2
ND5	2
16S	4
12S	9
Ctrl Reg	53
Cyt b	50
COII	27
COI	7
mtDNA completo	15
NGS	3
TOTAL	174

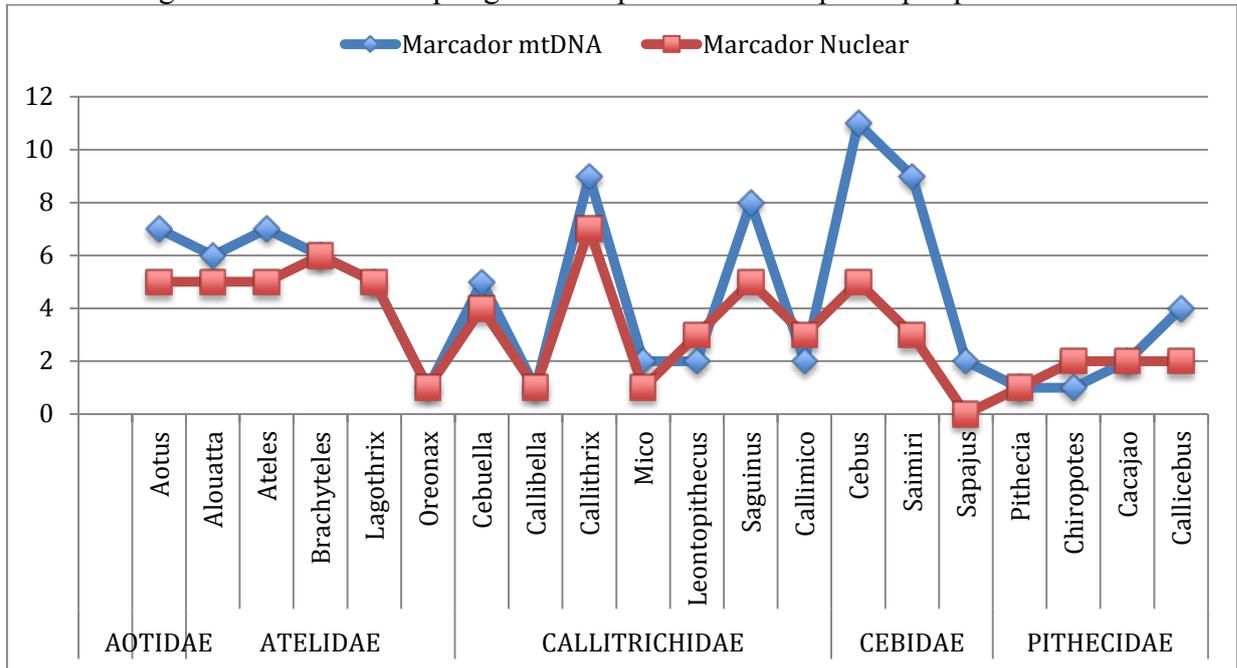
A distribuição do número de artigos com diferentes marcadores mitocondriais através do tempo (em anos) revela que a partir do ano 2000 ocorre um crescimento considerável no uso dos marcadores da região controle e do citocromo b, e a partir de 2009 há um crescimento dos marcadores da citocromo c oxidase II e do uso de DNA mitocondrial completo (Fig. 11).

Figura 11 - Distribuição do número de artigos separados pelo marcador mitocondrial utilizado desde o ano de 1992 até 2015.



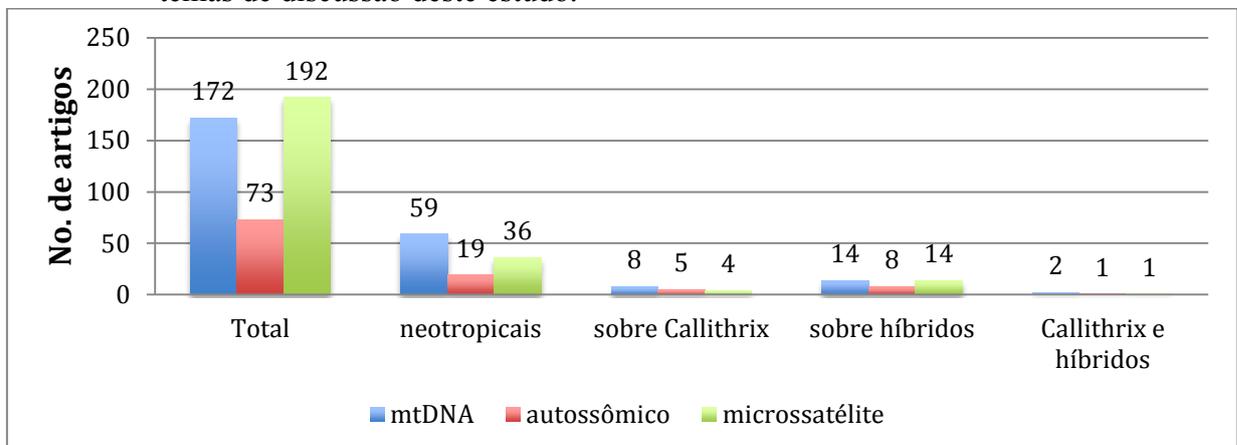
Dos 172 artigos com marcadores mitocondriais, 59 foram sobre primatas neotropicais, e entre os 73 artigos com marcadores autossômicos, foram 19. *Cebus*, *Callithrix* e *Sagüinus* foram os gêneros mais estudados com marcadores mitocondriais. O marcador nuclear foi utilizado principalmente nos gêneros *Callithrix*, *Brachyteles*, *Sagüinus* e *Cebus* (Figura 12). Como vários artigos pesquisam sobre vários gêneros ao mesmo tempo, a soma das quantidades de artigos por gênero é maior que a dos artigos que tratam das espécies neotropicais de forma geral.

Figura 12 - Quantidade de artigos produzidos nos últimos 23 anos divididos por tipo de genoma amostrado e por gênero de primatas neotropicais pesquisados.



Os resultados da pesquisa bibliográfica sobre o uso de marcadores mitocondriais, autossômicos e microssatélites na região Neotropical somaram 114; os que trataram das espécies do gênero *Callithrix* somaram 17; sobre híbridos foram 36; e os que abordaram *Callithrix* juntamente com hibridação foram 4 estudos (Figura 13).

Figura 13 - Quantidades de artigos publicados divididos pelo tipo de marcadores alvo e pelos temas de discussão deste estudo.



Dentre os artigos que analisaram o gênero *Callithrix* com o uso de marcadores moleculares nove usaram marcadores mitocondriais, também sete usaram marcadores nucleares e quatro usaram microssatélites (STRs). A maioria dos estudos foi direcionado para problemas de filogenia (Tabela 5).

Tabela 5 - Artigos publicados que usaram marcadores moleculares como abordagem sobre o gênero *Callithrix*.

Ano	Autores	mtDNA	Nuclear	Microssatélites	Tema
1996	Schneider et al.	-	IRBP	-	Filogenia
1997	Tagliaro et al.	Ctrl Reg	-	-	Filogenia
1998	Pastorini et al.	ND4	-	-	Filogenia
1999	Chaves et al.	-	vWF	-	
1999	Moreira e Seuanez	Cyt b	pseudogen e	-	Filogenia
1999	Von Dornum e Ruvolo	-	G6PD	-	Filogenia
2000	Nievergelt et al.	-	-	STR	Genética de populações
2000	Tagliaro et al.	ND1	Transferin	-	Filogenia
2001	-	-	-	-	
2002	Moreira	-	SRY	-	
2002	Sena et al.	COII	-	-	Filogenia
2003	Faulkes et al.	Ctrl Reg	-	-	Genética de populações
2004	-	-	-	-	
2005	-	-	-	-	
2006	-	-	-	-	
2007	Ross et al.	-	-	STR	Quimerismo
2008	Raveendran et al.	-	-	STR	Técnica
2009	-	-	-	-	
2010	-	-	-	-	
2011	-	-	-	-	
2012	Schneider et al.	Ctrl Reg	Alu	-	Filogenia
2013	Carvalho et.al	Cytb/COII	-	-	Hibridação
2014	Malukiewicz et al.	Ctrl Reg	-	-	Genética de populações/ Hibridação
2015	Malukiewicz et al.-	-	-	STR	Genética de populações/ Hibridação

Quando filtrados por temas, a distribuição de todos os artigos revelou que os microssatélites foram os marcadores mais usados para o estudo de primatas, seguido pela região controle do mtDNA. O tema “filogenia” também foi o mais abordado (Tabela 6).

Tabela 6 – Relação dos marcadores moleculares com os temas abordados no conjunto total de estudos sobre primatas.

Marcador	Phylogen	Phylogeog	Threat	Endangered	Conservation	Gene Flow	Total
Ctrl R	23	10	5	14	17	6	75
Cyt b	33	4	2	5	6	2	52
COII	16	3	1	4	4	2	30
COI	2	1	1	1	2	-	7
12 S	8	-	-	-	-	-	8
16 S	4	-	-	-	-	-	4
ND 1	1	-	-	-	1	-	2
ND 2	-	-	-	-	-	-	-
ND 3	-	-	-	-	-	-	-
ND 4	-	-	-	-	-	-	-
ND 5	1	-	-	-	-	-	1
mtDNA completo	13	2	1	2	1	2	21
Next Generation	2	-	-	-	-	-	2
COIII	1	-	-	-	-	-	1
Nuclear	48	4	-	6	3	9	70
Microssatelites	15	8	4	31	23	22	103
TOTAL	167	32	14	63	57	43	376

1.5 Discussão

A maior parte dos estudos sobre primatas que utilizam marcadores moleculares para assuntos não biomédicos, estão relacionados com questões filogenéticas, filogeográficas e em menor número com hibridação entre espécies congêneres. Quando relacionados às questões de conservação e de espécies ameaçadas, foram poucos os artigos que trataram destes temas em seus resumos, se comparados aos 50% de primatas ameaçados no mundo, aproximadamente 15% (63 e 57 respectivamente), e a metade para o tema de hibridação.

A elucidação destes temas ajuda a que mais peças sejam adicionadas ao quebra-cabeça da filogenia e da história evolutiva dos seres-vivos e de suas distribuições pelo planeta. Os primatas neotropicais estão relativamente bem representados com 114 (26%) artigos para seus 20 gêneros, aproximadamente 5 artigos em média para cada um. Cinco artigos originando dados moleculares sobre uma ou mais espécies de um gênero ou sobre mais de um gênero, como acontece com frequência, gera informações complementares com significativa solidez para que

afirmações filogenéticas ou filogeográficas sejam postuladas. O que se vê, entretanto, na figura 12 onde se mostra quantas vezes um determinado gênero neotropical foi avaliado em um artigo, é que a representação destes gêneros não é homogênea, alguns foram mais estudados do que outros, sendo que alguns não passam de dois artigos, como os casos dos gêneros *Oreonax* (divisão recente) e do *Pithecia*, por exemplo. Alguns gêneros com poucos estudos, por outro lado, podem estar representados em estudos mais antigos quando ainda não haviam sido reconhecidos como um gênero próprio como o caso do grupo *Mico* e do *Sapajus*. O gênero *Callithrix* está entre os mais representados por artigos científicos publicados entre os primatas neotropicais com nove artigos (marcadores mitocondriais). Vale notar que o número total de estudos com primatas neotropicais representa quase um terço de todos os estudos com primatas, o que não está ruim, considerando a importância da Ásia e da África com suas grandes populações de primatas.

O aprimoramento das técnicas e tecnologias tem sido rápido o suficiente para que uma mesma geração de pesquisadores venha renovando e ampliando sucessivamente suas abordagens e análises de dados moleculares. Houve uma “explosão” de novos artigos a partir do ano 2000, mais de dez anos depois do desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1983 (Mullis *et al.*, 1986). Atualmente, entramos na era do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), com tecnologia capaz de gerar e interpretar um volume muito maior de dados moleculares e artigos sobre primatas começam a ser publicados (Bergey *et al.*, 2013; Guschanski *et al.*, 2013).

Também não é homogênea a distribuição de artigos por todos os marcadores moleculares, entre outros motivos, por que alguns marcadores respondem perguntas diferentes de outros. Os marcadores que mais se sobressaíram foram os marcadores mitocondriais Cyt b, da Região Controle e do COII. Estes marcadores respondem bem às questões filogenéticas, devido as suas taxas evolutivas que permitem perceber diferenças em um tempo evolutivo condizente com a separação de espécies e gêneros (Sena *et al.*, 2002).

Apesar da grande importância como ferramenta de conservação, são poucos os estudos que usaram técnicas moleculares como parte de programas de recuperação de primatas neotropicais ameaçados de extinção (ajudando a identificar espécies, casos de hibridação e diversidade genética), entre eles está o realizado com o miquiqui-do-

norte (Chaves *et al.*, 2011) que avaliou a região controle do mtDNA de 152 indivíduos; o estudo do DNA mitocondrial completo do *Lagothrix flavicauda* que ajudou a esclarecer a filogenia desta espécie que havia ganhado um gênero próprio (*Oreonax*) (Rosenberger e Matthews, 2008) e um estudo com microssatélites identificando pouca diversidade alélica em micos-leões-dourados (Grativol, Ballou e Fleischer, 2001).

1.6 Conclusão

O gênero *Callithrix* apresentou um bom número de artigos (comparado a outros grupos) em que foram usadas técnicas moleculares como ferramenta investigativa. A partir destes estudos, o gênero teve, sobretudo, sua filogenia bem resolvida.

Dentre as espécies do gênero, *Callithrix aurita* e *C. flaviceps* são as que estão categorizadas como “em perigo” de extinção, mas não há (até o presente trabalho) estudos moleculares direcionados para estas espécies (considerando o avanço das espécies invasoras, o declínio do habitat, a caça e outras ameaças, estudos de genética voltados para a conservação dos sagüis ameaçados são de suma importância, e uma prioridade entre as ações voltadas para a preservação destas espécies).

2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SAGÜIS DO GÊNERO CALLITHRIX OCORRENTES NA MATA ATLÂNTICA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – INVASORES, HÍBRIDOS E “PUROS”

2.1 Introdução

O zoólogo Richard Dawkins critica com certa insistência o que ele chama de “mente descontínua”, isto é, um olhar fragmentador, divisório, categorizador para o que existe, alimentado pela necessidade classificatória do mundo, e que falha em perceber um universo contínuo de semelhanças que mais unem que separam o que se insiste em separar. Apesar disso, a maneira humana de lidar com a existência é indiscutivelmente classificatória e há benefícios provenientes da definição de limites e fronteiras, mesmo que, ou talvez especialmente se, reavaliados, revistos e redefinidos com frequência.

O avanço tecnológico rompeu com as barreiras de acesso ao código montador, definidor e regulador da vida, o DNA e esse acesso originou um novo e vastíssimo universo de dados que, entre outras coisas, servem para serem olhados de forma comparativa entre os seres vivos, igualando-os ou diferenciando-os no nível mais primário de sua ontogenia.

Baker e Bradley (2006) apontam que os dados genéticos são únicos na definição de espécies uma vez que sua utilização: 1) pode quantificar divergência genética a partir de diferentes aspectos do genoma (genes mitocondriais e nucleares, genes codificadores de proteínas, genes regulatórios, DNA móvel, microssatélites, rearranjos cromossômicos, heterocromatina, etc.); 2) pode fornecer valores de divergência que aumentam com o tempo, fornecendo uma estimativa do tempo a partir da divergência; 3) pode fornecer uma perspectiva de genética de população; 4) é menos sujeita a convergência e paralelismo em relação a outros conjuntos de caracteres; 5) pode identificar monofiletismo, taxa irmãos, e a presença ou ausência de introgressão e 6) pode identificar com precisão indivíduos híbridos (parentesco e a fonte de indivíduos híbridos, F1s, retrocruzamentos, direção da hibridação e, em conjunto com outros dados, identificar quais os híbridos que são estéreis ou férteis).

Mas não só para filogenias, dados genéticos também são uteis para elucidar outras questões biológicas como padrões de dispersão, sistemas de acasalamentos, estratégias reprodutivas, características comportamentais e organizações sociais (Di Fiore, 2003).

No que concerne aos primatas e, em particular aos sagüis, artigos científicos utilizando ferramentas de acesso ao DNA têm sido produzidos, aumentando o número e a precisão de dados que remontam a história evolutiva do gênero *Callithrix* dentro da família Cebidae. Mas as questões sobre o posicionamento correto na filogenia dos primatas neotropicais estimularam preponderantemente uma busca de dados moleculares que respondesse sobre a organização no nível de família e de gênero. Certamente um questionamento genuíno cujo esforço garante uma estruturação mais sólida e confiável da árvore destes primatas, onde se identificarão em última instância, as espécies.

Os estudos de diferentes autores (Barroso *et al.*, 1997; Canavez *et al.*, 1999; Chaves *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 1995; Opazo *et al.*, 2006; Porter *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1993, 1996, 2001; Tagliaro *et al.*, 2000) realizaram nas últimas décadas um importante trabalho neste sentido, fundamental para a organização das espécies neotropicais em três famílias (Atelidae, Pitheciidae e Cebidae – sensu Schneider, 2000) incluindo estudos que possibilitaram a inclusão de novos gêneros (Perelman *et al.*, 2011; Tagliaro *et al.*, 2000) e a reintegração de outros que haviam sido propostos como gêneros separados (van Roosmalen e van Roosmalen, 2003; Schneider *et al.*, 2012). Schneider e Sampaio (2015) apresentam uma ampla revisão sobre o tema.

Do ponto de vista da análise citogenética Nagamachi *et al.* (1997) afirmam que as cinco espécies de *Callithrix* (falta de dados para *C. flaviceps*) são extremamente homogêneas quanto aos seus cariótipos, exceto pelo cromossoma Y que apresenta variação no tamanho e na morfologia, sendo que do *C. aurita* é tido como diminuto e acrocêntrico.

O problema principal relativo ao sagüi-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*) não foi, contudo, de origem filogenética, uma vez que sua espécie teve uma identidade definida com relativa clareza desde cedo, dada suas palpáveis diferenças morfológicas (Coimbra-Filho e Mittermeier, 1973; Marroig, Cropp e Cheverud, 2004; Natori, 1994) confirmadas posteriormente por estudos moleculares (Schneider

et al., 2012; Sena *et al.*, 2002; Tagliaro *et al.*, 2000; Moreira, 2002). O problema preocupante identificado por biólogos para esta espécie é relacionado à invasão de seu território por sagüis congêneres o que causa competição por recursos e hibridações (pouco estudadas), o que somado à perda de habitat gera uma grave pressão e ameaça de extinção sobre a espécie nativa. Elucidar os casos de hibridação requer, entretanto, que se reconheça geneticamente as espécies envolvidas, que devem por sua vez, se encaixarem na classificação filogenética corrente, no caso do gênero *Callithrix*, de seis espécies validas.

Estudos em biologia molecular com primatas do novo mundo, com o objetivo de avaliar eventos de hibridação e as possíveis causas e consequências disso mostram alguns resultados interessantes. Silva, Sampaio e Schneider (1992) revelaram através de eletroforese de proteínas a ocorrência de uma zona de hibridação natural entre *Saimiri sciureus macrodon* e *S. boliviensis peruviansis*, na Amazônia peruana; Peres, Patton e Silva (1996) mostraram, comparando dados fenotípicos com genéticos (citocromo b) casos de hibridação natural entre *Sagüinus fuscicollis fuscicollis* e *S. fuscicollis melanoleucus* no Rio Juruá (oeste da Amazônia); Cropp e Boinski (2000) rejeitaram, com marcadores mitocondriais e nucleares, a especulação de que uma espécie de macaco-de-cheiro (*Saimiri oerstedii*) da América Central seria na verdade uma espécie híbrida introduzida na região por ameríndios ainda no período pré colonização espanhola; comparando reconstruções filogenéticas a partir de genes nucleares e mitocondriais, (Menezes, Bonvicino e Seuánez, 2010) sugerem a possibilidade de ter havido episódios de hibridação na historia evolutiva do gênero *Aotus*; usando marcadores de DNA mitocondrial (citocromo b), microssatélites (8) e do cromossoma Y (Sry) Cortés-Ortiz *et al.* (2007) mostraram evidência genética da hibridação de duas espécies de primatas de grande porte (*Alouatta palliata x A. pigra*) em uma área de simpatria em Tabasco, no México, revelando hibridação direcional em que as espécies parentais produzem fêmeas híbridos férteis, mas não machos viáveis ou férteis. Pereira (2010) pesquisou, em sagüis, um marcador nuclear do cromossoma Y (gene SRY) e mostrou, em indivíduos com fenótipo híbrido a presença do genótipo paterno da espécie ameaçada de extinção *Callithrix aurita*, com uma provável hibridação com *C. penicillata*, no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (RJ), proporcionada pela ação humana. Em um estudo com 121 macacos-pregos (*Cebus capucinus*) Ruiz-Garcia *et al.* (2012) usaram

o marcador mitocondrial CO II (citocromo oxidase subunidade 2) mas, para avaliação de casos de hibridação o estudo não foi conclusivo indicando a inclusão de marcadores moleculares. Usando dados da região controle do mtDNA somados a dados de regiões nucleares (Alu) Schneider *et al.* (2012) sugerem a possibilidade de que a espécie de sagüi *Callithrix kuhlii* seja, evolutivamente, de procedência híbrida entre as espécies *C. penicillata* e *C. jacchus*. Blair, Gutierrez-Espeleta e Melnick (2013) se baseiam em dados do marcador mitocondrial (D-loop) e de microssatélites para mostrar uma tendência evolutiva distinta entre as subespécies da América Central *Saimiri oerstedii oerstedii* e *Saimiri oerstedii.citrinellus*, propondo um tratamento destas espécies como unidades evolucionárias significativas (ESU) independentes. Carvalho *et al.* (2013) caracterizam molecularmente, com marcadores mitocondriais (CO II e Cyt b) um grupo misto de sagüis de vida livre, vivendo próximos ao Parque Nacional da Serra dos Órgãos, como tendo nas espécies parentais, um macho da espécie *C. aurita* com uma fêmea *C. jacchus*, e a prole híbrida. Também em busca de caracterizar grupos híbridos entre sagüis das espécies *C. penicillata* e *C. jacchus* Malukiewicz *et al.* (2014) realizam um estudo em duas áreas geográficas distintas (uma delas no sudeste) revelando populações híbridas através do uso do marcador da região controle da mitocôndria. Em outro estudo posterior, estes autores (Malukiewicz *et al.*, 2015) ampliam e confirmam seus resultados usando marcadores microssatélites. Mercês *et al.* (2015) questionam se casos de hibridação entre pequenos primatas amazônicos (*Saimiri sciureus* e *S. collinsi*) seriam mediados por ação humana ou por dispersão natural. Mas para essa espécie ameaçada do sagüi-da-serra-escuro este é o primeiro trabalho neste sentido.

Como os marcadores moleculares utilizados neste trabalho são marcadores de linhagem (marcadores mitocondriais transmitidos exclusivamente por linhagem feminina materna e marcador do cromossoma Y transmitido exclusivamente por linhagem masculina paterna), dados de parentesco dos demais ancestrais não são acessados.

Um evento incomum, denominado como quimerismo, acontece com o gênero *Callithrix*, e consiste na troca de células, e portanto de material genético, entre irmãos em gestação que partilham a mesma cavidade coriônica, sendo conectados por anastomoses. Isso permite que células tronco sejam trocadas pela corrente sanguínea entre irmãos e produza tecidos com composição genética distinta (do irmão) no

mesmo órgão produzido com células “originais” (Benirschke, Anderson e Brownhill, 1962; Ross, French e Ortí, 2007; Worley *et al.*, 2014). Isso faz com que, em muitos casos, cromossomas Y, que não deviam estar presentes em fêmeas, sejam encontrados encontrados em sagüis fêmeas que partilharam uma gestação com um irmão macho. Esse fenômeno possibilita inferir a origem paterna nestes casos, não fosse assim, a ascendência paterna das fêmeas seria desconhecida (como eventualmente é).

Uma abordagem em genética molecular sobre uma amostragem de sagüis nativos e invasores que atualmente habitam na área de ocorrência do *C. aurita* permite o reconhecimento das espécies encontradas na região e de onde (quando georeferenciados) e como vem ocorrendo os casos de hibridação (através do reconhecimento das linhagens paternas e maternas).

2.2 Objetivos

- Delinear as ancestralidades pelas linhagens maternas e paternas, através do uso dos marcadores de mitocôndrias e do cromossoma Y, presentes nas populações de sagüis (*Callithrix aurita*, *Callithrix* sp. e híbridos) que ocorrem na região serrana do Rio de Janeiro.
- Verificar as contribuições das linhagens paternas e maternas nas diferentes populações de sagüis que ocorrem dentro da área de estudo.
- Identificar padrões moleculares específicos para as populações.

2.3 Metodologia

2.3.1 Referências geográficas

Amostras de indivíduos de *Callithrix* spp. foram coletadas em diferentes localidades nos estados do Rio de Janeiro (66 indivíduos), São Paulo (9 indivíduos), Minas Gerais (6 indivíduos), Pernambuco (30 indivíduos) e no Distrito Federal (10 indivíduos) (Tabela 7).

Tabela 7 – Locais de captura e quantidade de sagüis amostrados.

Estado	Município	Bairro	No.de Sagüis	Fenótipo
Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	Bosque da Barra	9	<i>C. jacchus</i>
Rio de Janeiro	Petrópolis	Bonfim	6	<i>C. aurita</i>
Rio de Janeiro	Petrópolis	Correias	5	<i>C. penicillata</i>
Rio de Janeiro	Petrópolis	Nogueira1	5	Variados*
Rio de Janeiro	Petrópolis	Nogueira2	11	Híbridos
Rio de Janeiro	Petrópolis	Mosela	7	<i>C. penicillata</i>
Rio de Janeiro	Petrópolis	Caxambú	1	<i>C. penicillata</i>
Rio de Janeiro	Teresópolis	Sede Parnaso-	3	Variados*
Minas Gerais	Juiz de Fora	Floresta	6	<i>C. penicillata</i>
Rio de Janeiro	Guapimirim	CPRJ	16	Variados*
Minas Gerais	Juiz de Fora	CETAS	3	<i>C. penicillata</i> e <i>C. jacchus</i>
São Paulo	Guarulhos	Zoológico	9	<i>C. aurita</i> e híbridos
Distrito Federal	Brasília	CP-UnB	10	<i>C. penicillata</i>
Pernambuco	Recife	CRAS	30	<i>C. jacchus</i>
TOTAL			121	

* - Grupos mistos ou vários fenótipos coletados em um mesmo local.

2.3.2 Análise Molecular

As análises moleculares foram realizados no Laboratório de Diagnósticos por DNA da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, seguindo protocolos de domínio público ajustados, quando necessário, às condições específicas.

As extrações, ampliações, sequenciamentos, alinhamentos e análise de dados foram feitos de 2012 a 2015, de acordo com as ocorrências de coletas de material biológico em campo.

2.3.2.1 Coleta de material biológico

A maioria das amostras foi proveniente de sagüis vivos (de vida livre ou de cativeiro). Nestes casos, foi coletada uma pequena quantidade de sangue (0,2 mL aprox.) através de uma punção da veia femoral (seringa de 3 mL e agulha 13x4) e imediatamente depositadas algumas gotas sobre papel Whatman FTA card (Bioameirca Inc., EUA) específico para transporte e armazenamento de material genético. O sangue depositado nestes cartões foi seco à temperatura ambiente, por no mínimo uma hora, e armazenado para posterior uso como fonte para uma ou mais extrações de DNA.

Alternativamente, algumas amostras (n = 2) foram retiradas de indivíduos mortos (atropelados ou eletrocutados), nestes casos foi extraído um pequeno pedaço de músculo (0,4x0,4x0,4 cm) da região dorsal, ou de fígado, que foi processado para a extração de maneira semelhante às amostras retiradas do cartão de FTA.

2.3.2.2 Extração

Para a extração do DNA, a partir de material biológico em papel FTA, três metodologias foram testadas: o *QIAamp® DNA Investigator Kit* da Qiagen., o *Quelex 100* da Bio-Rad, e o *Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit* da Promega. Para a avaliação das três metodologias de extração foram feitas 12 extrações: dois indivíduos (um macho e uma fêmea) para cada método, com uma duplicata para cada.

O DNA extraído foi quantificado no aparelho *NanoDrop 2000* da Thermo Scientific. Posteriormente foram preparadas reações de PCR utilizando 2,0 µL de DNA das amostras testando concentrações de 2,0; 0,2 e 0,1 ng/ µL O protocolo e os ciclos de temperatura da PCR estão descritos adiante.

O método de extração que empregou o *Kit QIAamp DNA Investigator Kit* da Qiagen, cujo protocolo está descrito abaixo, foi o escolhido pelos bons resultados em pureza e concentração do DNA.

Para cada amostra foi retirado um pedaço aproximado de 9mm² de papel FTA com sangue (ou 64 mm³ aprox. de músculo) e acondicionado em tubos de microcentrífuga, tipo Eppendorf, de 1,5 mL. Após a adição de 280 µL de tampão

ATL e 20 μL de proteinase K, a preparação foi incubada em banho-maria entre 4 a 16 horas a 56°C. Após a digestão, foram adicionados 200 μL do tampão AL, sendo a preparação agitada (Thermolyne 37600 Mixer) e incubada por 10 minutos a 70°C. Foram então adicionados à preparação, 150 μL de etanol absoluto, seguido de mais uma agitação e posterior centrifugação de 2 minutos a 5.000 x g (centrífuga Centrimicro modelo 212).

O lisado foi transferido para coluna de filtração apropriada acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado por 1 minuto a 5.000 x g, sendo posteriormente transferido a um novo tubo coletor. Foram então adicionados 500 μL de tampão AW1, seguida de centrifugação por 1 minuto a 5.000 x g, e de 700 μL de tampão AW2, novamente centrifugado nas mesmas condições.

Ao final do processo, foi realizada uma nova centrifugação por 3 minutos a 12.000 x g, seguida de transferência da coluna para um tubo de 1,5 μL , onde eram adicionados 50 μL de tampão ATE. A amostra era então incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, seguida de centrifugação final por 1 minuto a 12.000 x g.

Os tampões utilizados nesta metodologia de extração de DNA são fornecidos pelo fabricante e acompanham o kit *QIamp® DNA Investigator Kit*, segundo protocolo específico do fabricante (Qiagen).

2.3.2.3 Detecção em gel de agarose

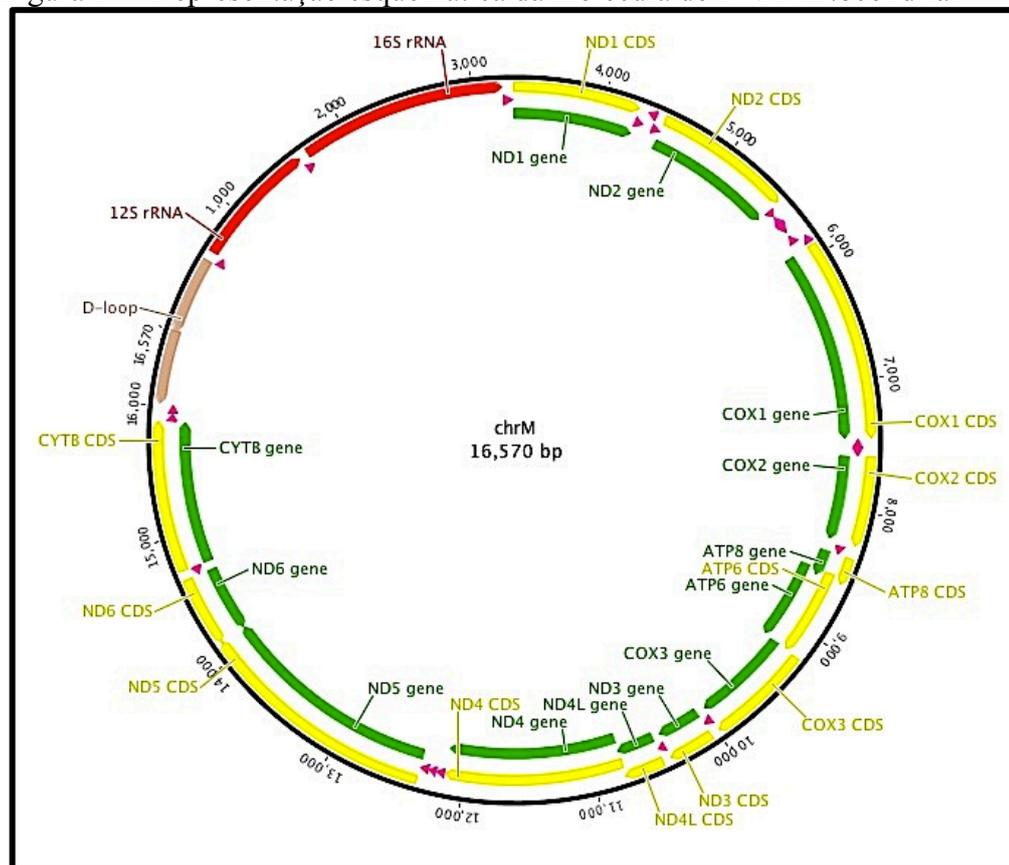
A presença e a qualidade de DNA genômico foi avaliada em gel de agarose 1,0%. Para isso, 5 μL de cada amostra de DNA foram misturados com 1 μL de tampão de amostra *Gel loading Dye* - azul de bromofenol 6X (*Promega Co*), acrescido do corante fluorescente *Gelred* 10.000x diluído (*BiotiumInc., Haward, CA*). No gel também foram adicionados 2 μL do padrão de tamanho molecular 50 pb Ladder (*Invitrogen*). Após o carregamento das amostras e do padrão, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100 volts por 30 minutos para posterior visualização das moléculas utilizando luz UV.

2.3.2.4 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

Caracterização dos marcadores moleculares e dos iniciadores da PCR

Para a amplificação do DNA foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de dois pares de iniciadores (*primers*), sendo um para um trecho do gene citocromo oxidase unidade I (COI) do DNA mitocondrial (Figura 14) e o outro para um trecho do gene SRY (região determinante do sexo no cromossomo Y - *Sex-determining Region Y*) (Tabela 8).

Figura 14 - Representação esquemática da molécula de DNA mitocondrial



Fonte: *Software Geneious 6*

COI - O par de iniciadores para o trecho de COI foi desenhado (com o auxílio do *software Geneious 6.0*), como parte deste estudo, a partir de sequências de primatas da Família Cebidae, para esta região, postadas no *GenBank*. O tamanho resultante para este fragmento foi de 708 pb localizado na primeira metade do gene

completo. Um teste de gradiente de temperaturas, variando de 50°C a 65°C, foi realizado para escolha da temperatura de anelamento (T_m) com melhor resultado de amplificação para o par de *primers*

SRY - O conjunto de *primers* utilizado para amplificação da região de SRY foi desenhado por Nogueira (em preparação) usando a sequência de 850 pb do gene depositada por Moreira (2002) no *GenBank* (LOCUS AF338379). Os *primers* desenhados por Nogueira amplificaram um produto de aproximadamente 200pb, incluindo a região polimórfica alvo, com a deleção de nove pares de bases característica exclusiva de *C. aurita*. Destacamos que na posição 5' do *primer* forward foi incorporado o fluoróforo 6-FAM para permitir a detecção dos produtos de amplificação por fluorescência.

Tabela 8 - Iniciadores de PCR utilizados na amplificação do fragmento do DNA mitocondrial COI e do fragmento de DNA nuclear SRY usados em amostras de sagüis

Marcador	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Referências
COI		
Forward	5' – TTTTCAACCAACCACAAAGACATCGG – 3'	O presente trabalho
Reverse	3' – ACTTCTGGGTGGCCGAAAAATCAGAA – 5'	O presente trabalho
SRY		
Forward	5' – TACAGGCCATGCACAGAGA – 3'	Noqueira, em preparação
Reverse	3' – CTAGCGGGTGTTCATTGTT – 5'	Noqueira, em preparação

2.3.2.5 Amplificação por PCR

COI – Aliquota de 2 µL contendo entre 1 a 2ng de DNA era transferida para tubo estéril para PCR. A reação era composta de 6,25 µL de tampão Platinum 4x (Invitrogen), 0,25 µL de Taq Platinum (5 U/µL), 2 µL de cada *primer forward* e *reverse* (20 pmol /µL) e 12,5 µL de H₂O MiliQ (Tabela 9).

SRY – Aliquota de 2 µL contendo entre 1 a 2ng de DNA era transferida para tubo estéril próprio para PCR. A reação era composta de 2,5 µL de Tampão Platinum 4x , 0,2 µL de Taq DNA platinum (5 U/µL) (Invitrogen), 1 µL de cada *primer* (20 µg/ µL) e 3,3 µL de H₂O MiliQ (Tabela 9).

O termociclador utilizado nas reações de amplificação foi o Veriti (Applied Biosystems) e as condições termocíclicas utilizadas nas reações de amplificação dos dois marcadores são apresentadas na tabela 10.

Tabela 9 – Reagentes combinados na preparação do *MIX* para as reações de PCR dos marcadores de SRY e de COI de sagüis (valores de referência para 1 reação).

MIX	SRY (μL)	COI (μL)
Tampão Platinum 4x	2,5	6,25
Taq DNA platinum (5 U/ μL)	0,2	0,25
Primer F (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1,0	2,0
Primer R(20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1,0	2,0
H ₂ O MilliQ	3,3	12,5

Tabela 10 - Condições termocíclicas das PCRs utilizadas neste trabalho.

SRY			COI		
Ciclos	Tm	Duração	Ciclos	Tm	Duração
	94° C	5 min		95° C	5 min
30 ciclos	94° C 58° C 72° C	60 seg	30 ciclos	94° C 56° C 72° C	60 seg
		60 seg			60 seg
		60 seg			120 seg
	72° C	30 min		72° C	10 min

2.3.2.6 Visualização dos produtos da PCR

Para a verificação inicial dos produtos da amplificação, alíquotas dos produtos de PCR dos marcadores (5 μL) eram misturadas com 1 μL de tampão de carregamento de amostra (*Loading Dye blue 6x /GelRed 10.000x* diluído) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% a 70 volts para posterior visualização em luz UV.

2.3.2.7 Análise por eletroforese capilar de fragmentos e seqüências de DNA

Análise e detecção de fragmentos do marcador SRY

Os produtos de PCR do marcador SRY diferem em tamanho pela presença (inserção) ou ausência (deleção) de um pequeno segmento de nove pares de base, podendo ser separados e detectados por diferença de tamanho após eletroforese capilar quando comparados com um marcador de peso molecular.

Para isso, 1 μL do produto de PCR foi misturado a 8,8 μL de formamida e 0,2 μL do padrão de peso molecular Liz 500. A mistura (10 μL) foi aplicada em um poço em placa de 96 e centrifugada a 1.000 x g, por 1 minuto (*Laboratory Centrifuge 2-16P Sigma*). Em seguida, as amostras foram desnaturadas por incubação por 5 minutos, a 95°C, e posteriormente mantidas em banho de gelo, por 5 minutos até o início da eletroforese capilar no aparelho ABI 3500 ou 3130 (Applied Biosystems). Os fragmentos do marcador SRY foram detectados e analisados após a eletroforese utilizando o software *Gene Mapper 4.1* ou *Geneious R6*.

2.3.2.8 Análise por sequenciamento do marcador COI

Purificação do produto amplificado da PCR

Os produtos amplificados foram purificados – utilizando as enzimas Exonuclease I (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), ambas disponíveis em conjunto em *ExoSAP-IT*(GE®). A enzima Exo I degrada os iniciadores e DNA de cadeia simples enquanto a SAP desfosforila os dNTPs em solução.

Após as reações de PCR, 2,0 μL da *ExoSAP-IT*® eram adicionadas a 5 μL do produto amplificado, sendo a mistura incubada a 37°C, por 15 minutos, seguindo-se de uma incubação por 15 minutos, a 85°C para promover a inativação das enzimas, de acordo com as indicações do fabricante. As incubações foram realizadas no termociclador *GeneAmp 9700* da Applied Biosystems.

2.3.2.9 Sequenciamento

Os produtos de amplificação purificados foram sequenciado pelo método cíclico de terminação de cadeia (Sanger e Nicklen, 1977; Sanger *et al.*, 1973). Os

mesmos pares de iniciadores usados na reação de PCR foram utilizados individualmente para dirigir a síntese de uma nova fita.

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o produto *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ReactionKit v3.0*, (*Applied Biosystems*, Co).

Tabela 11 – Protocolo para o *Mix* usado nas reações de sequenciamento.

MIX	Concentração	SRY (μL)	Concentração	COI (μL)
Tampão (5x)		2,0		6,25
BigDye		2,0		0,25
Primer F ou R	(10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1,0	(10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2,0
H ₂ O MiliQ		3,0		12,5

As reações foram realizadas em microtubos adicionando-se 2,0 μL do produto da PCR purificado, resultando em um volume final de 10 μL . As reações de sequenciamento eram procedidas nos termocicladores 9700 ou Veriti (*Applied Biosystems*), nas condições descritas na tabela (Tabela 11).

Para a reação de sequenciamento foi utilizada a razão de 2 μL de BigDye, 2 μL de Tampão (5x), 1 μL de primer a 10 pmol/ μL (forward separado do reverse) e 3 μL de μL de H₂O MiliQ para 2 μL de DNA a 10 ng/ μL . .

O programa de sequenciamento foi feito com 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C mais 5 minutos a 60 °C por 25 ciclos (Tabela 12).

Tabela 12 - Condições termocíclicas para as reações de sequenciamento dos marcadores de mtDNA de sagüis

Ciclos	Temperatura	Duração
25 ciclos	95° C	10 seg
	50° C	5 seg
	60° C	4 min

2.3.2.10 Purificação dos produtos da reação de sequenciamento em resina *Sephadex G-50*

Após a reação, cada produto de sequenciamento foi purificado em resina Sephadex G-50. Esse método é baseado na separação das moléculas de ácidos nucleicos de tamanhos diferentes por exclusão em resina de *Sephadex* (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989).

O preparo da purificação consistiu na aplicação de 750 µL da suspensão (contendo 10 g de *Sephadex* em 150 mL de água ultra pura) em uma coluna de purificação colocada dentro de um tubo de 1,5 mL e centrifugada a 5.000 x g, por 1 minuto e 30 segundos (Centrifuga Centrimicro 242 - FANEM). O filtrado foi descartado e a coluna, após a centrifugação nas mesmas condições, foi então transferida para um novo tubo de 1,5 mL, sendo a ela então adicionado o volume total da reação de sequenciamento, seguindo-se de nova centrifugação a 5.000 x g, por 3 minutos. Cada sequenciamento gerou um filtrado imediatamente utilizado para a reação de eletroforese capilar.

2.3.2.11 Preparação das amostras e eletroforese capilar

Após a purificação em resina *Sephadex* G-50, ao filtrado de cada amostra foram adicionados 10 µL de formamida (*Hi-Di Formamide, Applied Biosystems*). Aproximadamente 10 µL da mistura foram aplicados em placas de 96 de poços e centrifugada a 1.000 x g, por 1 minuto em centrífuga *Laboratory Centrifuge 2-16P* (Sigma). Antes de ser colocada no sequenciador as amostras (na placa) foram desnaturadas por incubação por 5 minutos a 95°C e, posteriormente mantidas em banho de gelo, por 5 minutos, ou até o início da eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3500 (Applied Biosystems)*, com a utilização do polímero POP-7TM (*Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems, Co)*) e de capilares *Avant Capillary Array 50 cm (Applied Biosystems)*.

Nesta eletroforese capilar os dideoxirribonucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos, quando excitados por uma fonte de alta energia, emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda permitindo sua detecção e mensuração. O resultado é ordenado por tamanho e representado por um eletroferograma onde são observados picos resultantes do processo de emissão,

detecção e transformação do sinal luminoso, que são visualizados em unidades relativas de fluorescência (RFU).

2.3.2.12 Alinhamento e análise das sequências

Os eletroferogramas obtidos foram analisados através do software *Sequencing Analysis 3.7* (Applied Biosystems) para a determinação da qualidade das sequências. O alinhamento e edição das mesmas foram feitos com a utilização dos softwares BioEdit 7.053 (Hall, 1999); , Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), ambos utilizando o recurso ClustalW (Thompson, Higgins e Gibson, 1994) e/ou Geneious R6 ajustado na opção padrão (“geneious alignment”).

Após o alinhamento, as sequências foram avaliadas visualmente e eventualmente corrigidas manualmente (usando o software Geneious R6) considerando as semelhanças entre as sequências F e R. Uma sequência consenso foi extraída e alinhada com as demais sequências consensos.

A maioria das amostras foi sequenciada para o marcador mitocondrial COI e algumas sequências foram analisadas no contexto total somente com a participação de uma fita (F ou R). Como nem todas as sequências de COI atingiram o tamanho total de 708 pares de bases, um corte de cada extremo de todas as sequências foi feito de modo a obter todas com o mesmo número de bases (595 pb).

Depois de igualadas em tamanho as sequências de COI foram transferidas em formato *fasta* para o software *Arlequin* onde foram identificados os haplótipos contidos no total de sequências. A sequência de cada haplótipo identificado foi nomeada com um nome para cada agrupamento.

Usando o programa Geneious R6 foi feito o alinhamento dos haplótipos de COI somados à uma sequência (do mesmo trecho de COI) de uma espécie de outro gênero de primata, o *Saguinus midas*, que foi usada como sequência de referência para construção de um ancestral hipotético. Este ancestral hipotético serviu como uma referência para a identificação dos tipos de mutação ocorridas em cada haplótipo. A partir disso, duas árvores foram feitas manualmente em uma planilha Excel indicando cada mutação pelo seu número, posição (quando não no 3º códon) e tipo. Também foi indicado o número de indivíduos representados por cada haplótipo

dentro de um círculo de área proporcional à quantidade de indivíduos do agrupamento.

O software Geneious R6 ofereceu a opção de realizar a tradução das sequências dos haplótipos alinhados. Essa ferramenta foi utilizada com as opções de início pela 2ª base (“FRAME 2”) e com a referência “Vertebrate Mitochondrial” para a seleção dos aminoácidos.

2.3.2.13 NETWORK e Critério de seleção de modelo (AIC).

As sequências dos haplótipos de COI foram inseridas no programa computacional NETWORK para a construção de uma rede. Também foram inseridas no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) onde foi rodado o teste para definição do melhor modelo de substituição de nucleotídeos para a criação de árvores filogenéticas com base no critério de seleção de Akaike (AIC).

2.3.2.14 Árvores filogenéticas

Duas árvores filogenéticas para o marcador COI foram produzidas pelo software Geneious R6 usando os modelo HKY e K2P (Kimura, 1980) de substituição de nucleotídeos e os método de Neighbor-Joining e de Máxima Verossimilhança de construção de cada árvore respectivamente, uma com 500 repetições (bootstrap) e outra com 1000 repetições para valoração dos nós de separação, isto é, o suporte entre os agrupamentos (Felsenstein, 1985). Também foi feita uma matriz de distância genética entre os haplótipos com valores absolutos de bases diferentes entre duplas de haplótipos acompanhados do valor percentual da diferença e dos valores de K2P.

2.3.2.15 Tabela de identificação de híbridos

Para a identificação dos indivíduos híbridos foi feito um conjunto de tabelas que identifica os grupos coletados, a localidade, o “nome” de cada indivíduo, o

haplótipo de COI de cada indivíduo, o tipo de SRY (com deleção ou sem deleção) e o sexo dos sagüis individualmente.

2.4 Resultados

2.4.1 Padronizações laboratoriais

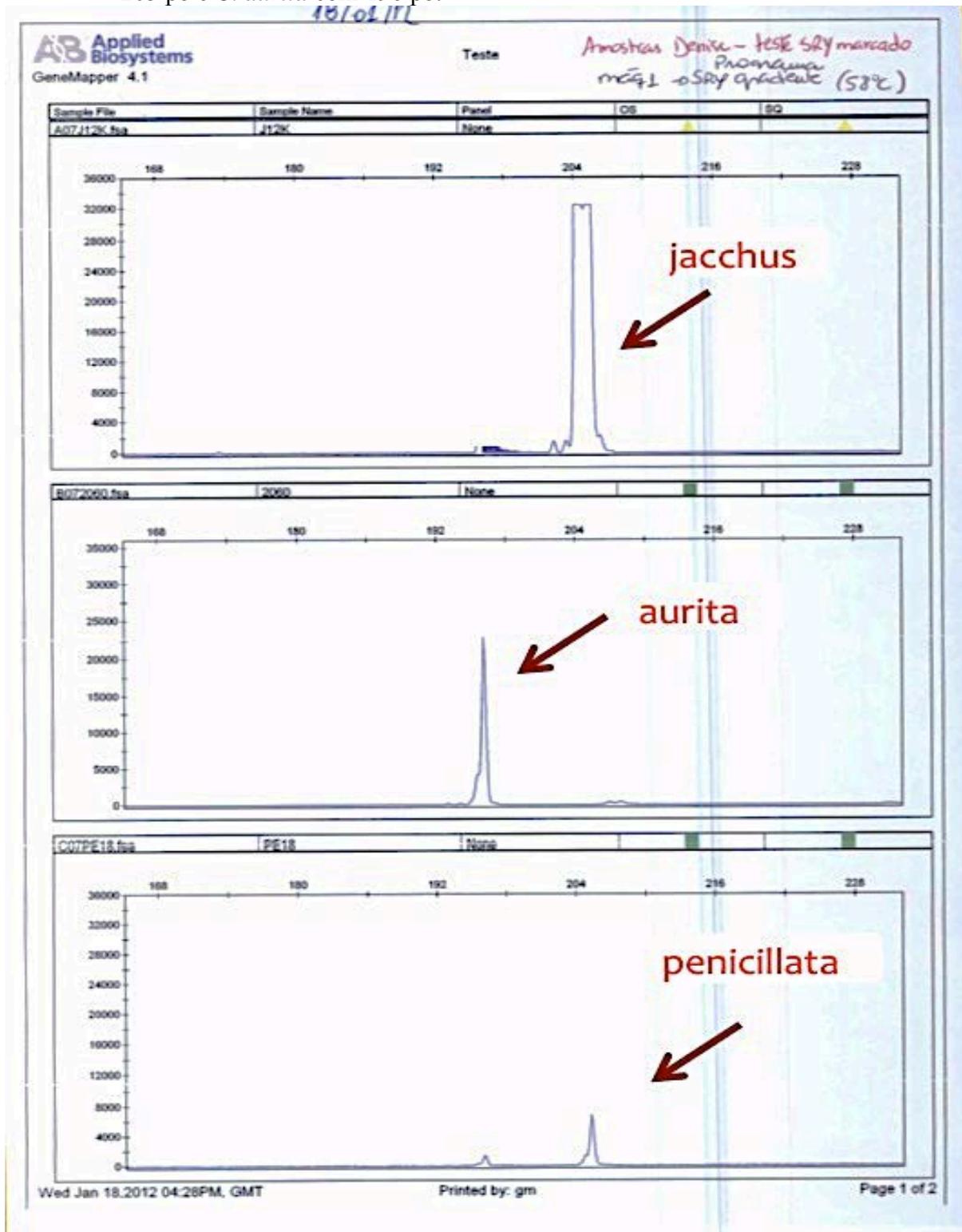
Os testes de amplificação geraram resultados em que o kit da Qiagen foi selecionado pela qualidade da extração e facilidade de execução (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultado das concentrações de DNA de dois sagüis obtidas no NanoDrop a partir de três métodos de extração.

Indivíduos	Método	Amostra	(ng/ μ L)	abs 260/280	abs 260/230
Macho 1	Qiagen	1	12,0	2,05	0,08
Macho 1	Qiagen	2	12,2	2,02	0,08
Fêmea 6	Qiagen	3	11,4	2,10	0,08
Fêmea 6	Qiagen	4	11,0	1,99	0,08
Macho 1	Chelex	B1	7,9	0,73	0,10
Macho 1	Chelex	B2	76,6	0,51	0,16
Fêmea 6	Chelex	A1	6,1	0,54	0,11
Fêmea 6	Chelex	A2	56,0	0,45	0,17
Macho 1	Maxwell	IIA	2,7	2,15	0,23
Macho 1	Maxwell	IIB	3,6	1,53	0,30
Fêmea 6	Maxwell	IA	4,8	1,87	0,33
Fêmea 6	Maxwell	IB	6,3	2,12	0,02

Em seguida foram realizados testes com o primer para o gene SRY do cromossoma sexual Y elaborado por Nogueira (2010), para avaliar as condições de PCR necessárias; a concentração de DNA de melhor aproveitamento foi de 0,2ng/ μ L e o teste reafirmou os resultados encontrados por Nogueira (2010) em que se vê uma deleção de nove pares de bases para a *C. aurita*, e que não ocorreu nos demais indivíduos (*C. penicillata* e *C. jacchus*) (Figura15).

Figura 15 – Eletroferogramas para SRY mostrando *C.jacchus* e *C. penicillata* com picos de 205 pb e *C. aurita* com 196 pb.



2.4.2 Análise do marcador COI para amostras de sagüi

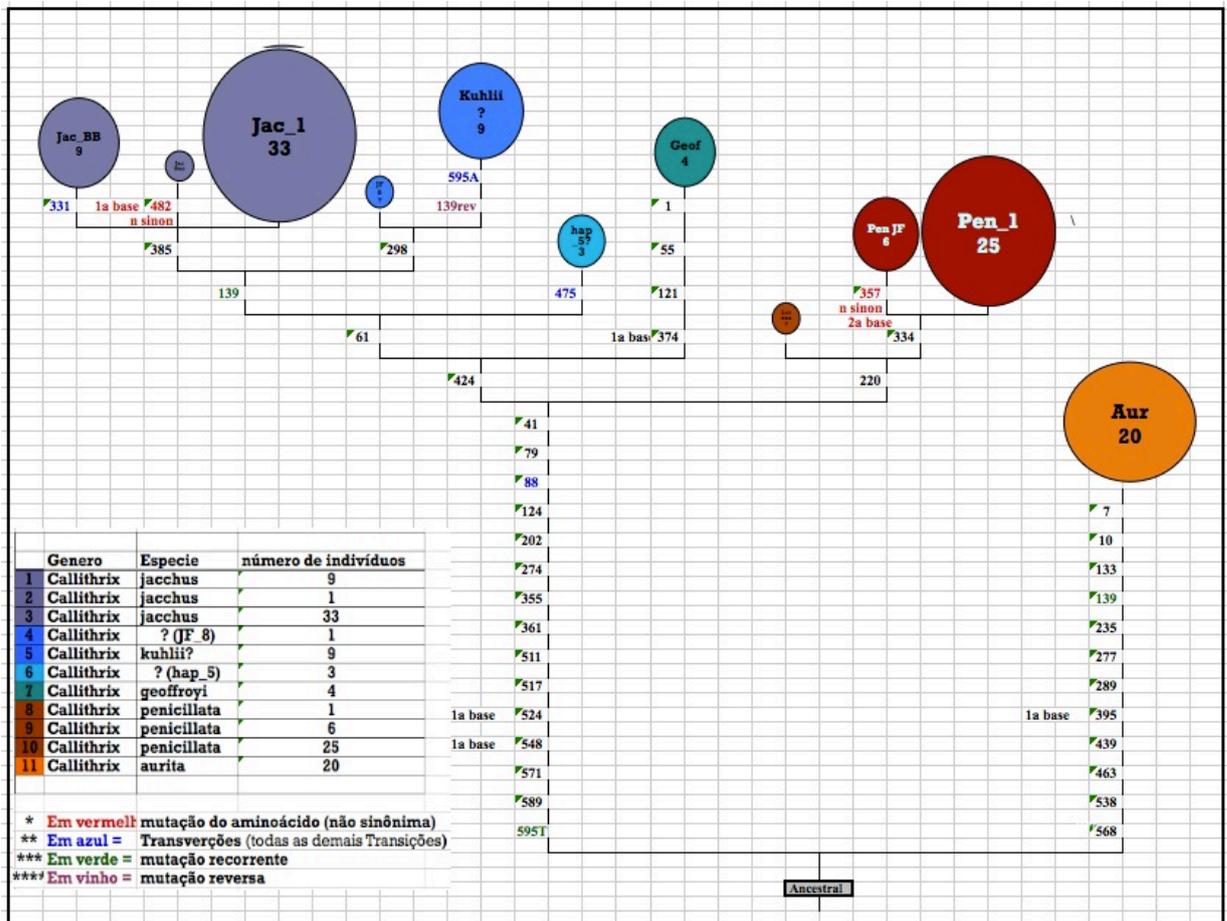
Os sequenciamentos feitos, usando o marcador molecular mitocondrial Citocromo oxidase unidade I (CO I), geraram 112 sequências analisáveis que se separaram em 11 haplótipos de aproximadamente 600 pares de bases.

Os haplótipos foram denominados com o nome das espécies segundo os indivíduos que fenotipicamente e/ou geograficamente serviram como identificadores de chave, desta forma o **haplótipo 1 – “Jac1”** – foi nomeado considerando os indivíduos coletados em Recife, região geográfica que garante a procedência do nome específico, esse haplótipo foi encontrado em 33 indivíduos incluindo também espécimes coletados no sudeste; o **haplótipo 2 – “Jac2_Rec”** – foi originado por um único indivíduo também coletado em Recife com apenas uma mutação de diferença em relação ao haplótipo 1, uma mutação não sinônima dentre as duas mutações não sinônimas que ocorreram; o **haplótipo 3 – “Jac3_BB”** – é composto por seis indivíduos provenientes do Bosque da Barra, um bosque isolado por área intensamente urbanizada do Rio de Janeiro e com indivíduos de fenótipo marcadamente “jacchus”; o **haplótipo 4 – “JF_8”** – também foi gerado por um único indivíduo amostrado no CETAS (centro de triagem de animais silvestres) da cidade de Juiz de Fora em Minas Gerais, porém tido como proveniente do extinto zoológico de Niterói; o **haplótipo 5 – “Hapl_5”** não ganhou nome de região ou espécie pois foi gerado por três indivíduos muito díspares entre si, dois amostrados no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ_10 e CPRJ_11) classificados como *C. jacchus*, e o terceiro indivíduo amostrado no Centro de Primatologia de Brasília (Bra_8) ; o **haplótipo 6 – “Kuhlii?”** – ganhou o nome por ter entre seus nove indivíduos uma amostra proveniente da Bahia e nomeada como *C. kuhlii*, entre outras vindas de diferentes regiões (CPRJ_4, CPRJ_6, CPRJ_7, CPRJ_13, CPRJ_15, OT_9, JF_9 e TerePen_2), contudo não houve uma avaliação de um especialista na espécie para garantir a procedência taxonômica; o **haplótipo 7 – “Pen1”** – é compartilhado por 25 indivíduos de diferentes procedências sendo uma delas do CP-UnB (Bra_10), área de distribuição geográfica do *C. penicillata*; o **haplótipo 8 – “Lorena”** – composto por um único indivíduo amostrado no CPRJ (CPRJ_12) e tendo em sua ficha a origem da cidade paulista de Lorena; o **haplótipo 9 – Pen2_JF**

– originado de seis indivíduos, sendo cinco oriundos de um grupo de vida livre coletado na cidade de Juiz de Fora (MG) e o sexto do CPRJ (CPRJ_16) tendo em sua ficha a origem da cidade Saquarema (RJ); o **haplótipo 10 – “Geof”** – tem como origem três sagüis do CPRJ classificados como *C. geoffroyi* e, junto a esses três, compartilhando a mesma seqüência molecular, está um indivíduo (JF_5) coletado no mesmo grupo de vida livre coletado na cidade de Juiz de Fora (MG); por fim o **haplótipo 11 – Aur** – nomeado a partir de indivíduos de vida livre capturados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) na sede da cidade de Petrópolis (RJ) e também por indivíduos coletados no CPRJ e no Zoológico de Guarulhos (SP), os 20 indivíduos que compõem esse agrupamento foram classificados por padrões fenotípicos como *C. aurita*, puros ou como híbridos com *C. aurita*.

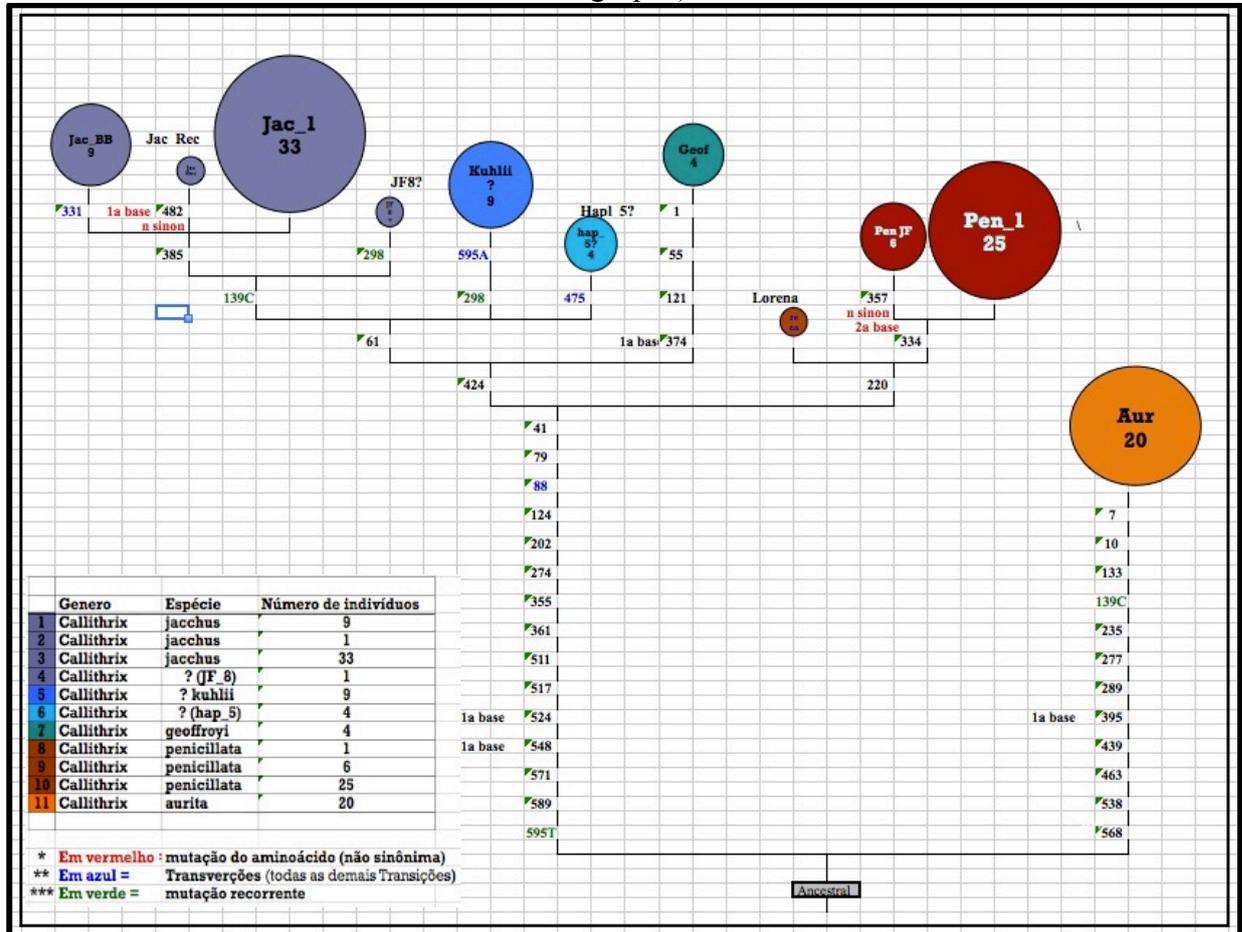
A comparação das bases destes haplótipos alinhados com o mesmo segmento de CO I extraído de um espécime próximo filogeneticamente (*Sagüinus midas*), possibilitou uma proposição de bases ancestrais a partir dos 44 sítios que apresentaram mutações, originando um ancestral hipotético. A árvore abaixo representa uma análise realizada no software NETWORK mostrando as distâncias, por bases mutadas, a partir do referido ancestral hipotético. A construção de um ancestral permitiu uma visualização relativizada da distância entre o grupo dos *C. aurita* e os demais grupos unidos todos em outro clado, e apresentou um número equilibrado de mutações para ambos os lados (15 que unem o clado de várias espécies, 12 exclusivas para os *C. aurita* e 5 ambíguas não incluídas), como seria esperado se for considerado um tempo evolutivo equivalente de mutações para cada grupo que partiram de um mesmo ancestral (Fig. 16).

Figura 16 - Árvore dos haplótipos de *Callithrix* separados pelas diferenças de nucleotídeos entre os grupos ressaltando transversões, mutações recorrentes, mutações reversas e mutações não sinônimas. Esta árvore mostra a opção de agrupamento pela reversão da base 139 (As áreas das circunferências são proporcionais ao número de indivíduos dentro dos grupos).



Um outro arranjo é possível para o ramo definido pela mutação 61 juntando o grupo identificado como “Kuhlii?” ao “Hap 5” e separando-o do “JF 8” que fica, por sua vez, unido aos 3 grupos de “Jac” (Fig. 17). A causa dessas duas árvores possíveis é a coincidência duplicada das mutações (mutações recorrentes) de número 139 e 298. Na primeira árvore a mutação 139 agrupa todos os “Jac” com “Kuhlii?” e com “JF_8”, estes dois últimos separados dos primeiros pela exclusiva mutação 298, mas sendo que o grupo “Kuhlii?” reverte a 139. Na segunda árvore (Fig. 18) a mutação 139 une os três “Jac” ao “JF_8” enquanto o grupo “Kuhlii?” fica de fora mas tendo com o “JF_8” uma mutação recorrente mutação, a 298.

Figura 17 - Árvore dos haplótipos de *Callithrix* separados pelas diferenças de nucleotídeos entre os grupos ressaltando transversões, mutações recorrentes e mutações não sinônimas estão diferenciadas (esta árvore mostra a opção de agrupamento pela recorrência da base 298. As áreas das circunferências são proporcionais ao número de indivíduos dentro dos grupos).



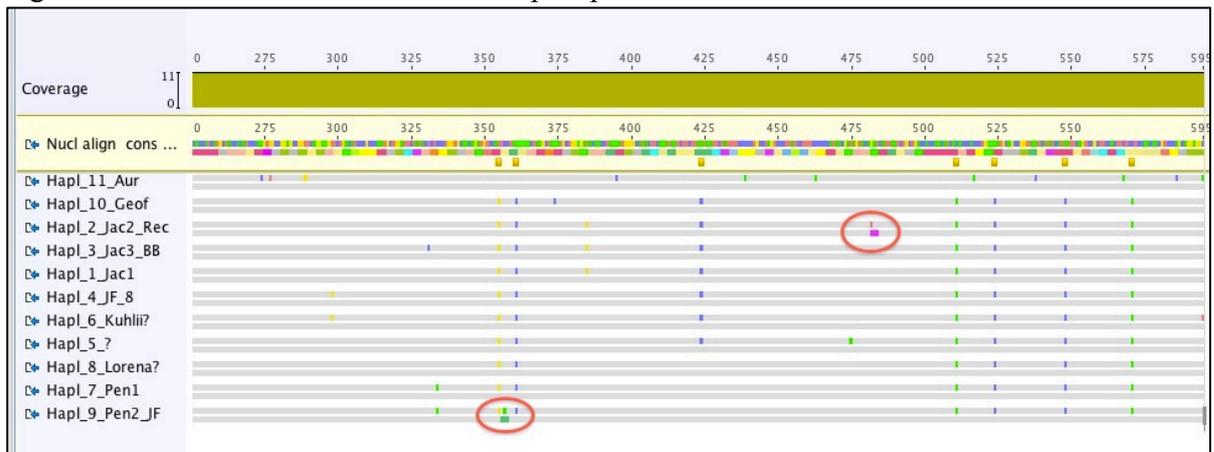
Dos 44 sítios polimórficos, somente quatro apresentaram transversões, sendo as demais todas transições. Cinco mutações ocorreram na 1ª base, uma na 2ª base e todas as demais na 3ª base. Somente duas mutações resultaram como originárias de códons de tradução não sinônimas

A opção de seleção “Vertebrate Mitochondrial” gerou duas mudanças de aminoácidos (mutação não sinônima), uma pela mutação (transição) da citosina (pirimidina) para timina (pirimidina) na segunda base (357), que mutou o aminoácido treonina para isoleucina, ocorrida exclusivamente para o haplótipo “Hapl_9_Pen2_JF”, e outra pela mutação da guanina (purina) para adenina (purina)

na primeira base (482), que mudou o aminoácido valina para metionina ocorrida exclusivamente para o haplótipo “Hapl_2_Jac_2_Rec (Fig. 18).

A tradução realizada pelo software não apresentou nenhuma falha de tradução (trechos de três bases não traduzidos) que seriam mostrados como asteriscos na imagem.

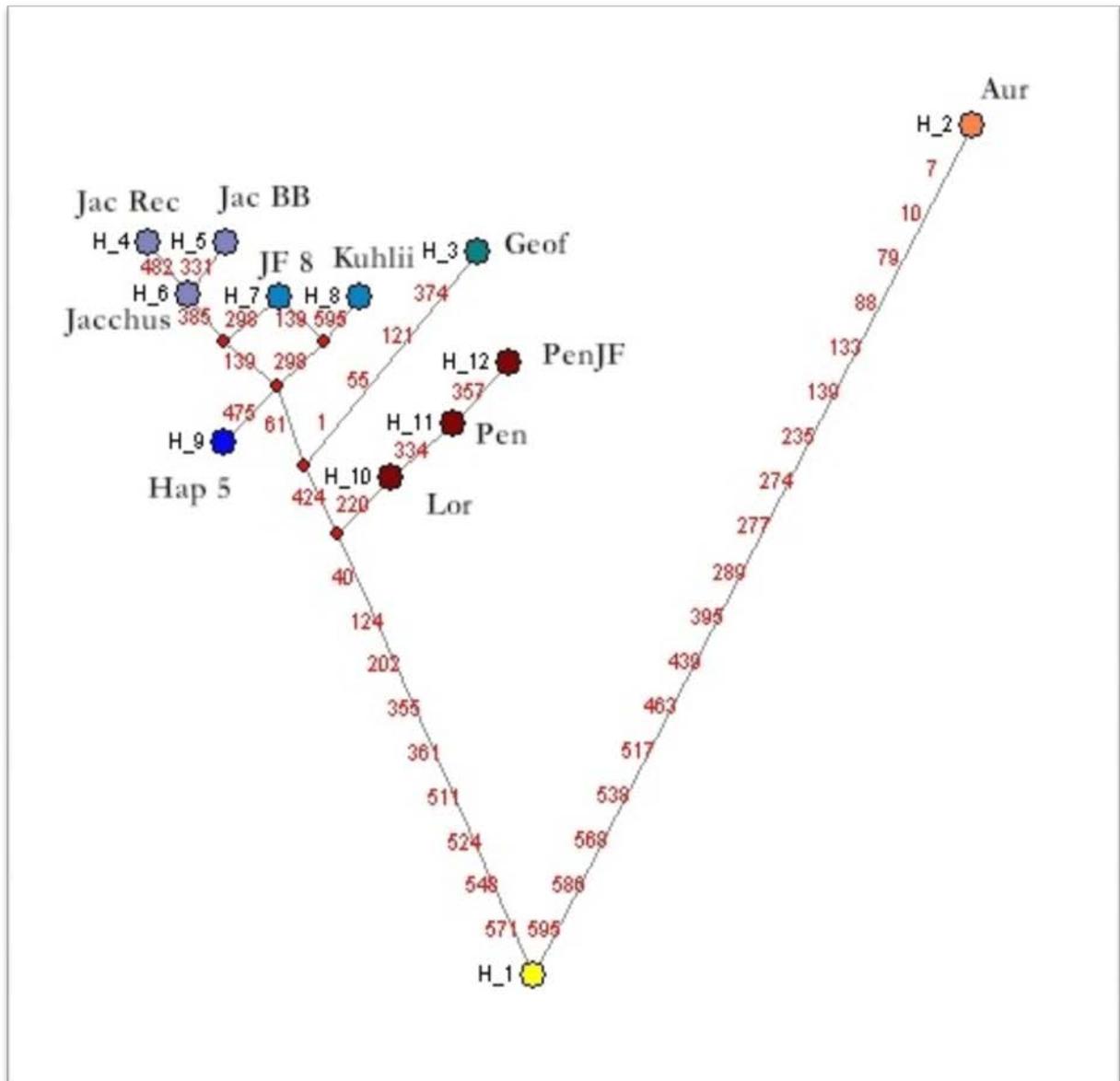
Figura 18 - Trecho do alinhamento do haplótipos de CO I



Legenda: traços pequenos coloridos as mutações de bases em relação a hipotética sequência ancestral e os traços largos, evidenciados pelos círculos vermelhos, marcam as duas únicas mutações que geraram mudanças de aminoácidos (software Geneious 6)

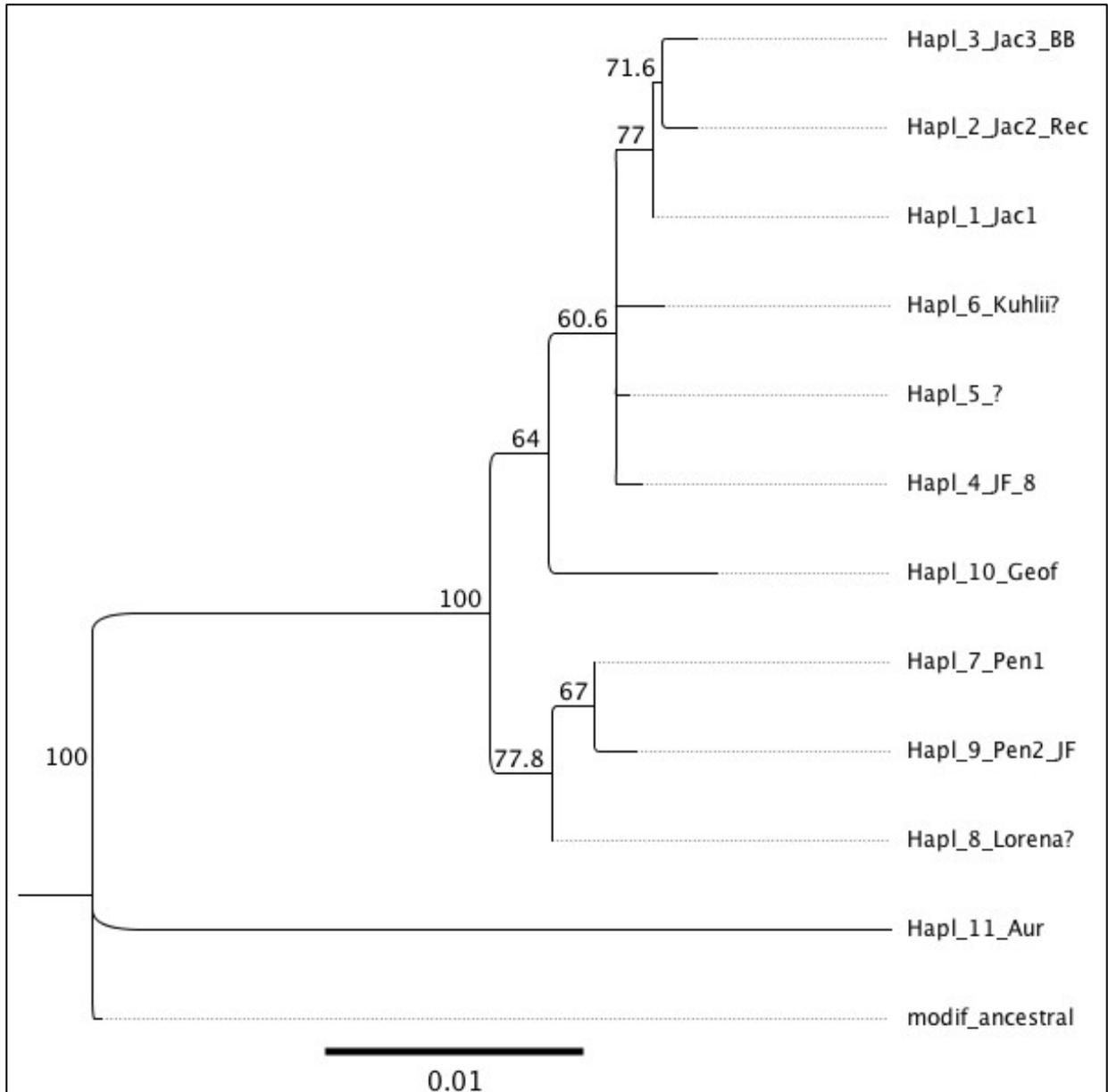
A figura gerada pelo software NETWORK (Fig. 19) mostra a mesma separação delineada na árvore feita manualmente, mas com parâmetros ligeiramente diferentes. Uma característica que fica evidente é a não resolução entre os possíveis caminhos que distinguem a separação a partir da mutação 61.

Figura 19 - Network de distância genética por diferença de nucleotídeos entre 11 haplótipos de *Callithrix* sp. com referência a um haplótipo de ancestral hipotético (H₁).



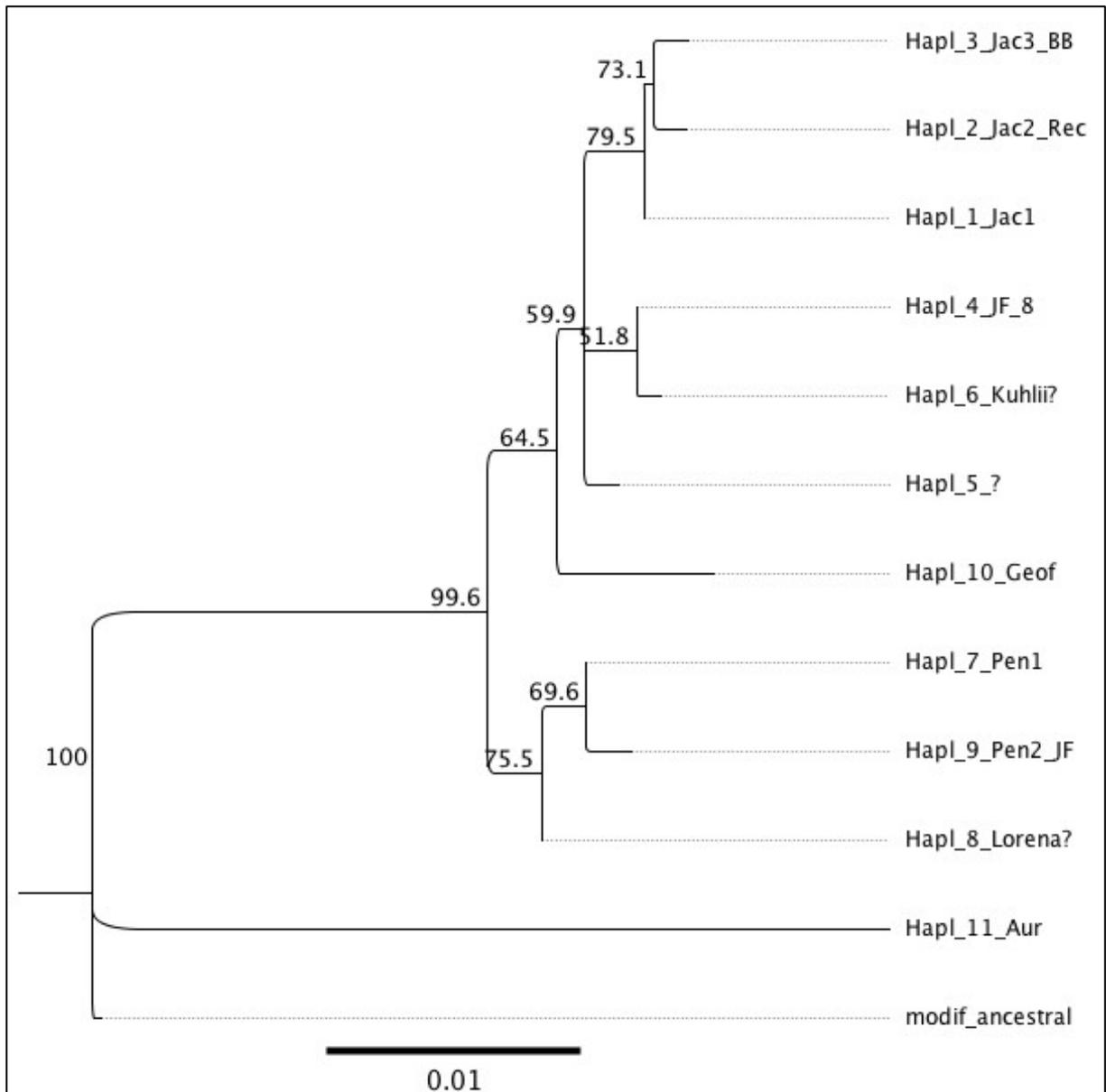
O menor valor de AIC definiu o modelo HKY (*Hasegawa-Kishono-Yano*) como o melhor modelo de distância genética para o grupo de haplótipos presentes. A árvore gerada usando o modelo de distância genética HKY e o método Neighbor-Joining para construção da árvore teve seus nós valorados pela metodologia de *bootstrap* (500 repetições) (Fig.20).

Figura 20 – Árvore (produzida pelo software Geneious 6.0) do marcador COI usando o modelo de Neighbor-Joining e HKY de substituição de nucleotídeos, para 595 pb de 11 haplótipos de *Callithrix* sp. Os valores sobre os nós representam a porcentagem de 500 repetições do teste de confiabilidade (*bootstrap*).



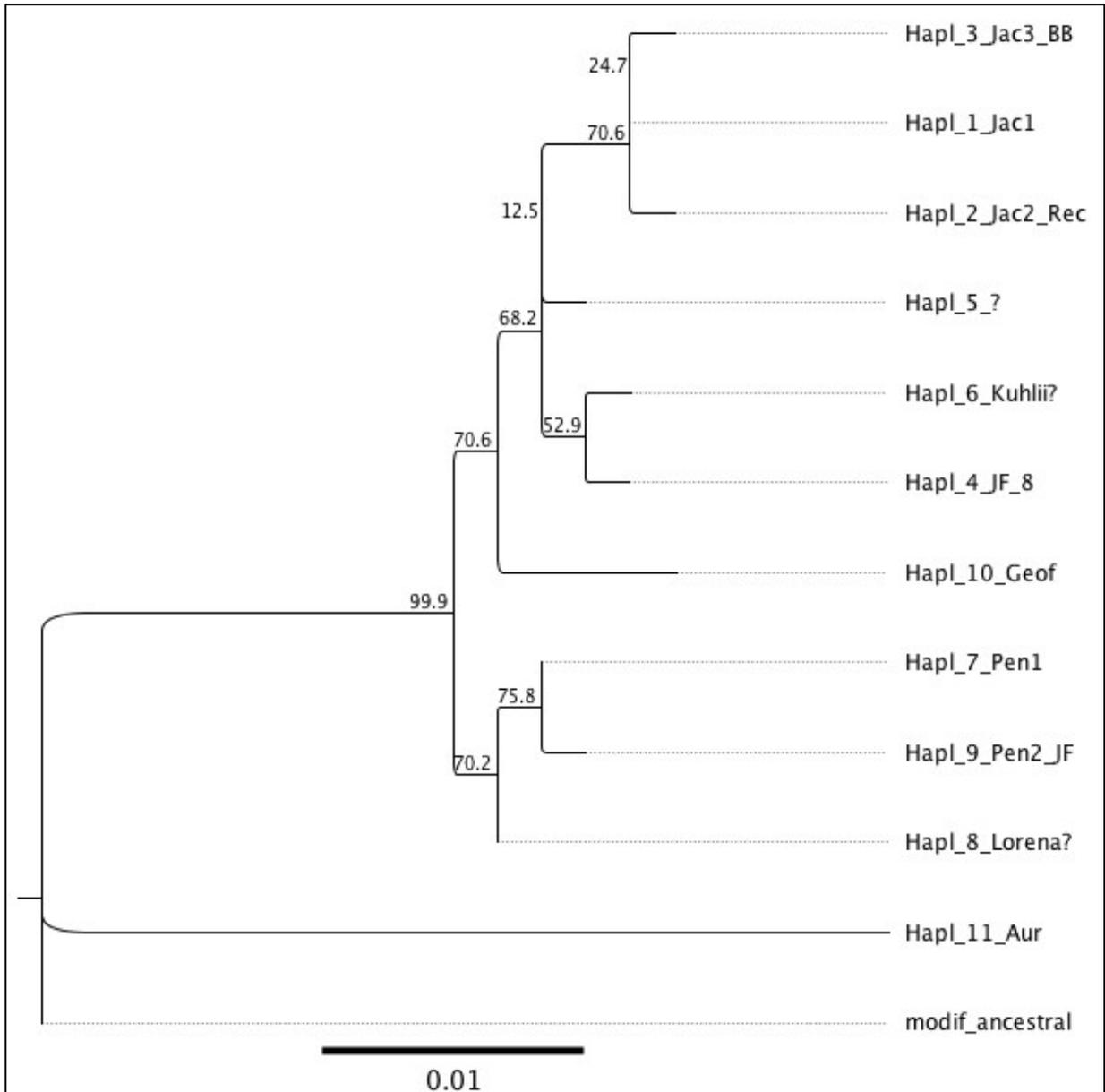
A mesma árvore gerada com os mesmos parâmetros exceto pelo número de repetições para os valores de *bootstrap*, que de 500 foi elevado para 1000, apresentou uma diferença em relação à anterior, agrupando os haplótipos “Kuhlii?” com “JF_8” e separados do “Hapl_5_?” (Fig. 21).

Figura 21 - Árvore (produzida pelo software Geneious 6.0) do marcador COI usando o modelo de Neighbor-Joining e HKY de substituição de nucleotídeos, para 595 pb de 11 haplótipos de *Callithrix* sp. Os valores sobre os nós representam a porcentagem de 1000 repetições do teste de confiabilidade (*bootstrap*).



A árvore rodada usando o método de máxima verossimilhança (ML), o modelo de distâncias K2P (Kimura, 1980) e com 1000 repetições resultou em uma árvore semelhante à anterior, onde não houve novo agrupamento, ficando unidos os haplótipos “Kuhlii?” com “JF_8 ” (Fig. 22).

Figura 22 - Árvore (produzida pelo software Geneious 6.0) do marcador COI usando máxima verossimilhança e modelo K2P para 595 pb de 11 haplótipos de *Callithrix* sp. Os valores sobre os nós representam a porcentagem de 1000 repetições do teste de confiabilidade (*bootstrap*).



A matriz de distâncias (Tabela 14) mostra a separação por número de bases mutadas e a porcentagem de diferença absoluta entre um haplótipo e outro (*p-distance*) na metade inferior, e na metade superior mostra os valores atribuídos para o cálculo das distâncias genéticas pelo software *Geneious 6.1* considerando o modelo K2P (Kimura, 1980). Desconsiderando o ancestral hipotético, não ocorre distância maior do que oito bases mutadas (o que corresponde a 1,36%) entre nenhuma das combinações entre grupos, exceto para o clado dos *C. aurita* que tem no mínimo 28 (4,7%) bases diferentes do “Hapl_8_Lorena?” e no máximo 32 (5,4%) de diferença para o “Hapl_10_Geof”. Também pode ser notado (realçado em negrito) a mesma pequena distância de duas mutações (0,3%) que separam o “Hapl_4_JF_8” igualmente do “Hapl_6_Kuhlii?” e do “Hapl_1_Jac1”. O modelo K2P gerou valores de distância com algumas diferenças em relação aos valores absolutos da porcentagem, pode-se ver (realçado em itálico) os maiores valores entre todos os haplótipos excetuando-se o ancestral hipotético e os *C. aurita*. Esses valores se referem a três ocorrências de 1,36 sendo todos relacionados ao haplótipo “Hapl_10_Geof” separando-se dos grupos “Hapl_2_Jac2_Rec”, “Hapl_3_Jac3_BB” e do “Hapl_9_Pen_2_JF”.

Realçado em negrito estão destacados os valores diferentes atribuído pelo modelo ao mesmo número de mutações (duas mutações) que separam os pares “Hapl_4_JF_8” do “Hapl_1_Jac1” ($K2P = 0,68$), e o mesmo haplótipo “Hapl_4_JF_8” do “Hapl_6_Kuhlii?” com metade do valor ($K2P = 0,34$). Todos as distâncias entre o “Hapl_11_Aur”, do grupo de *C. aurita*, e os demais haplótipos tiveram valores acima de 5,0, exceto para o haplótipo “Hapl_8_Lorena?” que ficou em 4,98.

Tabela 14 - Distâncias entre pares de haplótipos em valores absolutos, de diferença nucleotídeos sobre o valor em porcentagem (na metade inferior), e em valores de distância genética segundo o modelo K2P (na metade superior)

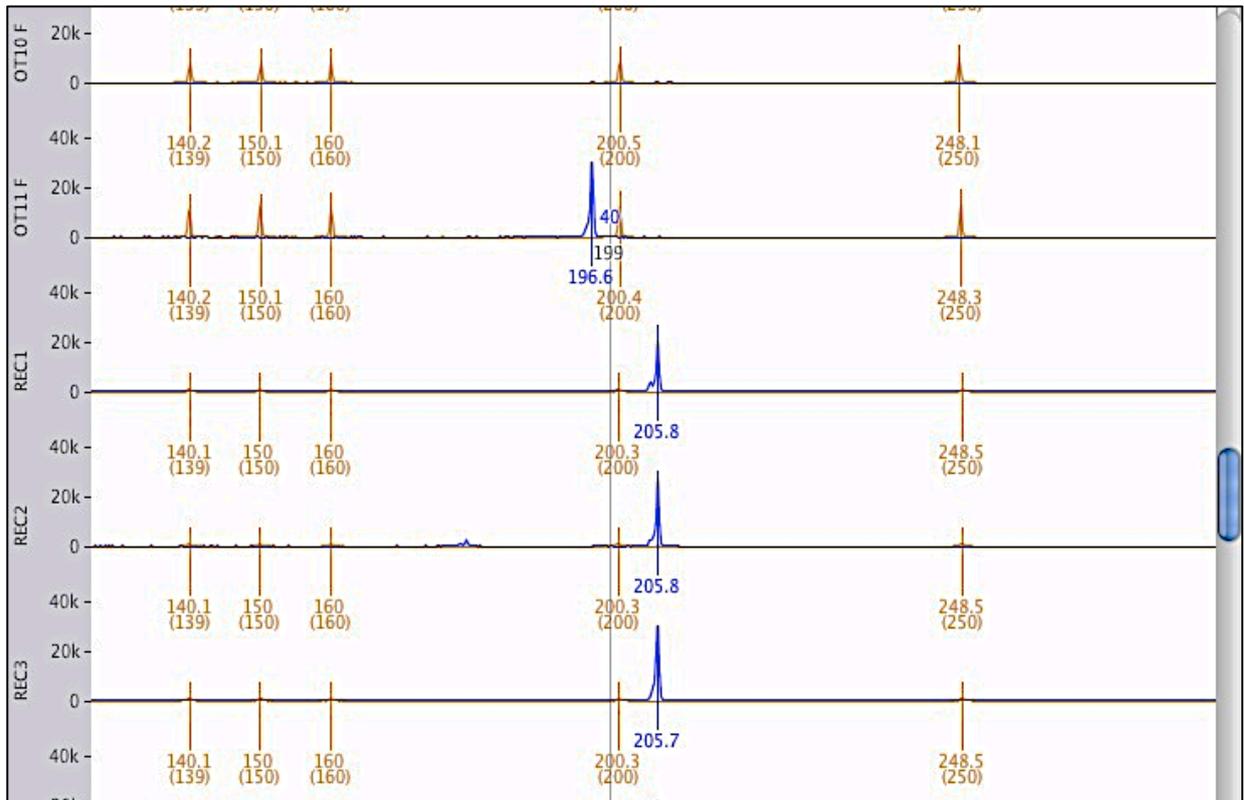
	Ancestral hipot.	Hapl_11_Aur	Hapl_10_Geof	Hapl_2_Jac2_Rec	Hapl_3_Jac3_BB	Hapl_1_Jac1	Hapl_4_JF_8	Hapl_6_Kuhlili?	Hapl_5_?	Hapl_8_Lorena?	Hapl_7_Pen1	Hapl_9_Pen2_JF
Ancestral hipot.		3,24	2,43	2,42	2,42	2,25	2,25	2,25	2,08	1,74	1,91	2,08
Hapl_11_Aur	18 (3,0%)		5,67	5,66	5,66	5,49	5,49	5,49	5,32	4,98	5,15	5,32
Hapl_10_Geof	14 (2,4%)	32 (5,4%)		1,36	1,36	1,19	1,19	1,2	1,03	1,03	1,2	1,36
Hapl_2_Jac2_Rec	14 (2,4%)	30 (5,0%)	8 (1,3%)		0,34	0,17	0,84	0,85	0,68	1,02	1,19	1,35
Hapl_3_Jac3_BB	14 (2,4%)	30 (5,0%)	8 (1,3%)	2 (0,3%)		0,17	0,85	0,85	0,68	1,02	1,19	1,35
Hapl_1_Jac1	13 (2,2%)	29 (4,9%)	7 (1,2%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)		0,68	0,68	0,51	0,85	1,02	1,19
Hapl_4_JF_8	13 (2,2%)	29 (4,9%)	7 (1,2%)	3 (0,5%)	3 (0,5%)	2 (0,3%)		0,34	0,51	0,85	1,02	1,18
Hapl_6_Kuhlili?	13 (2,2%)	30 (5,0%)	7 (1,2%)	5 (0,8%)	5 (0,8%)	4 (0,7%)	2 (0,3%)		0,51	0,85	1,02	1,19
Hapl_5_?	12 (2,0%)	30 (5,0%)	6 (1,0%)	4 (0,7%)	4 (0,7%)	3 (0,5%)	3 (0,5%)	3 (0,5%)		0,68	0,85	1,02
Hapl_8_Lorena?	10 (1,7%)	28 (4,7%)	6 (1,0%)	6 (1,0%)	6 (1,0%)	5 (0,8%)	5 (0,8%)	5 (0,8%)	4 (0,7%)		0,17	0,34
Hapl_7_Pen1	11 (1,8%)	29 (4,9%)	7 (1,2%)	7 (1,2%)	7 (1,2%)	6 (1,0%)	6 (1,0%)	6 (1,0%)	5 (0,8%)	1 (0,2%)		0,17
Hapl_9_Pen2_JF	12 (2,0%)	30 (5,0%)	8 (1,3%)	8 (1,3%)	8 (1,3%)	7 (1,2%)	7 (1,2%)	7 (1,2%)	6 (1,0%)	2 (0,3%)	1 (0,2%)	

2.4.3 SRY

Foram feitos dois tipos de abordagem para a análise da parte do cromossoma Y denominado de SRY: a análise por tamanho de fragmento (Fig. 23) e o sequenciamento (Fig. 24).

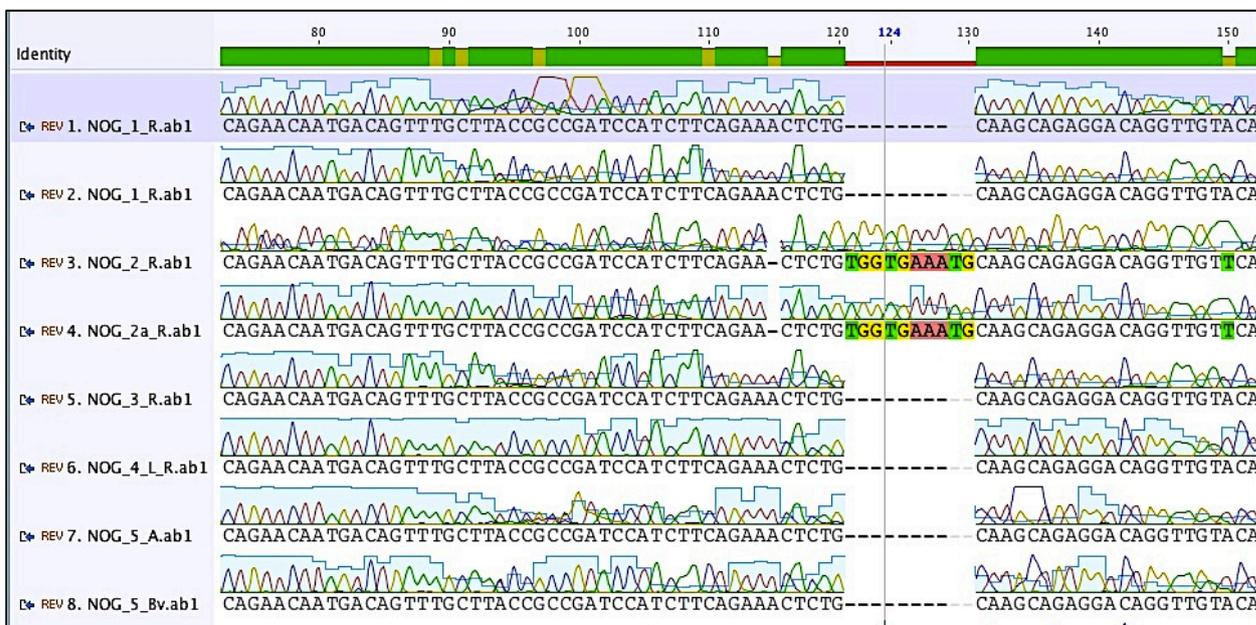
A análise por tamanho de fragmento gerou 103 resultados, 55 machos, 44 fêmeas e quatro indivíduos que não tiveram o sexo definido. Trinta e cinco análises tiveram resultado positivo em fragmentos que apresentaram a deleção de nove pares de bases, característica de *C. aurita*, 46 resultaram em fragmentos com a inserção de nove pares de bases característica das demais espécies de calitriquídeos e 22 resultados foram negativos (ausência de pico). Entre as fêmeas, 24 apresentaram resultado positivo para o marcador do cromossoma Y (SRY) e 20 apresentaram resultado negativo.

Figura 23 - Trecho de uma imagem gerada pelo software Geneious mostrando os picos (em azul) dos fragmentos de SRY de 196 pb (*C. aurita*) e os de 205 pb (demais espécies) gerados pela análise de tamanho de fragmento.



A análise que gerou o sequenciamento do fragmento de SRY resultou em 26 sequências: 14 que mostram a deleção dos *C. aurita* e 12 que mostram a inserção das demais espécies. Entre as 26 sequências, seis foram réplicas (tiradas desde a extração do DNA) para confirmar a procedência e a configuração dos resultados positivos (Fig.24).

Figura 24 - Sequenciamento (produzido pelo software Geneious 6.0) do marcador SRY mostrando a família mista de sagüis cujo pai (Nog_1) é da espécie *C. aurita*, e tem a deleção de nove pb, a mãe (Nog_2), que é *C. jacchus* com a inserção de 9 pb, dois filhos machos (Nog_3 e Nog_4) com o mesma deleção paterna; e uma filha fêmea também com a deleção paterna. As repetições vistas na imagem são réplicas para garantir que não houve erro nas etapas de laboratório.



2.4.4 Análise de linhagem através dos marcadores COI e SRY

O conjunto de tabelas (Tabela 15) mostram o resultado da análise linhagem genética com o marcador de linhagem materna COI posto ao lado do marcador de linhagem paterna SRY para cada indivíduo. Estes indivíduos podem ser encontrados dentro de grupos ou isoladamente, ou ainda definidos pelo nome das instituições onde foram coletados.

Os marcadores de linhagem colocados lado-a-lado revelam (ou confirmam) parte da procedência genética e o caráter híbrido dos indivíduos quando apresentam pais com haplótipos indicadores de espécies distintas. Indivíduos híbridos (destacados através do pareamento entre azul e vermelho) foram identificados na maioria dos pontos amostrados da região sudeste. No sudeste, somente 12 indivíduos, entre 103, tiveram ambos marcadores confirmando uma descendência materna e paterna de *C. aurita* (par vermelho), com somente um grupo de vida livre com seis

indivíduos de *C. aurita* “puros” (somente quatro confirmados para ambos marcadores) na sede do PARNASO de Petrópolis.

Outros *C. aurita* puros para ambos marcadores estão no Zôo de Guarulhos (cinco), no CPRJ (2), um macho dominante de um grupo misto em Nogueira (grupo Luzia) (mas falecido este ano) e um indivíduo solitário entregue na sede do PARNASO em Teresópolis (e que agora está no CPRJ). Também são mostrados indivíduos coletados provenientes de outras regiões do Brasil – Brasília, Recife e Bahia.

Tabela 15 – Tabela das linhagens materna e paterna dos indivíduos por localidade. São mostrados em ordem: o número de ordenação (N), o código de identificação dos indivíduos, a espécie (haplótipo de COI) da mãe, a espécie (haplótipo de SRY) do pai, e o sexo dos indivíduos. Sobre cada tabela é mostrado o nome do agrupamento com referência à localidade de origem. Indivíduos híbridos com *C. aurita* são vistos nos pares azul /vermelho (continua)

Grupo Bonfim (Sede Petrópolis)

1	P01	AUR	0	F
2	P04	AUR	0	F
3	P06	AUR	AUR	F
4	P02	AUR	AUR	F
5	P05	AUR	AUR	M
6	P03	AUR	AUR	M

Grupo Silvia (Correias - Petrópolis)

7	SIL_4	AUR	0	F
8	SIL_1	PEN	J/P	F
9	SIL_2	PEN	0	M
10	SIL_3	PEN	J/P	F
11	SIL_5	PEN	J/P	M

Estrada Correias

12	AM_3_Correias	PEN	J/P	
----	---------------	-----	-----	--

Grupo Otávio (Nogueira - Petrópolis)

13	OT_10	PEN	0	F
14	OT_11	PEN	AUR	F
15	OT_1	PEN	AUR	M
16	OT_2	PEN	0	F
17	OT_3	PEN	AUR	M
18	OT_5	PEN	AUR	M
19	OT_6	PEN	AUR	M
20	OT_7	PEN	AUR	M
21	OT_8	PEN	AUR	M
22	OT_9	Kuhlil?	AUR	M

Grupo Romilda (Mosela - Petrópolis)

23	ROM_7	PEN	0	F
24	ROM_1	PEN	0	F
25	ROM_2	PEN	J/P	M
26	ROM_4	PEN	J/P	F
27	ROM_5	PEN	J/P	M
28	ROM_6	PEN	0	F

Grupo Natividade

29	NAT_399279	AUR	AUR	M
30	NAT_399277	AUR	AUR	M
31	NAT_399278	AUR	0	F
32	NAT_399276	AUR	AUR	F

Grupo Andreas (Mataporcos - Petrópolis)

33	AN_1	PEN	J/P	M
34	AN_2	PEN	J/P	F
35	AN_3	PEN	0	F
36	AN_4	PEN	J/P	M
37	AN_5	PEN	0	F

Grupo Luzia (Nogueira - Petrópolis)

38	NOG_1	AUR	AUR	M
39	NOG_2	JAC	J/P	F
40	NOG_3	JAC	AUR	M
41	NOG_4	JAC	AUR	M
42	NOG_5	JAC	AUR	F

Represa Caxambú (Petropolis)

43	MAN	AUR	J/P	M
----	-----	-----	-----	---

Avulsos Teresópolis

44	CauT	AUR	AUR	M
45	Tere_Pen	Kuhlil?	J/P	F
46	Tere_Aur	AUR	0	F
47	AM_2 Tere PNSO	AUR	AUR	

CPRJ (Teresopolis)

48	CPRJ_4	Kuhlil?	AUR	F
49	CPRJ_5	AUR	0	M
50	CPRJ_6	Kuhlil?	AUR	M
51	CPRJ_7	Kuhlil?	AUR	F

Grupo Juiz de Fora (MG)

52	JF_1	PEN	J/P	F
53	JF_2	PEN		M
54	JF_3	PEN		M
55	JF_4	PEN	J/P	F
56	JF_5	Geof	J/P	M
57	JF_6	PEN	0	F

Avulsos Recreio

58	AM_4_Recreio	JAC	J/P	
----	--------------	-----	-----	--

Grupo Cetas -JF (Zoo Niterói)

59	JF_7	JAC	J/P	M
60	JF_8	Hapl_Jf8	J/P	F
61	JF_9	Kuhlil?	J/P	F

Tabela 16 – Tabela das linhagens materna e paterna dos indivíduos por localidade. (conclusão)

Grupo Bosque da Barra (RJ)				
62	BB_11	JAC		F
63	BB_16	JAC	J/P	M
64	BB_17	JAC		F
65	BB_18	JAC		F
66	BB_19	JAC	J/P	F
67	BB_2	JAC	J/P	M
68	BB_37	JAC	J/P	F
69	BB_4	JAC		M
70	BB_7	JAC		F

Grupo Zoológico de Guarulhos (SP)				
71	ZOO_3435	JAC	AUR	F
72	ZOO_2528	AUR	J/P	M
73	ZOO_2346	Kuhlii?	AUR	M
74	ZOO_3370	AUR	AUR	M
75	ZOO_2555	AUR	AUR	M
76	ZOO_3179	AUR	AUR	M
77	ZOO_3129	AUR	AUR	M
78	ZOO_3565			
79	ZOO_3651	AUR	AUR	M
80	ZOO_3824	AUR	0	
81	ZOO_3974	Hapl_Z3974		F
82	ZOO_3975		0	F

CPRJ(Cumbica)				
83	CPRJ_1	AUR	AUR	M
84	CPRJ_2	AUR	0	F

CPRJ (Usina Angra)				
85	CPRJ_3	AUR	AUR	M

CPRJ (Biritiba Mirim - SP)				
86	CPRJ_13	Kuhlii?	0	F
87	CPRJ_15	Kuhlii?	J/P	M

CPRJ (procedência incerta)				
88	CPRJ_10	Hapl_?	0	M
89	CPRJ_11	Hapl_?	0	F
90	CPRJ_8	JAC	AUR	M
91	CPRJ_9	JAC	J/P	M
92	CPRJ_14	JAC	J/P	F
93	CPRJ_12	PEN	J/P	M
94	CPRJ_16	PEN/JF	0	F

CPRJ (Grupo Geoffroyi)				
95	Geof_2	GEOF	J/P	M

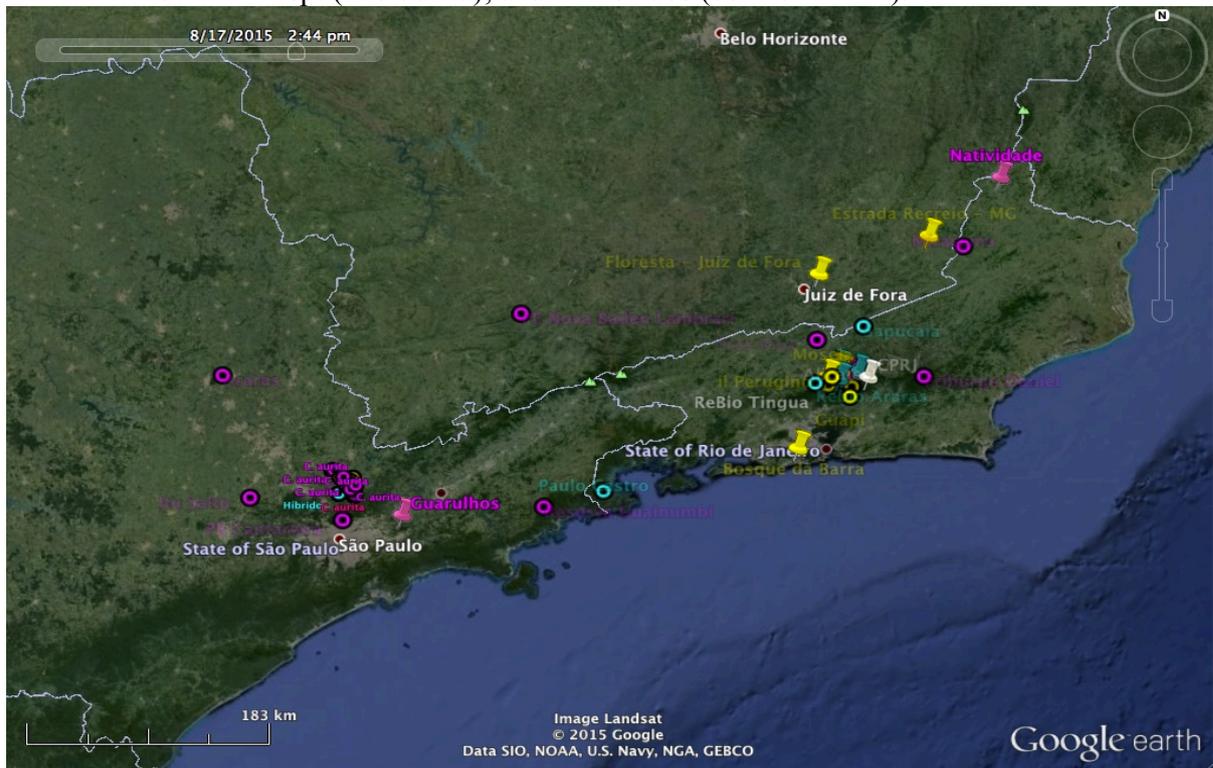
Bahia				
96	Aluane	Kuhlii?	0	

Grupo Brasília (CP-UnB)				
97	Bra_01	Hapl_Bra1	J/P	M
98	Bra_02	Hapl_Bra1		F
99	Bra_03	Hapl_?		F
100	Bra_04	Hapl_Bra1		F
101	Bra_05			F
102	Bra_06	Hapl_Bra1		F
103	Bra_07	PEN_3		M
104	Bra_08	Hapl_?	J/P	M
105	Bra_09	Hapl_Bra1		M
106	Bra_10	PEN	J/P	M

Grupo Recife (CRAS)				
107	REC_1	JAC	J/P	F
108	REC_2	JAC	J/P	F
109	REC_3	JAC	J/P	F
110	REC_4	JAC	J/P	F
111	REC_5	JAC	J/P	M
112	REC_6	JAC		
113	REC_7	JAC		
114	REC_8	JAC		
115	REC_9	JAC		
116	REC_10	JAC		
117	REC_11	JAC	J/P	M
118	REC_12	JAC	J/P	M
119	REC_13	JAC		
124	REC_14	JAC	J/P	M
121	REC_15	JAC	J/P	M
122	REC_16	JAC		
127	REC_17	JAC	J/P	M
124	REC_18	JAC	J/P	F
125	REC_19	JAC		
126	REC_20	JAC		
131	REC_21	JAC	J/P	M
128	REC_22	JAC		
129	REC_23	JAC		
130	REC_24	JAC		
131	REC_25	JAC		
132	REC_26	JAC		
133	REC_27	JAC		
134	REC_28	JAC		
135	REC_29	JAC		
140	REC_30	JAC		
137	REC_31	JAC		
138	REC_32	JAC		
139	REC_33	JAC		

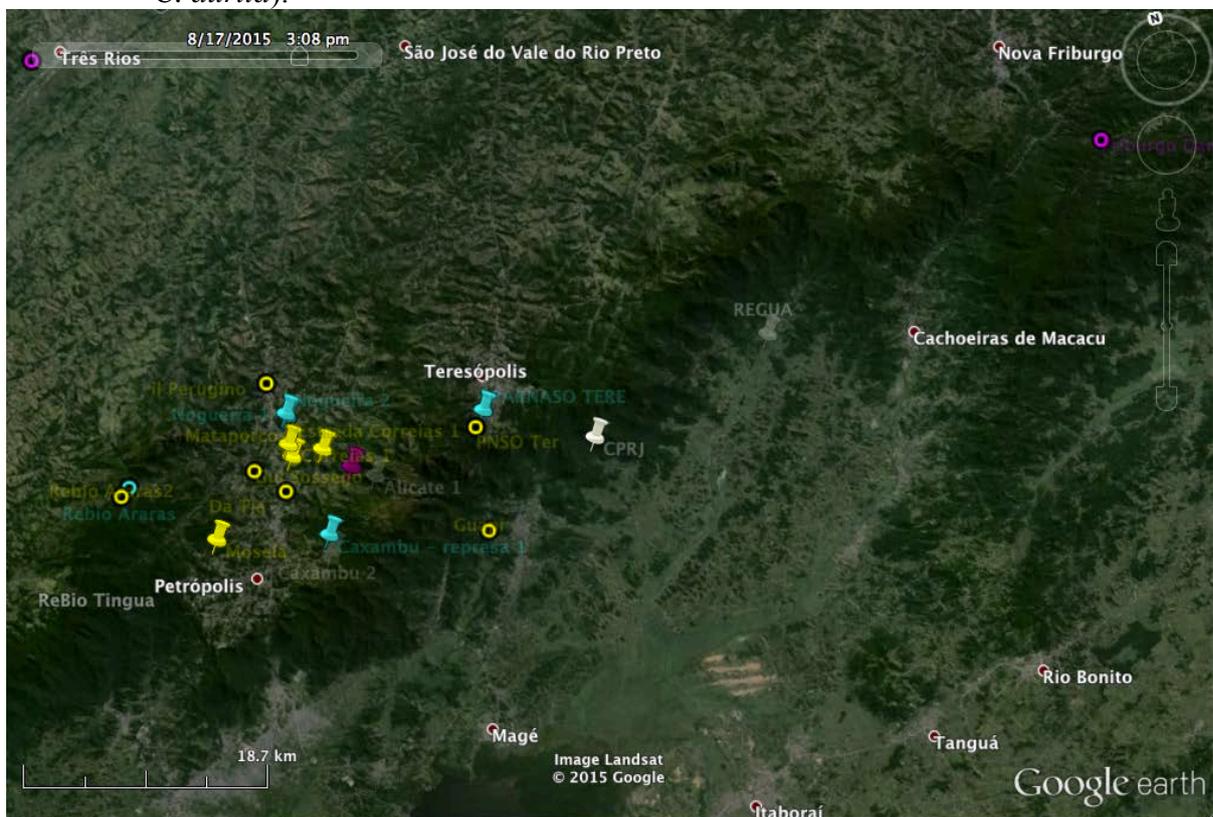
Com as informações dos locais de captura sobre a região Sudeste, foi possível fazer um mapa (Fig. 25) dos registros de ocorrência de sagüis identificados pela análise molecular. O mapa mostra (pinos rosas) os dois pontos onde foram encontrados sagüis da espécie *C. aurita* “puros”, um no PARNASO (sede de Petrópolis, RJ) e outro em Natividade – RJ. Também podem ser vistos os grupos de *Callithrix* que, geneticamente, não foram identificados como descendentes por linhagem materna ou paterna de *C. aurita* (pinos amarelos), e os grupos onde foram genotipados indivíduos com uma das duas linhagens proveniente de *C. aurita* (pinos azuis). Os registros fotográficos de colaboradores foram incorporados como uma referência adicional (círculos) de ocorrência onde ainda não foi feita verificação genética das diversas espécies (e híbridos).

Figura 25 - Mapa sobre a área de ocorrência do *C. aurita* mostrando os locais de registro do *C. aurita* isoladamente ou junto a sagüis de outras espécies e/ou híbridos. Pinos representam sagüis genotipados, e círculos representam somente registro fotográfico (de colaboradores – sem captura). Cores: rosa – *C. aurita*; amarelo – *Callithrix* sp. (não-aurita); azul – híbridos (com *C. aurita*).



Um detalhamento do mapa (Fig. 26) revela com melhor definição os pontos de captura e análise molecular que foram concentrados na região serrana de mata atlântica ao norte da cidade do Rio de Janeiro, onde houve somente um ponto geográfico de ocorrência de *C. aurita* (PARNASO – sede Petrópolis, RJ).

Figura 26 - Mapa mostrando os locais de registro do *C. aurita* isoladamente, próximo ou junto a sagüis de outras espécies e/ou híbridos na região serrana onde foram concentradas as capturas. Pinos representam sagüis genotipados, e círculos representam somente registro fotográfico (de colaboradores – sem captura). Cores: rosa – *C. aurita*; amarelo – *Callithrix* sp. (não-aurita); azul – híbridos (com *C. aurita*).



2.5 Discussão

2.5.1 Filogenia – identidade dos grupos

2.5.1.1 AURITA

O agrupamento “aurita” formado por 20 indivíduos provenientes da região serrana do Rio de Janeiro e de locais não definidos do estado de São Paulo não teve subdivisões e ficou claramente distante dos demais. A presença de indivíduos provenientes de regiões tão distantes como Rio de Janeiro e São Paulo com sequências idênticas atribui confiança à identidade matrilinear do grupo. Os autores (Schneider *et al.*, 2012; Sena *et al.*, 2002; Tagliaro *et al.*, 2000) já haviam posicionado, molecularmente, a espécie *C. aurita* de forma isolada e bem definida em relação às demais espécies (exceto para *C. flaviceps*) do gênero, o que não havia sido feito, entretanto, e que foi produto do presente estudo, foi a certificação da espécie através da comparação genética entre vários indivíduos não aparentados. A identidade encontrada no fragemento genético do COI (entre todos os indivíduos filhos de mãe *C. aurita*) não garante a “pureza” da espécie, que precisaria de outras análises genéticas para tal, mas é sem dúvida um indicador importante para ser somado à análise de linhagem paterna (SRY) e às características morfológicas para legitimar a distinção entre as espécies. Essa é uma garantia importante para evitar que esforços e recursos sejam gastos em conservação de espécies classificadas incorretamente (Frankham, Ballou e Briscoe, 2002).

2.5.1.2 JACCHUS

O agrupamento “jacchus” agregou 43 indivíduos subdivididos em três grupos. Um grande grupo denominado de “Jac_1” com 31 indivíduos com 100% de homologia entre si, que contou com 24 sagüis provenientes de Recife, três do CPRJ e quatro da família de Nogueira. Este grupo familiar (Nogueira) conta, em termos de representatividade de diversidade, como um único haplótipo representado pela

matriarca da família coletada em Nogueira (Petrópolis, RJ); entre os três vindos do CPRJ dois foram capturados no sudeste mas sem local definido e um é F1; já os sagüis de Recife foram provenientes do CRAS com grupos e indivíduos recebidos em datas distintas e de locais distintos, contudo provenientes de Regiões não muito distantes de Recife (informações do veterinário responsável). A presença, neste agrupamento, de indivíduos de diversas procedências tanto da região Nordeste como, e somados a, de indivíduos do Sudeste vindos de lugares também diferentes, confere solidez a todo o ramo “jacchus”.

À semelhança da filogenia do *C. aurita*, o ramo da espécie de *C. jacchus* também foi bem definida pelos mesmo autores, e este trabalho traz a contribuição de aumentar o número amostral e de um marcador novo (COI).

A unidade deste agrupamento é ainda reforçada considerando-se que, os outros dois haplótipos do ramo divergiram em apenas uma mutação: o “Jac_2_Rec” que é de um único indivíduo mutante de Recife, e o “Jac_3” que é formado por sagüis que vivem isolados em um pequeno bosque cercado por áreas urbanas (Bosque da Barra, RJ) e portanto, com alto índice de endogamia. Assim como grupo familiar amostrado em Juiz de Fora, o grupo do Bosque da Barra, representado pelo haplótipo “Hapl_3_Jac3_BB”, provavelmente demarca uma linhagem materna local exclusiva, ao menos da região sudeste, se não for exclusiva da restrita área do bosque. Outros indivíduos de populações de outras áreas desta região precisariam ser avaliados para confirmar esta marca como uma distinção entre as populações de *C. jacchus* do nordeste (cuja representatividade, embora limitada à região de Pernambuco, apresenta relativa heterogeneidade com sagüis provenientes de diversas origens) e as invasoras do sudeste.

2.5.1.3 PENICILLATA

O agrupamento “penicillata” foi formado também com 31 indivíduos divididos em três grupos, sendo que a maioria dos grupos (21 indivíduos) foi amostrada dentro de um raio de 5 km na região serrana de Petrópolis (RJ). Dentre os demais estão seis indivíduos amostrados em um fragmento de floresta próximo à cidade mineira de Juiz de Fora (haplótipo “Pen_1”), dois indivíduos do CPRJ (o haplótipo “Lorena”

proveniente da cidade de Lorena, SP e o outro, CPRJ_16, de Saquarema, RJ), e um indivíduo (BRA_10) amostrado em Brasília (área de ocorrência natural dos *C. penicillata*). Este agrupamento, de forma semelhante ao “jacchus”, demonstra uma variedade de indivíduos amostrados em áreas geográficas diferentes que confere identidade haplotípica ao conjunto (do ponto de vista matrilinear), assim como demonstra o espalhamento genético deste haplótipo dentro da área de ocorrência do *C. aurita*. Os estudos dos autores Schneider *et al.* (2012); Sena *et al.* (2002) e Tagliaro *et al.* (2000), apresentam uma árvore de distâncias genéticas não resolvida para esta espécie, mostrando um limite da técnica diante da possibilidade de haver uma especiação incompleta ou introgressão, onde poucos indivíduos não deixam claro a diversidade genética dos grupos taxonômicos. Frankham, Ballou e Briscoe (2002) pontuam que uma das primeiras perguntas que devem ser respondidas é se a população em estudo tem sua identidade taxonômica suficientemente reconhecida. Garbino (2015) em um amplo estudo de várias características morfológicas (em 516 ossadas de 21 espécies da tribo Callitrichini) não apresenta uma variação para a espécie *C. penicillata* maior que a de *C. jacchus*. Filogeneticamente, neste estudo, o agrupamento “Penicillata” se mostrou o grupo mais afastado do *C. jacchus* (dentro da mesma chave).

2.5.1.4 GEOFFROYI

O agrupamento “geoffroyi”, em termos de garantia de representatividade, conta com três indivíduos do CPRJ identificados pelo primatólogo Alcides Pissinatti como representantes da espécie *C. geoffroyi* e, curiosamente, soma-se a este grupo um dos indivíduos coletados na família de Juiz de Fora (JF_5) que teve seu COI idêntico ao destes sagüis. Fuzessy *et al.* (2014) sugere que o fenótipo penicillata é dominante em casos de hibridação entre *C. geoffroy* e *C. penicillata*. Como não houve outra amostra com a mesma marca molecular em Juiz de Fora, o exame deste indivíduo foi repetido desde a extração até o sequenciamento e confirmou o resultado inicial (JF_5 tem ascendência materna de *C. geoffroyi*). A presença de híbridos de *C. geoffroyi* é relatada por Passamani *et al.*, (1997) e Fuzessy (2014), próximo ao limite sul de sua ocorrência natural, na região norte do Espírito Santo e nordeste de Minas

Gerais. A presença deste haplótipo nesta área demarca o ponto mais ao sul registrado em relação à extensão de uma marca genética desta espécie.

2.5.1.5 KUHLII?

Este agrupamento foi particularmente surpreendente pois não se esperava encontrar nenhum haplótipo desta espécie, exceto para uma amostra vinda da Bahia, que serviu para denominar o conjunto. Todos os demais indivíduos que caracterizaram este grupo tinham sido classificados fenotipicamente como *C. penicillata* ou híbrido de *C. penicillata* com *C. jacchus* ou *C. aurita*. Dentre os componentes deste agrupamento estão os indivíduos amostrados no CPRJ (CPRJ_4, CPRJ_6, CPRJ_7) sendo que o indivíduo CPRJ_4 foi coletado no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (altitude aprox. de 700m) como uma descendente híbrida de um *C. aurita* com uma fêmea da espécie *C. penicillata* (Pereira, 2006 e 2010; Pereira *et al.* 2008), e os outros dois (CPRJ_6 e CPRJ_7) são filhos da CPRJ_4. Esse resultado redefine o tipo de hibridação ocorrida na região serrana do Rio de Janeiro mostrando a presença de uma linhagem materna proveniente de um haplótipo diferente dos haplótipos que formam o grupo *C. penicillata*. É importante repetir que este haplótipo não tem garantia de definição taxonômica como *C. kuhlli*, sua única referência é ter vindo da Bahia, além disso, as fotografias feitas por Pereira (2006) dos sagüis encontrados no PARNASO mostram indivíduos com fenótipo característico de *C. penicillata*, isto pode representar uma hibridação anterior entre *C. penicillata* e *C. kuhlli*. A presença desse haplótipo (“Kuhlii?”) na região foi repetida alguns anos depois com a captura de um indivíduo em 2014, também da região de Teresópolis (RJ) que apresentou o mesmo haplótipo (Tere_Pen) e a semelhança fenotípica com a espécie *C. penicillata*.

Curiosamente outros indivíduos se incluem a este agrupamento somando surpresas. Dois amostrados no CPRJ como oriundos do estado de São Paulo (CPRJ_13, CPRJ_15) descritos como *C. penicillata*, um (OT_9) amostrado no meio de um grupo familiar de Nogueira (Petrópolis) com mais nove indivíduos híbridos de *C. aurita* (por linhagem paterna) e *C. penicillata*, e um amostrado no CETAS de Juiz de Fora (MG) oriundo do extinto Zoo de Niterói (RJ) e com fenótipo de *C.*

penicillata. Não fossem os indivíduos provenientes de São Paulo, esse haplótipo poderia ser visto como uma dispersão restrita da região serrana ao norte da cidade do Rio de Janeiro (seria possível que o indivíduo do Zoo de Niterói fosse oriundo da mesma região serrana), no entanto, os indivíduos CPRJ_13 e CPRJ_15 sugerem que a dispersão desta linhagem materna foi bem mais ampla. Embora não se possa falar da inédita presença de *C. kuhlii* no Rio de Janeiro e em São Paulo, este trabalho mostra ineditamente a presença genética deste haplótipo nestas regiões pelo marcador mitocondrial COI. O município de Salto (norte de Minas) foi registro da espécie *C. kuhlii* mais ao sul publicado por (Melo, 2004) e corroborado por (Neves, 2008), ambos apontando a hibridação entre *C. kuhlii* e *C. penicillata* nesta fronteira.

2.5.1.6 HAPLOTIPO 5_?

O haplótipo 5 “Hapl_5_?” foi formado por três indivíduos (CPRJ_10, CPRJ_11 e BRA_8) e tem duas peculiaridades, a primeira é que estes sagüis, que dividem a mesma sequência de COI, são definidos como *C. jacchus* (os dois primeiros) e *C. penicillata* (o terceiro), e a segunda é o fato de estarem igualmente a três mutações de distância tanto do maior grupo de *C. jacchus* quanto do grupo dos *C. kuhlii*. Essas duas características juntas sugerem a possibilidade de que este haplótipo possa ser encontrado em maior número.

2.5.1.7 HAPLOTIPO JF_8 e HAPLOTIPO “LORENA”

Estes haplótipos, sendo representados por um único indivíduo (“JF_8” – coletado no CETAS de Juiz de Fora como um *C. jacchus* proveniente do Zoo de Niterói, e “LORENA” – coletado no CPRJ como oriundo da cidade paulista de Lorena), não podem ser assumidos como haplótipos representativos de populações próprias, até que se somem a outros para que possam, numericamente, enfrentar seleção e deriva. Estes sagüis, por outro lado, se considerados como únicos, mostram a força evolutiva das mutações atuando no tempo presente.

Esses haplótipos estão bastante próximos de grupos que caracterizam tanto o “Kuhlii?” ou o “Jac_1” (para o “Hapl_4_JF8”) quanto do “Pen_1” (para o “Hapl_8_Lorena”) e podem ser vistos como mutações oriundas destes grupos maiores.

2.5.1.8 Análise de mutação na cadeia de proteína.

O pequeno número de transversões (quatro) demonstra que esta divisão filogenética dos *Callithrix* sp. ainda está distante de saturação para esse marcador. Apesar das mutações no terceiro códon serem com frequência silenciosas (Irwin, Kocher e Wilson, 1991) ocorreram duas únicas mudanças de aminoácidos (mutação não sinônima), na cadeia proteica referente à tradução do fragmento genético (595 pb) relativa à enzima citocromo oxidase unidade 1. Elas ocorreram em grupos distintos, uma dentro do agrupamento de *C. penicillata* e outra dentro do agrupamento de *C. jacchus*. A que ocorreu dentro do grupo *C. jacchus* aparece isolada em um indivíduo único e não representa um agrupamento distinto dentro desta amostragem. Essa mutação provavelmente não deve seguir um caminho distinto tendendo a desaparecer da população seja por deriva seja por uma transformação deletéria na proteína que configura. Já a mudança de aminoácido ocorrida dentro do agrupamento de *C. penicillata* aparece em cinco indivíduos de um mesmo grupo coletado em Juiz de Fora – MG, e que poderia indicar uma mutação recente dentro de uma mesma família por linhagem materna, contudo, esta mesma mutação também aparece em um outro indivíduo coletado no CPRJ (CPRJ_16), mas oriundo de Biritiba (SP), região geográfica razoavelmente distante de Juiz de Fora. Essa mutação pode representar uma linhagem mais antiga espalhada pelo Sudeste, mas também pode ter ocorrido simultaneamente, sendo que, esta última possibilidade deve levar em consideração a pequena probabilidade de uma mutação acontecer separadamente em uma mesma base entre 595 (uma única que diferencia um grupo de outro), e ainda, sendo esta base a segunda e não a terceira do trio que origina o molde da transcrição genética.

Toda mutação pontual encontrada nos genes de herança materna ou paterna, como os da mitocôndria e do cromossoma Y é uma possibilidade de “marca de linhagem” específica para os descendentes do primeiro mutante (caso essa mutação não seja deletéria). A duração e a proporção de detecção desta marca dependerão do sucesso reprodutivo dos descendentes e de efeitos aleatórios (deriva genética). O haplótipo denominado “Hapl_9_Pen2_JF” está presente em seis indivíduos de um mesmo grupo familiar indicando o surgimento de uma nova linhagem materna se não for compartilhado por outros sagüis, ou pode indicar uma variação regional não tão recente caso esse haplótipo seja compartilhado por outras populações próximas desta família.

Todas as demais mutações foram mutações sinônimas.

2.5.2 Análise de distâncias genéticas

Tobe et al. (2010) comparam a acurácia da resolução taxonômica dos marcadores mitocondriais COI e cyt b entre 217 espécies de mamíferos (relativamente a outros estudos moleculares e morfológicos) e sugerem que, para ambos os marcadores, podem ser usados os valores abaixo de 1,5 e acima de 2,5 (distância genética K2P x 100) como os limites de definição do que deve ser intraespecífico e interespecífico, respectivamente (o que cai entre os intervalos deve ser avaliado com mais estudos). A matriz de distância genética do marcador COI deste estudo não resultou em nenhum valor interespecífico maior que 1,5 (usando os mesmos parâmetros de distância K2P), exceto entre *C. aurita* em todos os demais, cujo menor valor foi o de 4,98 entre *C. aurita* e o haplótipo “_5_?”. Os valores próximos de 5 que distancia os *C. aurita* de todos os demais haplótipos deste estudo (desconsiderando o “ancestral hipotético”) estão duas vezes maiores que o limite mínimo de 2,5 (Tobe, Kitchener e Linacre, 2010) para que grupos sejam considerados de espécies distintas. Inversamente, a comparação entre os demais haplótipos resultou em valores entre 0,17 (min.) e 1,36 (max.) o que, considerando os valores propostos, não seria o suficiente para assumir uma distinção de espécie para cada grupo. Em termos absolutos, enquanto o grupo *C. aurita* obteve um número de

mutações entre 28 a 32 (em 595 pb) dos outros, estes variaram entre si de uma a oito mutações, sendo que os pares que obtiveram oito mutações de distância (1,3 % de 595) foram: “Hapl_Geof” x “Hapl_Jac2_Rec”, “Hapl_Geof” x “Hapl_Jac3BB”, “Hapl_Geof” x “Hapl_Pen2_JF”, “Hapl_Jac2_Rec” x “Hapl_Pen2_JF” e “Hapl_Jac3BB” x “Hapl_Pen2_JF”. Contudo, se desconsiderarmos os haplótipos formados por um só indivíduo e os formados por um grupo familiar, que não tiveram seus haplótipos registrados em outras regiões geográficas, ficamos com valores um pouco menores, com o grupo que representa *C. geoffroyi* com sete mutações de distância para os grupos representativos de *C. jacchus* (1,19 - distância K2P), de *C. penicillata* (1,2 - distância K2P), e de *C. kuhlii* (1,2 - distância K2P). Os grupos representativos de *C. penicillata* x *C. jacchus*, e *C. penicillata* x *C. kuhlii* tiveram seis mutações de diferença e distância K2P de 1,02 para ambos. E a menor distância entre grupos com denominações taxonômicas conhecidas ficou entre *C. jacchus* e *C. kuhlii* com quatro mutações e 0,68 de distância K2P. Este último par tem uma diferenciação que vale a metade dos que têm maior valor tornando ainda menos confortável a diferenciação evolutiva entre *C. jacchus* e haplótipo “*Kuhlii?*”.

O pequeno grupo do haplótipo “Hapl_5_?” ficou com a maior distância do grupo do *C. geoffroyi* com seis mutações e 1,03 de distância K2P, ficou com cinco mutações de diferença para *C. penicillata*, com valor de distância K2P de 0,85, e três mutações de diferença entre *C. jacchus* e *C. kuhlii* e 0,51 de distância K2P para ambos. Este menor valor que separa este haplótipo “taxa-anônimo” de seus pares reconhecidos está a uma mutação de distância do par *C. jacchus* e *C. kuhlii*, mas será que vale levar em conta este pequeno grupo de três indivíduos? Fossem eles indivíduos amostrados com uma distância geográfica pequena, talvez não passassem de um grupo familiar que acumulou mais mutações do que o esperado (para esse marcador), como de fato ocorre para os dois indivíduos amostrados no CPRJ que são aparentados, resta, contudo, a presença de um indivíduo amostrado em Brasília que impõe a dúvida que é somada à, igualmente desconfortável, presença de três mutações no grupo.

Os indivíduos solitários donos dos haplótipos “JF_8” e “Lorena” têm pouca significância para discussão filogenética, representando, com suas duas e uma mutação respectivamente dos grupos representativos maiores que lhes fazem vizinhança, talvez apenas elementos mutantes que não referenciam linhagens

evolutivas próprias. Esses indivíduos são importantes, entretanto, como exemplo das diferenças que podem surgir em filogenias feitas com poucas amostras.

Frézal e Leblois (2008) enumeram vantagens e desvantagens do uso do COI como código de barras (Barcode) para identificar espécies, e comentam como a questão da determinação de valores para delimitar o que se define como interespecífico e intraespecífico é controversa e desaconselhável. Todavia, o que os valores descritos acima definitivamente mostram, são as distâncias efetivas de linhagens maternas que de fato existem entre grupos (bem ou não tão bem representados numericamente) oferecendo conteúdo para ser somado a discussões que podem variar da taxonomia à conservação.

Algumas publicações reiteram a necessidade de estudos complementares para se definir com uma avaliação mais ampla o que se define por espécie assim como alguns artigos (Coimbra-Filho e Mittermeier, 1973; deVivo, 1999; Marroig, 1995; Mittermeier e Coimbra-Filho, 1981; Mittermeier, Rylands e Coimbra-Filho, 1988; Natori, 1986) debatem e reafirmam a divisão do gênero *Callithrix* em seis espécies válidas devido a diferenças de caminhos evolutivos que se delineiam particularmente para cada uma delas, mesmo para as que demonstram pequenos valores de divergência genética.

Do ponto de vista da conservação esses dados revelam uma dispersão de genes que não é percebida pela caracterização fenotípica.

A filogenia apresentada neste trabalho reproduz em parte as apresentadas por (Tagliaro *et al.*, 1997) usando a região controle do DNA mitocondrial, por (Sena *et al.*, 2002) usando o marcador mitocondrial COII, e por (Schneider *et al.*, 2012), usando novamente a região controle. Esses autores, apesar de algumas diferenças metodológicas e de discutirem preferencialmente a distinção entre gêneros, apresentam como parte de suas árvores filogenéticas um ramo com vários representantes do gênero *Callithrix* (com a exceção do *C. flaviceps*). Schneider *et al.* (2012) utiliza dados de seu próprio grupo de pesquisa (Tagliaro *et al.*, 1997) neste artigo mais recente onde também apresentam as cinco espécies do gênero, com boa resolução de clado para *C. jacchus*, *C. geoffroyi* e *C. aurita*, mas não para *C. kuhlii* (cinco indivíduos oriundos de Una e Ilhéus) e *C. penicillata* (dois indivíduos amostrados também no Centro de Primatologia da UnB em Brasília).

O presente estudo aumenta o número amostral consideravelmente para as espécies *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*, sendo que todas as amostras de *C. aurita* foram dentro de sua área de ocorrência, as de *C. jacchus* foram em maioria dentro da sua área de ocorrência, mas as de *C. penicillata* só contaram com uma amostra vinda de Brasília sendo todas as demais provenientes do sudeste (em grande parte de híbridos). Como os estudos dos autores citados acima, a divisão dos clados deste trabalho também apresentou parafiletismo para indivíduos denominados como *C. penicillata*, sendo que os artigos de Tagliaro et al. (1997), Sena et al. (2002) e Schneider et al. (2012) também usam as amostras de *C. penicillata* do CP da UnB em Brasília, possivelmente os mesmos indivíduos ou indivíduos de mesma linhagem materna (COI idêntico), sendo assim não surpreendem os resultados semelhantes. Contudo, os dados desta pesquisa dão robustez ao clado dominante denominado como *C. penicillata* e mostram uma grande dispersão deste haplótipo na região sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), mas contrariam (Buckner et al., 2014) que posicionam *C. jacchus* como grupo irmão de *C. penicillata* em seu estudo multilocus de filogenia molecular evolutiva, contrariam (Natori, 1994) que relata a mesma proximidade entre *C. jacchus* e *C. penicillata* em seu trabalho de anatomia do crânio, e também os dados (sem a parte molecular) de (Garbino, 2015) em seu artigo que reúne dados anatômicos, cariotípicos e de vocalização. Essa irmandade entre os clados de *C. jacchus* e *C. penicillata* poderia ser questionada no trabalho de Buckner et al. (2014) uma vez que o trabalho é feito com dados do *GenBank* (que não garante a procedência geográfica dos indivíduos), mas esses resultados somados aos de Natori (1994) e de Garbino (2015) que foram levantados com uma expressiva quantidade de indivíduos depositados em museus dão credibilidade a essa junção. Isso implica em um dilema geográfico-fenotípico-molecular, pois se seguirmos a proximidade estipulada por estes autores, isso significa escolher dentro dos nossos exemplares aqueles que, entre o grupo parafiletico caracterizados como *C. penicillata*, estão com a menor distância genética do maior grupo de *C. jacchus*. Como resultado deste raciocínio determinamos que o indivíduo “BRA_8” que vem acompanhado de dois indivíduos do CPRJ classificados como *C. jacchus* deve ser o representante da espécie *C. penicillata*, o que deixa os distantes (quase tão distantes quanto o *C. geoffroyi*) e previamente denominados como *C. penicillata*, com seus 31 representantes (incluindo “BRA_10”) sem nome. Zinner, Arnold e Roos (2011b) e

Zinner *et al.* (2009) relatam um caso semelhante onde mais haplótipos mitocondriais foram encontrados do que as espécies oficiais de babuínos. Este trabalho indica a necessidade de se explorar em nível molecular um número maior de indivíduos classificados como *C. penicillata* para que se possa aumentar o entendimento sobre a presença dos diferentes haplótipos apresentados e sobre o desenvolvimento evolutivo da espécie e do gênero.

2.5.3 Híbridos e hibridação

Os resultados da análise molecular do marcador SRY do cromossoma Y corroborou os resultados encontrados por MOREIRA (2002) que relatam que ocorre uma deleção de nove pares de bases nesta região do cromossoma Y exclusiva da espécie *C. aurita*. A similaridade entre as bases desse marcador sequenciadas em diferentes indivíduos (com replicas) sugere que não houve sequenciamento de pseudogenes. Isto garante que a análise, somente por tamanho de fragmento feita para a maioria das amostras, obteve um resultado confiável em termos comparativos e de identificação da linhagem paterna.

O SRY saiu como resultado positivo para quase a metade (25) das 54 fêmeas analisadas mostrando o quimerismo (troca de material genético entre irmãos em gestação que partilham a mesma cavidade coriônica conectados por anastomoses) documentado para o gênero por (Benirschke, Anderson e Brownhill, 1962) e confirmado com o uso de marcadores moleculares tipo microssatélites por (Ross, French e Ortí, 2007) e pela análise do genoma completo feita por (Worley *et al.*, 2014). Esses casos ajudaram a definir eventos de hibridação sobretudo para indivíduos fora de um contexto familiar como ocorreu com o indivíduo “MAN”, uma fêmea encontrada no bairro de Caxambú em Petrópolis (nas cercanias com o PARNASO) proveniente de *C. aurita* por linhagem materna e com SRY (apesar de ser uma fêmea) sem a deleção de nove pares de bases que é exclusiva para *C. aurita*.

A junção dos resultados de COI com os de SRY permitiram mostrar os casos individuais e familiares de hibridação tanto nas populações de vida livre como nas de cativeiro. Essa ferramenta desvenda um mapeamento de ocorrência de híbridos e em particular de híbridos com a espécie nativa ameaçada de extinção, *C. aurita*.

Entre as surpresas que as tabelas apresentam estão os híbridos da região de Teresópolis descritos por Pereira (2006, 2010) onde se era assumido que a hibridação havia ocorrido entre *C. aurita* e *C. penicillata*, e ao invés disso, os resultados de COI mostram que a linhagem materna deste grupo difere do haplótipo *C. penicillata* atribuído a um dos agrupamentos deste estudo, e se iguala ao haplótipo “Kuhlii?”

A dispersão geográfica da hibridação vista no mapa revela por um lado a ampla penetração das espécies invasora como também mostra os focos ou fronteiras onde ainda ocorre uma disputa por território, e também onde ainda é possível encontrar ao menos representantes do *pool* genético dos *C. aurita*.

Bechara, (2012) afirma, através de seu estudo com modelagem de distribuição, que a espécie invasora *C. penicillata* é a que tem maior potencial de impacto sobre as populações de *C. aurita*, dada a semelhança nos parâmetros de adequabilidade ambiental entre as duas espécies. As áreas de sazonalidade mais marcada, de altitudes mais elevadas e de temperaturas mais amenas, que são as de preferência do *C. aurita* (Cerqueira, Marroig e Pinder, 1998; Mendes, 1997b) se ajustam aos *C. penicillata* mas são menos adequadas à dispersão do *C. jacchus*. As populações híbridadas encontradas no presente estudo, contudo, mostram um grupo familiar (grupo Luzia) de um macho *C. aurita* com uma fêmea *C. jacchus* e três filhotes, na região serrana do Rio de Janeiro (Nogueira – Petrópolis, RJ) a uma altitude de aproximadamente 700m. Na mesma área deste grupo, outro grupo vizinho (grupo Otavio) de híbridos era composto por indivíduos com descendência materna de *C. penicillata* e paterna de *C. aurita*, este corroborando a colocação de Bechara (2012). Já o grupo de Teresópolis (RJ) marca a presença da hibridação com um possível *C. kuhlii* nesta área cuja altitude é próxima de 1000m, Neves, (2008) pondera que não é a altitude o principal limitador para a distribuição vertical de *C. kuhlii*, mas sim as mudanças na vegetação e no clima que dela derivam, o que deixa em aberto não só a adaptabilidade de *C. penicillata*, como a de *C. kuhlii* à área de ocorrência do *C. aurita*.

Os dois grupos de vida livre que apresentaram haplótipos de linhagem mistos, de sagüis invasores com *C. aurita*, mostraram a linhagem paterna como sendo a da espécie local. Isto é, os grupos mistos tinham ou tiveram um macho alfa *C. aurita* pareando com uma fêmea não-aurita. Essa conformação foi a mesma encontrada por Pereira (2006) na base de Teresópolis do PARNASO e novamente em 2010 na mesma

região pelo mesmo autor (Pereira, 2010). Essa repetição do padrão de acasalamento macho *C. aurita* com fêmea não-aurita, levanta a questão sobre os motivos que podem estar por traz, caso esse seja mesmo um padrão. Razões comportamentais? *C. aurita* são em média maiores que os demais, o macho maior se impõe? Motivos fisiológicos? Pares reversos não geram prole e acabam se desfazendo?

Danos populacionais podem ocorrer mesmo quando o cruzamento de duas espécies causa prole infértil ou com baixa adaptabilidade (Rhymer e Simberloff, 1996; Zinner, Arnold e Roos, 2011b) basta que haja preferência dos machos dispersores de *C. aurita* pelas fêmeas “não-auritas” para causar desequilíbrio nas populações nativas.

2.5.4 Conservação

Para Natori (1986, 1994), para Marroig e Cheverud (2004) e Marroig (1995) não deve mais haver polêmica sobre as seis espécies do gênero *Callithrix* afirmando a validade taxonômica das espécies. Walsh (2000) pondera, entretanto, sobre a necessidade de um “N” amostral robusto para sustentar a definição de uma Unidade Evolucionária Significativa (ESU) (Ryder, 1986; Vogler e Desalle, 1994). Embora outros trabalhos já tenham mostrado distâncias moleculares significativas para a espécie *C. aurita*, este é o primeiro trabalho que reúne um número amostral com vários indivíduos desta espécie, diminuindo incertezas sobre a sua representatividade haplotípica. Do ponto de vista da Biologia da Conservação, a espécie ameaçada *C. aurita* garante seu status de uma ESU por apresentar aproximadamente cinco vezes mais polimorfismos que os demais haplótipos, já garantidos como espécies válidas, apresentaram entre si (a exceção do *C. flaviceps* que não entrou na amostragem).

Uma vez solidificado o conceito de ESU para a espécie do sagüi-da-serra-escuro, consolida-se a necessidade de evitar a descaracterização genética desta espécie pelo disseminado processo de hibridação que vem ocorrendo dentro de sua região de ocorrência. As localizações geográficas dos sagüis amostrados em campo, mostra apenas duas localidades livres com *C. aurita* puros aparentemente distantes da presença dos invasores: no interior do PARNASO (base Petrópolis) e em pequenos fragmentos em Natividade. O mapa gerado usando dados de colaboradores também

mostra poucos locais onde a espécie ameaçada está marcada sem um espécies invasora ou de híbridos na mesma região, esses dados reafirmam o perigo iminente e os apelos de proteção para a espécie feitas por Pereira (2006; 2010) e por Nunes (2015) que só encontrou dois grupos de *C. aurita* puros em seu levantamento feito em toda região do PARNASO.

O indivíduo CAUT foi manejado para o CPRJ depois da análise genética e formou um par bem sucedido com uma fêmea do local.

O macho Nog 1 acabou morrendo, foi perdido para fins de conservação. A família começou a ser comandada por um híbrido (provavelmente um dos filhos)

2.6 Conclusão

Os 20 indivíduos da espécie local e ameaçada de extinção *C. aurita* formaram um grupo monofilético para COI com 100% de identidade intraespecífica e com aproximadamente 30 substituições nucleotídicas de distância em relação aos demais agrupamentos. Os demais indivíduos formaram grupos com divergências evolutivas muito mais recentes entre si.

As três espécies *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata*, que foram o foco principal deste estudo, se mostram com definida identidade genética, contudo o haplogrupo denominado “Penicillata” que formou um clado monofilético com robustez, ainda precisa confirmar a coerência da sua nomenclatura taxonômica, uma vez que ele divergiu do haplótipo relativo ao sagüi identificado como *C. penicillata* coletado em seu local de ocorrência (Brasília) (ou por outro lado, o haplótipo de Brasília precisará ser explicado).

Foram encontrados mais haplótipos do que seria esperado para um número de seis espécies de *Callithrix*, isso expõe uma variabilidade genotípica maior do que se esperava e levanta questões sobre espécies crípticas e processos evolutivos não identificados em andamento, como possíveis processo de especiação ou resquílios de introgressão ou fusão de espécies.

Vinte e um indivíduos apresentaram, por análise molecular de linhagem, hibridação com a espécie nativa, destes, quatorze eram de vida livre e foram

amostrados na região do PARNASO. Somente um grupo de *C. aurita* puro foi encontrado. Este grupo foi amostrado no interior do PARNASO junto à sede de Petrópolis.

A presença de grupos de sagüis das espécies invasoras e grupos mistos e de híbridos no entorno do PARNASO e a falta de grupos puros no interior do mesmo parque revela uma realidade extremamente preocupante em relação a perspectiva de se garantir a existência de *C. aurita* na região serrana do Estado do Rio de Janeiro.

O outro grupo de *C. aurita* puro amostrado foi encontrado em um fragmento pequeno e isolado no município de Natividade-RJ, realçando a necessidade de um plano de manejo e recuperação específico e urgente para a espécie.

Em nenhum dos dois grupo de *C. aurita* puros foi encontrado eventos de hibridação ou introgressão relativo aos marcadores parentais.

Em casos de hibridação favorecida por ação humana em que a introgressão não foi confirmada, as ações mínimas para conservação sugeridas por Allendorf (2001) são a remoção da espécie invasora e dos híbridos, e a recuperação do habitat da espécie nativa.

3 IDENTIFICAÇÃO DE PRIMATAS NEOTROPICAIS (*CALLITHRIX* SPP.) COM O USO DE MINI-AMPLICONS EM AMOSTRAS DE MUSEU.

3.1 Introdução

Biopirataria, maus-tratos e comércio ilegal de animais são exemplos de crimes que estão aumentando e ganhando mais espaço como preocupação social. O comércio de animais silvestres é uma grande ameaça para a vida selvagem e para a saúde de ecossistemas, uma vez que causa graves impactos para a biodiversidade regional. A Mata Atlântica do Sudeste brasileiro é um hotspot (Mittermeier *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2000). que está sob muitos tipos diferentes de ameaças. Um dos problemas que esse ecossistema está enfrentando é o resultado do comércio ilegal de primatas e de solturas irregulares de animais (entre eles, os sagüis) de espécies geograficamente distantes (*Callithrix jacchus* e *C. penicillata*), no interior do habitat do altamente ameaçado sagüi-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*) (Levacov, Jerusalinsky e Fialho, 2011) Além da competição, a hibridação é outro problema para a conservação que esta espécie nativa enfrenta.

A correta identificação de indivíduos é um fator essencial para resolver casos forenses. E, quando a biodiversidade está envolvida, às vezes é necessário comparar marcadores genéticos provenientes de animais vivos com exemplares depositados em museus, como espécies de referência (Johnson, Remsen Jr. e Cicero, 1998).

As análises morfológicas foram, por muito tempo, a única forma de separação e classificação das espécies depositadas em museus. Os avanços em técnicas de análises de DNA abriram um novo e vasto universo de estudos possibilitando a geração de novos dados para complementar os estudos morfológicos. As amostras de museu têm, contudo, dificuldades para o acesso ao DNA intrínsecas ao processo de preservação, tais como os danos causado pela oxidação e hidrólise de tecidos (Junqueira, Lessinger e Azeredo-Espin, 2002), mas a evolução das ferramentas moleculares tem aumentado as possibilidades de recuperar o material genético de diferentes tipos de tecido (Casas-Marce, Revilla e Godoy, 2010). Essas conquistas

tecnológicas fazem das amostras preservadas em museus uma enorme fonte de estudo sobre a diversidade biológica, permitindo ainda a comparação entre amostras antigas e recentes, o que permite tanto discussões sobre evolução como sobre a certificação de identidade de espécimes. O material armazenado em museus oferece, em muitos casos, diversos tipos de tecidos possíveis para serem testados como fonte de material genético nem sempre com proporcionais chances de sucesso devido às diferenças de tratamentos.

O uso de códigos de barras de DNA (*DNA barcoding*), pequenas sequências de DNA para o reconhecimento e discriminação de espécies, é uma ferramenta útil para acelerar a análise e identificação da biodiversidade em nível de espécies ajudando os esforços direcionados para a conservação e elucidações de casos forenses. Um dos fragmentos mais utilizados para este fim é uma região "Barcoding" (Hebert *et al.*, 2003), localizado na extremidade 5' do gene da citocromo C oxidase subunidade I (COI), contendo cerca de 650 pares de bases (pb) flanqueadas por regiões conservadas para as quais iniciadores de PCR foram desenhados (Bucklin, Steinke e Blanco-Bercial, 2011). Em caso de amostras antigas, muitas vezes com DNA degradado, *amplicons* (trechos de DNA) superiores a 250 pb de comprimento podem ser difíceis de se obter (Moraes-Barros e Morgante, 2007). A estratégia de utilização de *mini-amplicons* para análise molecular, descrito por Berger e Parson (Berger e Parson, 2009), é eficaz para os materiais com um elevado grau de degradação, e que é extremamente útil quando não é possível obter um resultado conclusivo pelos métodos tradicionais.

3.2 Objetivo

O principal objetivo deste capítulo foi desenvolver um conjunto de cinco pares de primers para amplificar fragmentos COI mais curtos e sobrepostos dos primatas neotropicais do gênero *Callithrix* sp. (sagüis) e testá-los com espécimes de museu, para obter dados de referência confiáveis.

3.3 Metodologia

Dez exemplares de sagüis de diferentes espécies foram selecionados no Museu Nacional na cidade do Rio de Janeiro, sendo que para cada indivíduo mais de um tipo de amostra foi coletada (Tabela 17). A variação temporal das amostras foi proposital no sentido de testar a eficiência da metodologia por esta condicionante.

Tabela 17 - Dados da coleta de exemplares de sagüis depositados no Museu Nacional - RJ

No. Registro MN	No. Registro UERJ	9	Material coletado	Região anatômica da coleta	Data da Coleta no MN	Data da Coleta do sagüi	Local da coleta do sagüi	Sexo
MN 2827	120621 - MN1	<i>Callithrix aurita</i>	Raspado da pele	Próximo à cabeça	21/06/12	1/2/1931	Vila Bem Posta - RJ	-
MN 2827	120621 - MN1	"	Pele com pelo	Região abdominal	"	"	"	-
MN 2821	120621 - MN2	<i>Callithrix aurita</i>	Raspado da pele	Próximo à cabeça	21/06/12	1/2/1931	Vila Bem Posta - RJ	-
MN 2821	120621 - MN2	"	Pele com pelo	Região abdominal	"	"	"	-
MN 2818	120621 - MN3	<i>Callithrix aurita</i>	Tecido	Palma da mão	21/06/12	?	Itatiaia - RJ	-
MN 2818	120621 - MN3	"	Pele com pelo	Coxa esquerda	"	?	"	-
MN 2823	120621 - MN4	<i>Callithrix aurita</i>	Pele com pelo	Região inguinal	21/06/12	1/2/1931	Vila Bem Posta - RJ	-
MN 77420	120621 - MN5	<i>Callithrix aurita</i>	Pele com pelo	Região abdominal	21/06/12	06/06/10	Parati - RJ	-
MN-79164	120621 - MN6	<i>Callithrix penicillata</i>	Pele com pelo	Região abdominal	21/06/12	10/01/09	BR 040 - Simão Pereira - RJ	-
MN 5572	120621 - MN7	<i>Callithrix jacchus</i>	Osso raspado	Tíbia e fêmur	21/06/12	20/03/41	Murungú - Ceará	-
MN 5572	120621 - MN7	"	Pele com pelo	Região Torácica	"	"	"	-
MN 3957	120621 - MN8	<i>Callithrix jacchus</i>	Osso raspado	Tíbia	21/06/12	17/03/41	Guaramiranga - Ceará	Fêmea
MN 3957	120621 - MN8	"	Pele com pelo	Região Torácica	"	"	"	"
MN 23799	120621 - MN9	<i>Callithrix penicillata jordani</i>	Raspado de Crânio		21/06/12	03/07/49	Riachão das Neves - Bahia	Fêmea
MN 23799	120621 - MN9	"	Pele com pelo	Região abdominal	"	"	"	"
MN 11164	120621 - MN10	<i>Callithrix penicillata jordani</i>	Pele com pelo	Região abdominal	21/06/12	?	Belém - Bahia	Macho

Amostras de pele, pelo e osso totalizaram 16 fontes para extração de DNA. Toda a coleta foi realizada no Museu Nacional com procedimentos para evitar contaminações com DNA dos pesquisadores presentes (jaleco, luvas, máscara, touca e instrumentos estéreis)

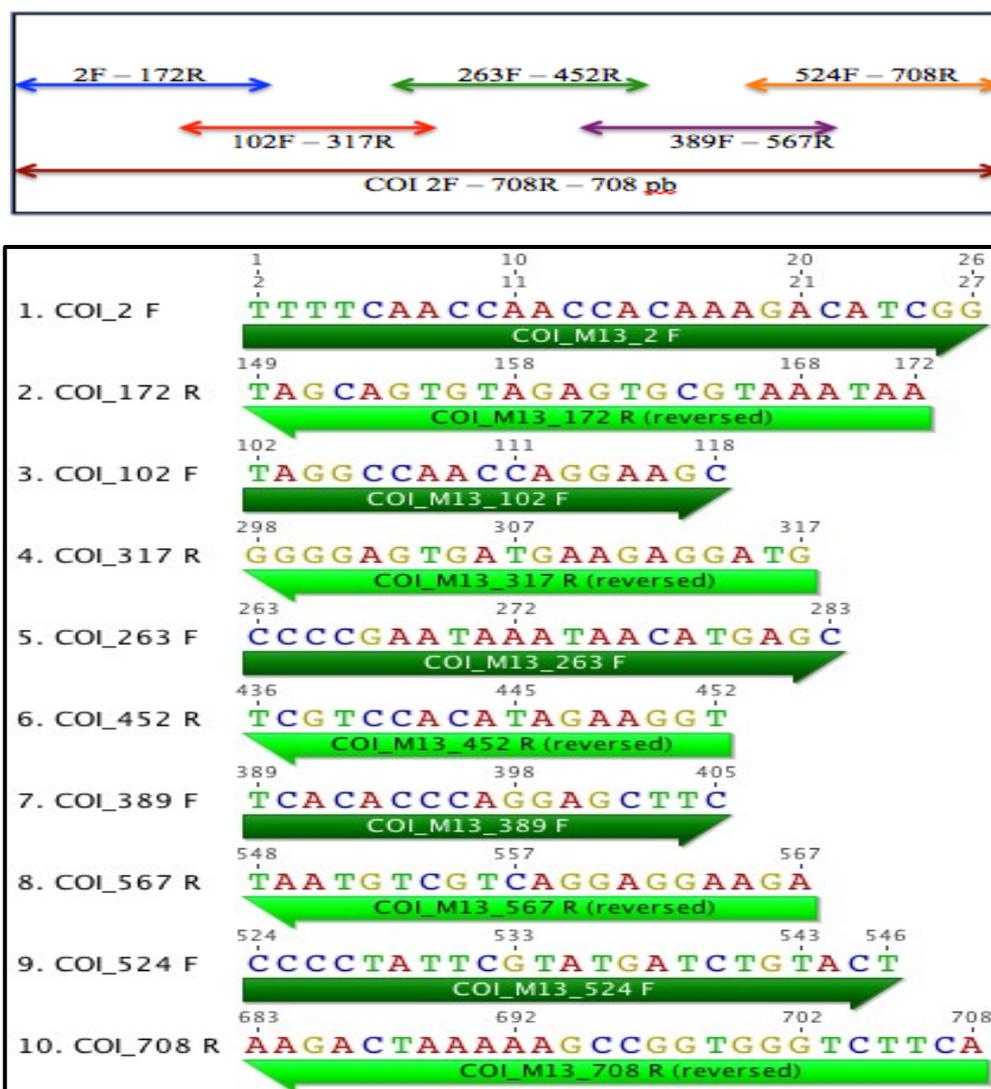
As amostras passaram por tratamentos de limpeza anteriores ao processo de extração de DNA. Ossos e pele foram raspados com uma lâmina para remover camadas superficiais de impurezas e contaminantes, e posteriormente foram hidratadas com solução TE (Tris 10mM e EDTA 1mM, pH7.6). As amostras de pelo foram limpas com um cotonete e etanol absoluto.

A extração de DNA foi feita utilizando um kit licenciado, o *Qiagen QIAamp DNA Investigator kit*.

Cinco pares de iniciadores de PCR foram elaborados com a ajuda do software Geneious 6.1 utilizando uma sequência de COI de 708 pares de bases (pb) de um *C. aurita* (amostra tirada de sangue de um indivíduo vivo). Esses iniciadores foram confeccionados para dividir o COI de 708 pb em cinco sub-regiões, com sobreposição nas pontas para permitir a montagem dos fragmentos depois do sequenciamento (Figura 27).

Os primers, dentre os diversos gerados pelo programa computacional, foram escolhidos buscando-se evitar características indesejáveis (como a formação de auto-dímeros e de “grampos”) e aproximar as temperaturas de pareamento (T_m) entre os pares de iniciadores de cada fragmento.

Figura 27 - Conjunto dos 10 primers elaborados para a amplificação de 5 fragmentos intercalados do COI (708 pb) de sagüis



Depois de definida as sequências de cada primer, foram adicionadas caudas M13 em cada um e então encomendados para produção pela empresa Exxtend Biotecnologia Ltda. Nos primers *forward* (F) foi adicionada a cauda M13(-21) e nos primers *reverse* (R) foi adicionada a cauda M13(-27), ambas a partir da referência de (Messing, 1983).

Depois de confeccionados, os cinco pares de primers foram testados isoladamente em um processo de reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um DNA extraído de uma amostra de sangue de um sagüi da espécie *Callithrix aurita* (NOG1).

Protocolo para o PCR de COI – 2 μL de DNA diluído ao MIX com 6,25 μL de tampão (4x), 0,25 μL de Taq Platinum (5 U/ μL), 2 μL para os primers forward e reverse (20 pmol / μL) e 12,5 μL de H₂O MiliQ (Tabela 17).

Tabela 18 – Reagentes combinados na preparação do MIX para as reações de PCR dos marcadores de COI de sagüis (valores de referência para 1 reação).

MIX	COI (μL)
Tampão Platinum 4x	6,25
Taq DNA platinum (5 U/ μL)	0,25
Primer F (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2,0
Primer R(20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2,0
H ₂ O MiliQ	12,5

Os ciclos de temperatura da PCR foram realizados em termocicladores *Veriti Thermal Cycler* da INL com pequenas variações entre os pares de primers, os pares 2, 4 e 5 usaram a T_m de 57°C, o par 1 usou a T_m de 62°C e o par 3 usou a T_m de 53°C (Tabela 18).

Tabela 19 - Condições termocíclicas das PCRs utilizadas neste trabalho.

COI			
Ciclos	T _m	Duração	
30 ciclos	95° C	5 min	
	{ 94° C	60 seg	
		53/57/62° C	60 seg
		72° C	120 seg
		72° C	10 min

Para a verificação inicial dos produtos da amplificação, alíquotas dos produtos de PCR dos marcadores (5 µL) eram misturadas com 1 µL de tampão de carregamento de amostra (Loading Dye blue 6x /GelRed 10.000x diluído) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% a 70 volts para posterior visualização em luz UV.

A purificação do produto amplificado da PCR serve para evitar que reagentes, como iniciadores e dNTPs, que não foram utilizados na PCR, interfiram nas reações seguintes. Para isto, a metodologias de purificação utilizada (para todos os produtos de PCR gerados neste trabalho) foi o tratamento com uma mistura das enzimas EXO e SAP (1:1).

Os produtos amplificados foram purificados utilizando as enzimas Exonuclease I (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), ambas disponíveis em conjunto em *ExoSAP-IT*(GE®). A enzima Exo I degrada os iniciadores e DNA de cadeia simples enquanto a SAP desfosforila os dNTPs em solução.

Após as reações de PCR, 2,0 µL da *ExoSAP-IT*® eram adicionadas a 5 µL do produto amplificado, sendo a mistura incubada a 37°C, por 15 minutos, seguindo-se de uma incubação por 15 minutos, a 85°C para promover a inativação das enzimas, de acordo com as indicações do fabricante. As incubações foram realizadas no termociclador *GeneAmp 9700* da Applied Biosystems.

Os produtos de amplificação purificados foram sequenciado pelo método cíclico de terminação de cadeia (Sanger e Nicklen, 1977; Sanger *et al.*, 1973). Os mesmos pares de iniciadores usados na reação de PCR foram utilizados individualmente para dirigir a síntese de uma nova fita.

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o produto *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0*, (Applied Biosystems, Co) (Tabela 19).

Tabela 20 – Protocolo para a confecção do *Mix* para uma reação de sequenciamento.

MIX	Concentração	COI (µL)
Tampão (5x)		6,25
BigDye		0,25
Primer F ou R	(10 µg/ µL)	2,0
H ₂ O MiliQ		12,5

As reações foram realizadas em microtubos adicionando-se 2,0 μL do produto da PCR purificado, resultando em um volume final de 10 μL . As reações de sequenciamento eram procedidas nos termocicladores 9700 ou Veriti (*Applied Biosystems*), nas condições descritas na tabela 20.

Para a reação de sequenciamento foi utilizada a razão de 2 μL de BigDye, 2 μL de Tampão (5x), 1 μL de primer a 10 pmol/ μL (forward separado do reverse) e 3 μL de μL de H_2O MiliQ para 2 μL de DNA a 10 ng/ μL .

O programa de sequenciamento foi feito com 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C mais 5 minutos a 60 °C por 25 ciclos.

Tabela 21 - Condições termocíclicas para as reações de sequenciamento dos marcadores de mtDNA de sagüis

Ciclos	Temperatura	Duração
	95° C	10 seg
	50° C	5 seg
25 ciclos	60° C	4 min

O resultado do sequenciamento (10 μL) foi purificado com o uso de colunas da resina Sephadex, centrifugado por 5 minutos com uma rotação de 6500 rpm.

Aos produtos centrifugados foram adicionados 10 μL de formamida HiDi, colocados na placa de sequenciamento e processados no aparelho ABI 3500 da Applied Biosystems / Hitachi. Para visualização, alinhamento e análise das seqüências foram utilizados os softwares Sequence Analysis, BioEdit e Mega 4.0.

3.3.1 Alinhamento e análise das seqüências

Os eletroferogramas obtidos foram analisados através do software *Sequencing Analysis 3.7* (Applied Biosystems) para a determinação da qualidade das seqüências. O alinhamento e edição das mesmas foram feitos com a utilização dos softwares BioEdit 7.053 (Hall, 1999), Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), ambos utilizando o recurso ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e/ou Geneious R6 ajustado na opção padrão (“geneious alignment”).

A purificação dos produtos da reação de sequenciamento em resina *Sephadex* G-50, a preparação das amostras, a eletroforese capilar, o alinhamento e a análise das sequências são processos que foram realizados de forma idêntica para todas as ampliações feitas com os diferentes iniciadores.

Após o alinhamento, as sequências foram avaliadas visualmente e eventualmente corrigidas manualmente (usando o software Geneious R6) considerando a semelhança entre as sequências F e R. Uma sequência consenso foi extraída e alinhada com as demais sequências consensos.

3.4 Resultados

Três primers apresentaram temperaturas possíveis de provocar “grampos” e outros três apresentaram temperaturas onde seria possível a ocorrência de auto-dímeros. O tamanho das sequências dos iniciadores variaram entre 17 a 26 pares de bases. A tabela abaixo (Tabela 21) relaciona cada primer com algumas suas características físico-químicas. Os pares de primers tiveram desde temperaturas idênticas de pareamento (COI_389 F – COI_567 R) até temperaturas que variaram em aproximadamente 8°C (COI_524 F – COI_708 R).

Tabela 22 – Características dos iniciadores (primers).

Nome	Sentido	Início	Fim	Tamanho	T _m	%GC	Hairpin T _m	Self Dimer T _m	Sequência
COI_2 F	forward	2	27	26	62.8	42.3	None	None	TTTTCAACCAACCACAAAGACATC GG
COI_172 R	reverse	149	172	24	59.2	37.5	37.8	None	AATAAATGCGTGAGATGTGACGA T
COI_102 F	forward	102	118	17	55.9	58.8	41.2	5.0	TAGGCCAACCGGAAGC
COI_317 R	reverse	298	317	20	55.8	55.0	None	None	GTAGGAGAAGTAGTGAGGGG
COI_263 F	forward	263	283	21	54.8	42.9	None	None	CCCCGAATAAATAACATGAGC
COI_452 R	reverse	436	452	17	51.4	47.1	None	None	TGGAAGATACACCTGCT
COI_389 F	forward	389	405	17	55.5	58.8	None	None	TCACACCAGGAGCTTC
COI_567 R	reverse	548	567	20	55.5	45.0	32.2	None	AGAAGGAGGACTGCTGTAAT
COI_524 F	forward	524	546	23	56.8	43.5	None	7.1	CCCCTATTTCGTATGATCTGTACT
COI_708 R	reverse	683	708	26	65.0	46.2	None	15.5	ACTTCTGGGTGGCCGAAAAATCA GAA

Os pares de primers amplificaram com êxito (via PCR) cada um dos cinco fragmentos em que foi dividido o fragmento maior de 708pb do COI (DNA extraído de uma amostra sangue de um sagüi vivo) o que possibilitou o igualmente exitoso sequenciamento dos pares de fitas “forward” (F) e “reverse” (R) que, juntas, formaram as sequências consenso para a montagem dos pedaços de forma a completar o fragmento total de 708 pb (Figura 29). O primer que gerou o menor sequenciamento foi o *COI_567 R* (“4_R” na imagem) com 147 pb, e o que gerou a maior fita foi o *COI_102 F* (“2_F” na imagem) com 196 pb. O iniciador *COI_172 R* (“1_R” na imagem) gerou um “grampo” (hairpin) produzindo um sequenciamento espelhado e em reverso-complemento, contudo, sem comprometer a confecção da fita alvo (Figura 28).

Figura 28 - Eletroferogramas (produzidos com o software Geneious 6.0) dos sequenciamentos de cada um dos 10 primers (elaborados para a confecção do COI de sagüis) utilizando uma amostra referência de sangue de um indivíduos vivo.

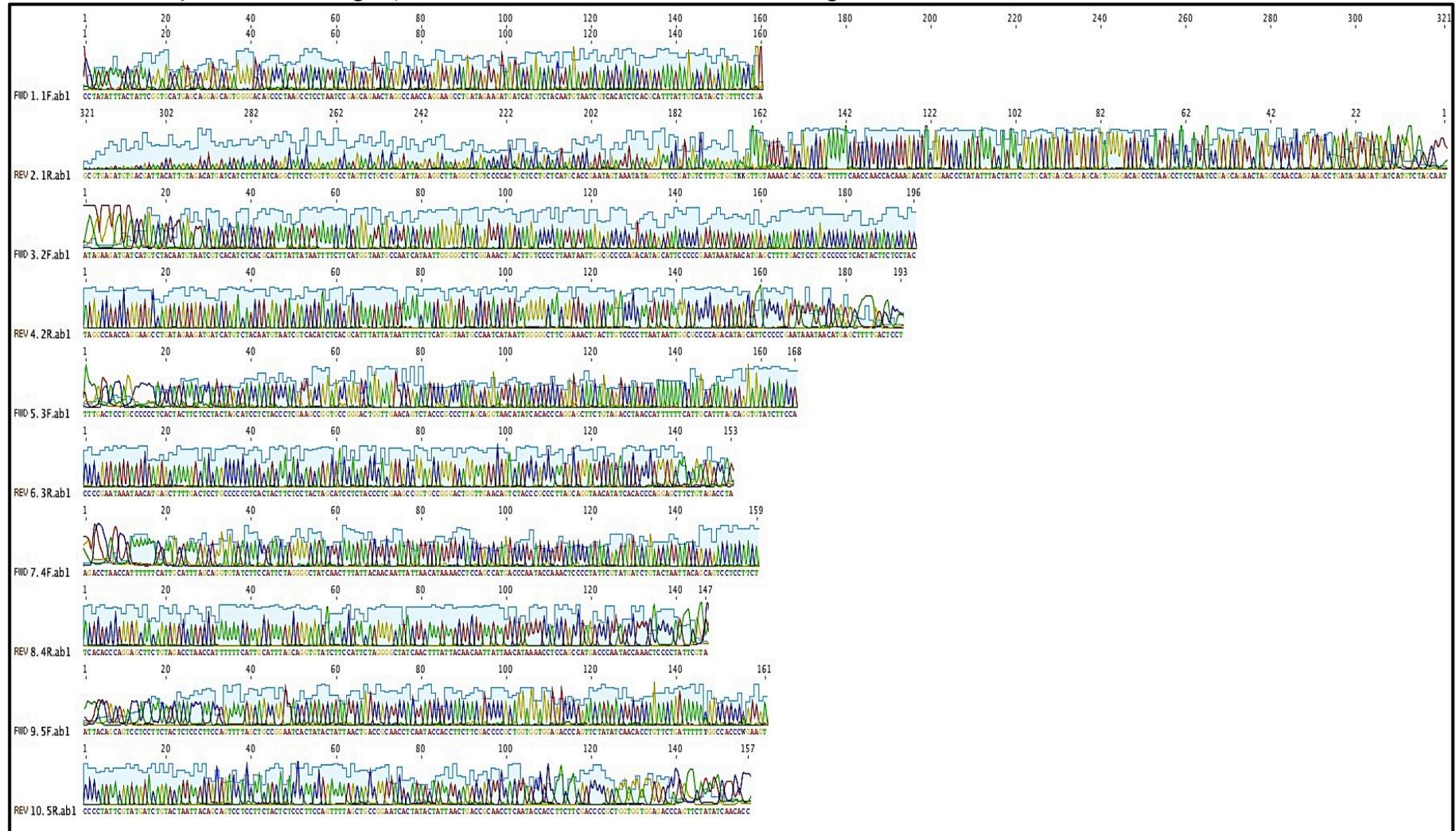
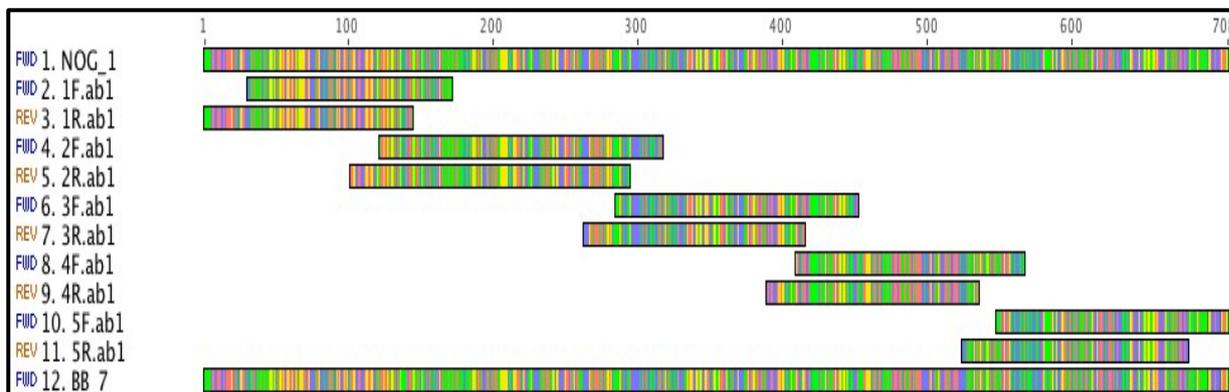
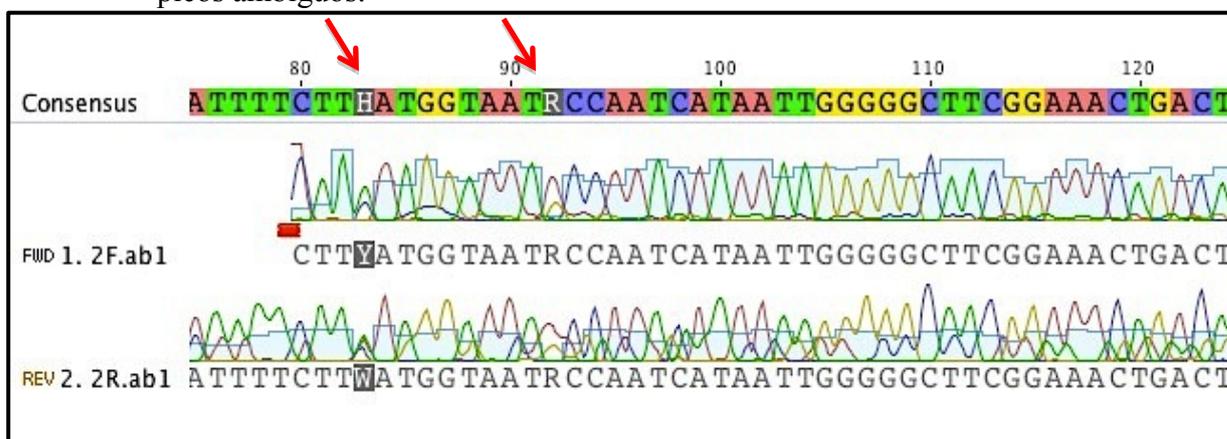


Figura 29 - Alinhamento (produzidos com o software Geneious 6.0) das 10 seqüências produzidas com os cinco pares de primers de COI, entre duas seqüências de referência de *Callithrix aurita* (NOG_1) e *C. jacchus* (BB_7) com tamanho total de 708 pb.



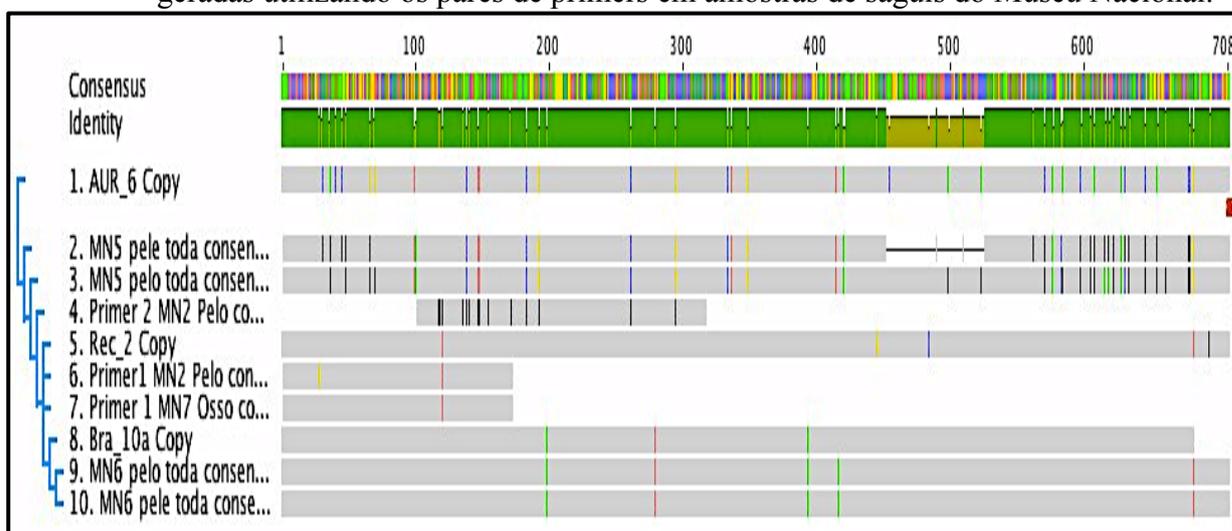
O teste dos primers, nas 16 amostras retiradas do Museu Nacional, geraram sete (43,7%) sequenciamentos (consensos montados), sendo que somente em quatro amostras foram capazes de reconstruir a seqüência de 708 pb completa: MN5_pele, MN5_pêlo, MN6_pele e MN6_pêlo. MN5 apresentou sequenciamentos com eletroferogramas “sujos” para os primers do início e do final do COI, para ambas as amostras, como revelam as marcas pretas (bases não definidas) (Figura 30). MN6, por outro lado mostrou seqüências limpas para ambas as amostras e para todos os cinco pares de primers. As amostras mais antigas, MN2 (1931) e MN7 (1931), não conseguiram ter todos os cinco pares de primers com resultados. MN2 (um *C. aurita*) sequenciou o primeiro primer com muito “ruído” emparelhando-se com *C. jacchus*, o segundo fragmento apresentou a fita do primer *forward* bastante limpa, mas apresentou as bases características da espécie com picos ambíguos (Figura 30) embora emparelhando com *C. aurita*. O exemplar MN7, um sagüi catalogado como *C. jacchus*, teve um sequenciamento limpo de 171 pb e alinhou-se com a seqüência de referência da mesma espécie (BB_7) (Figura 31).

Figura 30 - Detalhe do sequenciamento do segundo fragmento do COI da amostra MN2 (1931) mostrando as bases de diferenciação entre *C. aurita* e *C. jacchus* com picos ambíguos.



A árvore gerada pelo software Geneious (NJ – JC) não separou os clados para as três espécies, mas permite uma visualização das bases que distinguem e agrupam as sequências, possibilitando que se perceba a disposição dos dados sobre os quais a árvore foi montada (Fig. 31).

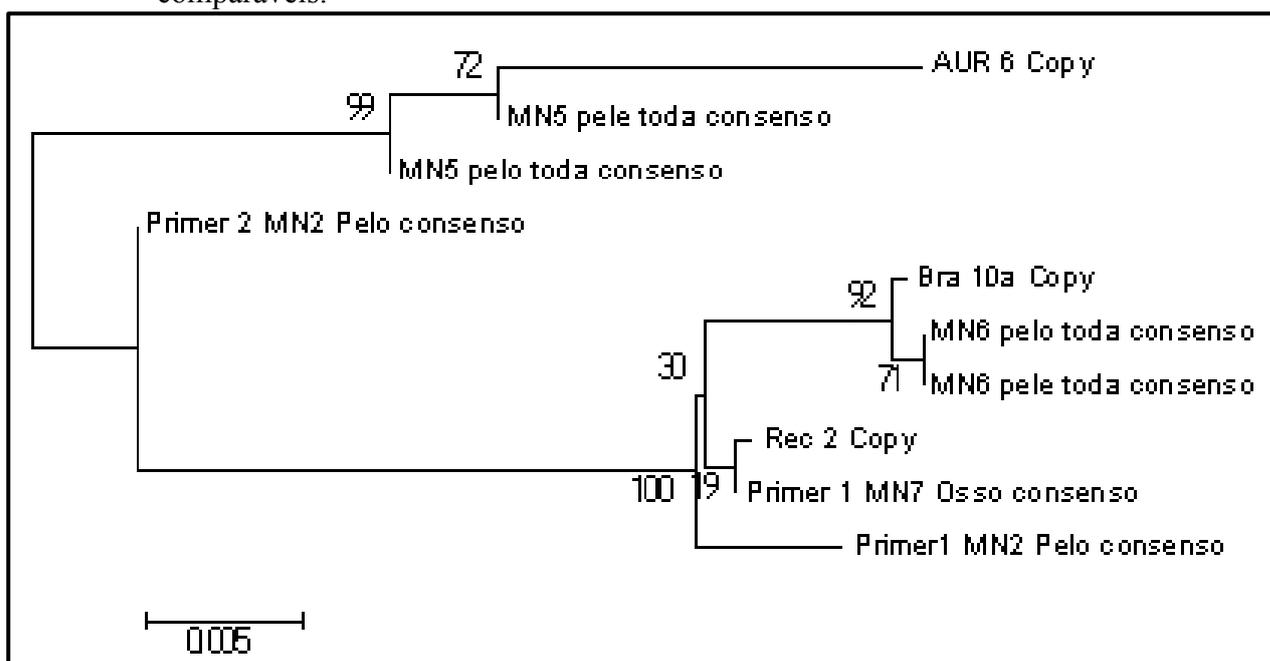
Figura 31 - Árvore gerada usando o modelo de Neighbor-Joining (Jukes-Cantor) (software Geneious 6.0) mostrando os agrupamentos do alinhamento entre as sequências geradas utilizando os pares de primers em amostras de sagüis do Museu Nacional.



O software MEGA oferece algumas opções distintas das do Geneious, e permitiu a construção de uma árvore (NJ – K2P) em que as bases ambíguas fossem ignoradas. A árvore gerada desta forma agrupou indivíduos com semelhanças moleculares com o mesmo critério da classificação morfológica que os uniu em uma

mesma espécie. Os exemplares do Museu Nacional MN5 (pele e pelo), MN6 (pele e pelo) e MN7 (osso) agruparam corretamente com as referências das espécies correspondentes, *C. aurita*, *C. penicillata* e *C. jacchus*, respectivamente. Os sequenciamentos dos fragmento 1 e 2 do exemplar MN2 (pelo) não conseguiram parrear esse indivíduo com a espécie semelhante a que ele é descrito morfológicamente (*C. aurita*), o fragmento 1 (que apresentou um sequenciamento com ruído significativo) se agrupou com 100% de identidade com o clado de *C. jacchus*, e o fragmento 2, que teve picos ambíguos (particularmente nas mesmas bases que separam *C. aurita* de *C. jacchus*) apesar de ter um sequenciamento mais limpo, ficou isolado entre o clado dos *C. aurita* e os clados de *C. jacchus* e *C. penicillata* (Fig.32).

Figura 32 – Árvore (NJ – K2P) (feita com o software Geneious 6.0) mostrando os agrupamentos das amostras do Museu Nacional que geram seqüências comparáveis.



Se considerarmos o êxito de cada um dos 10 primers para cada uma das 16 amostras, isso resulta em 160 sequenciamento, sendo que destes, 46 geraram resultados apreciáveis, e destes 46, somente 30 (18,7%) sequenciamentos saíram limpos (todos os pares para MN6 pele e pelo, os pares 2 e 3 para MN5 pele e pelo, e o primer 1 para MN7 osso) (Tabela 22).

Tabela 23 - Pares de primers que resultaram em pares de sequências (F e R) limpas para as amostras do Museu Nacional

Pares de primers	Indivíduo	Amostra	No. de tombo	Data	Local	Espécie2
2 e 3	MN5	pele	MN 77420	2010	Parati - RJ	<i>C. aurita</i>
2 e 3	MN5	pelo	MN 77420	2010	Parati - RJ	<i>C. aurita</i>
todos	MN6	pele	CB 78	2009	pele BR 040 - Simão Pereira -	<i>C. penicillata</i>
todos	MN6	pelo	CB 78	2009	RJ	<i>C. penicillata</i>
1	MN7	osso	MN 5572	1941	Murungú - Ceará	<i>C. jacchus</i>

A elaboração dos cinco pares de primers para fragmentos menores do marcador COI de sagüis passou pelas dificuldades intrínsecas do processo para conseguir originar produtos factíveis. Apesar das diferenças nas temperaturas de pareamento (T_m), foram usadas apenas três temperaturas diferentes para o protocolo de PCR: 62°C para o par do primeiro fragmento; 57°C para os pares do segundo, quarto e quinto fragmento; e 53°C para o par do terceiro fragmento.

O primer reverso do primeiro fragmento (COI_172 R), apesar de apresentar uma T_m relativamente alta produziu um “grampo” causando um sequenciamento “espelhado” com aproximadamente o dobro do tamanho, mas como todos os primers foram confeccionados com uma cauda M13, é possível que o grampo tenha ocorrido pela soma de ambos primer e M13. Esse fato foi único, não ocorrendo nos demais primers.

3.5 Discussão

O teste destes cinco pares de primers, feito com DNA recente (sangue de um sagüi vivo) resultou em 10 sequências limpas, isto atribuiu confiabilidade para a eficácia de cada primer como iniciador de sequências complementares. Esse teste foi realizado duas vezes e em ambas o resultado foi igualmente satisfatório, originando sequências de aproximadamente 200pb, que depois de alinhadas, resultaram em uma sequência consenso de 708 pb idêntica à sequência de referência para a espécie, feita com somente um par de iniciadores.

O trabalho de encontrar e amplificar DNA de amostras degradadas não responde da mesma maneira as expectativas de resultados que amostras “frescas” (Hedmark e Ellegren, 2005). A expectativa mais ampla deste estudo era a de conseguir extrair, amplificar e sequenciar todas as amostras em todo seu comprimento. Uma expectativa particular e mais realista era a de conseguir, ao menos, um sequenciamento suficientemente grande de uma amostra antiga de *C. aurita* capaz de confirmar o padrão das sequências de indivíduos vivos da mesma espécie. Resultados intermediários foram conseguidos. Amostras mais recentes (MN5 - 2009) de *C. aurita* e de *C. penicillata* (MN6 - 2010) serviram positivamente como fonte para extração de DNA mitocondrial para toda a sequência do COI, e uma das amostras de um exemplar antigo (MN7 - *C. jacchus* - 1941) possibilitou ao menos um bom resultado para um dos fragmentos (primeiro par de iniciadores). Um único fragmento não é, entretanto, uma referência que permita julgamentos mais precisos, isto é, dada a situação relativa onde espera-se que o marcador molecular COI apresente distâncias genéticas entre espécies de um mesmo gênero que estejam entre 2,5 e 12. Cinco por cento de mutações em uma sequência de 700 bp são 35 bases mudadas, o que é próximo da distância entre *C. aurita* e as demais espécies de *Callithrix* (exceto *C. flaviceps*), contudo, entre estas demais espécies, as distâncias genéticas são menores que 2. São cerca de sete mutações que diferenciam o COI de *C. jacchus* do COI de *C. penicillata*, isso significa que trechos longos, relativamente ao tamanho dos fragmentos menores, possam existir sem que se encontre nenhuma diferença, como pode ser visto entre os números 500 e 700 onde não se encontram mutações entre as duas referidas espécies.

Para o caso do primeiro fragmento sequenciado da amostra de osso do MN7, uma única mutação foi responsável para agrupar este exemplar com a amostra de referência (Rec_2), o que não teria ocorrido se o fragmento fosse o quinto.

O tratamento de amostras degradadas, que é feito antes do início do processo de extração, é uma etapa delicada e fundamental tanto para acessar o DNA alvo quanto para evitar contaminações. A parte anatômica escolhida (ou disponível) como fonte para a extração de DNA também determina características próprias para o êxito ao acesso do DNA. Casas-Marce, Revilla e Godoy (2010) afirmam que ossos e garras forneceram melhores resultados do que couro, em mamíferos. Hedmark & Ellegren (2005) obtiveram bons resultados com amostras tiradas de perfurações, feitas com

brocas de dentista, em patas de lobos e lince depositados em museu entre 5 e 20 anos, igualmente Polanc *et al.* (2012) relatam melhores resultados de amostras retiradas de perfurações com brocas de patas de lince do que com cortes de pele, em exemplares de museu de até 40 anos.

Moraes-Barros e Morgante (2007) tiveram êxito de 42% (8 de 19) na extração e sequenciamento (cyt b – 400pb) de cortes de pele de preguiças de museu de 18 a 108 anos. Estes resultados são melhores que os atingidos no presente trabalho, o pré-tratamento das peles pode ter sido determinante para essa diferença, uma vez que, alguns dos nossos resultados apresentaram sequenciamentos que mostravam picos da mesma espécie da amostra sobre picos do que parecia ser de outra espécie de sagüi. Isto ocorreu com os exemplares de *C. aurita* MN2 (1941) e MN5 (2010), sendo que no caso do MN5 houve pares de primers que produziram sequências limpas (2 e 3) e pares de primers que produziram sequências contaminadas (1, 4 e 5) aparentemente com DNA de *C. jacchus*. Como os exemplares ficam guardados em compartimentos comuns, não é improvável que contaminações ocorram.

Apesar de ruídos e de fragmentos não amplificados, a árvore filogenética agrupou cinco amostras (de três exemplares) dentre as 16 (dez exemplares) do Museu Nacional, onde três exemplares foram posicionados com as referências corretas de suas espécies (classificação morfológica). O exemplar MN2 que resultou em um de seus sequenciamentos agrupado com *C. jacchus*, provavelmente por motivo de mistura de fontes de DNA e de uma ineficiente limpeza desse material, ao menos mostrou no fragmento 2 a presença do DNA original de *C. aurita* como fonte de um dos picos duplos vistos no sequenciamento, indicando uma esperança de se acessar esse material.

Este estudo não testou outras técnicas de tratamento anterior à extração do DNA e, diante dos resultados dos outros autores citados, em que melhores resultados são conseguidos com partes mais profundas do tecido, sugerimos que futuros testes sejam realizados buscando comparações entre diferentes tratamentos pré-extração.

3.6 Conclusão

Os cinco pares de primers foram eficazes para amplificar diferentes partes anatômicas de amostras de museu embora as melhores amplificações tenham a partir de amostras recentes (2009 / 2010).

Pele e pelo foram igualmente bem sucedidas como fonte de DNA nas amostras sequenciadas.

O objetivo do sequenciamento completo (junção das amplificações de cada par de primer) para as amostras mais antigas não foi alcançado, mas amostras mais recentes possibilitaram o sequenciamento completo.

O DNA de amostras mais antigas (1931 e 1941) foi acessado por dois pares de primers (COI_2 F / COI_172 e COI_102 F / COI_317 R) que funcionaram com essas amostras (MN_2 / MN_7) mostrando que há possibilidades de colaborar com a identificação de sagüis envolvidos em assuntos forenses, através de comparação com amostras de museu. Em particular para o *C. aurita*, todos os cinco pares de primers funcionam, em relação às demais espécies testadas, como bons identificadores para a espécie (há que se testar com o *C. flaviceps*), pois existem polimorfismos suficientes em cada trecho para se fazer a separação.

O sucesso destes cinco pares de primers para amplificar amostras de museu depende do processo de pré-tratamento das amostras e de sua capacidade de isolar o material genético original de contaminantes.

4 CARACTERIZAÇÃO DOS SAGÜIS-DA-SERRA-ESCUROS, INVASORES E HÍBRIDOS PRESENTES NA MATA ATLÂNTICA DO SUDESTE ATRAVÉS DO USO DE IMAGENS FOTOGRÁFICAS DIGITAIS PADRONIZADAS

4.1 Introdução

Os costumes de transportar animais silvestres, tirados de sua área de ocorrência e levados para habitats de outras espécies, é antigo como as peregrinações humanas, mas foram muito intensificados com a evolução dos meios de transporte. No Brasil, a ampliação da malha rodoviária e dos transportes promovidos a partir da década de 20 proporcionou a intensificação do transporte de animais e plantas de seus locais de origem para outros habitats, e hoje sagüis (*Callithrix*) provenientes do nordeste e do centro-oeste estão amplamente disseminados no sudeste que é área de ocorrência do sagüi-da-serra-escuro (*C. aurita*), e têm sido considerados como uma grave ameaça às espécies nativas (Carvalho *et al.*, 2013; Morais Jr. *et al.*, 2008; Nunes, 2015; Oliveira e Grelle, 2012b; Pereira, 2006; Ruiz-Miranda *et al.*, 2000).

Devido ao seu alto grau de plasticidade ambiental, essas espécies de sagüis exóticas invasoras conseguem se adaptar facilmente em áreas degradadas (Hershkovitz, 1997; Mendes, 1997a) diferentemente do *C. aurita*, que sofre com a destruição em grande escala das florestas primárias de sua área de distribuição natural, mostrando dificuldade em se adaptar a florestas secundárias. Essas espécies, além de competir por espaço e alimento, também podem hibridar com a espécie nativa (Carvalho *et al.*, 2013; Morais Jr. *et al.*, 2008; Nunes, 2015; Pereira, 2006).

A hibridação é o processo de cruzamento entre espécies diferentes, que leva ao surgimento natural de indivíduos híbridos (Ackermann e Bishop, 2010; Batista, Lencioni e Mittmann, 2011; Zinner, Arnold e Roos, 2011b). Indivíduos híbridos podem apresentar características de coloração e pelagem intermediárias das características presentes nos indivíduos que lhes deram origem (Andrade, 2006; Coimbra-Filho, Pissinatti e Rylands, 1993) (Quadro 1), misturando as características fenotípicas e dificultando a identificação e caracterização dessas espécies, e isso

também acontece entre as espécies *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* (Pereira, Oliveira e Ruiz-Miranda, 2008; Traad e Leite, 2012). Além disso, e principalmente, a hibridação pode descaracterizar uma espécie do ponto de vista genético (Morais Jr., 2005).

Quadro 1 – Caracterização de três espécies de *Callithrix* (continua)

<i>C. aurita</i>	<i>C. jacchus</i>	<i>C. penicillata</i>
<p>Possui coloração negra com uma máscara poligonal branca evidente (VIVO, 1991; MELO e RYLANDS, 2008).</p> 	<p>Possui coloração castanha com uma mancha branca acima dos olhos (VIVO, 1991).</p> 	<p>Pode apresentar cor negra ou castanho-escuro com uma mancha clara acima dos olhos (VIVO, 1991)</p> 

<i>C. aurita</i>	<i>C. jacchus</i>	<i>C. penicillata</i>
<p>Podem apresentar coloração branca ou amarelada, com pêlos curtos que se originam da face interna dos pavilhões auditivos (VIVO, 1991; MELO e RYLANDS, 2008).</p> 	<p>Apresentam coloração branca, com pelos posicionados acima e na frente das orelhas (VIVO, 1991)</p> 	<p>Formado por pêlos pré-auriculares longos e de cor negra, que lembram o formato de um pincel (VIVO, 1991).</p> 

Quadro 1 – Caracterização de três espécies de *Callithrix* (conclusão)

<i>C. aurita</i>	<i>C. jacchus</i>	<i>C. penicillata</i>
<p>Varia de tons pardos ao negro absoluto (COIMBRA-FILHO, 1990; VIVO, 1991; MELO e RYLANDS, 2008).</p> 	<p>Apresenta-se na cor cinza escuro, com estrias no dorso (VIVO, 1991).</p> 	<p>Apresenta-se na cor cinza claro com reflexos castanhos e pretos (VIVO, 1991).</p> 

<i>C. aurita</i>	<i>C. jacchus</i>	<i>C. penicillata</i>
<p>Possui coloração negra com anéis largos e escuros alternados com anéis mais estreitos e mais claros (COIMBRA-FILHO, 1990; VIVO, 1991).</p> 	<p>Possui coloração negra com anéis largos e escuros alternados com anéis mais estreitos e mais claros (VIVO, 1991).</p> 	<p>Possui coloração negra com anéis largos e escuros alternados com anéis mais estreitos e mais claros (VIVO, 1991).</p> 

É comum a expectativa de que os processos de especiação acabem originando espécies visualmente reconhecíveis e de que o tempo, mais cedo ou certamente mais tarde, faça transparecer o que foi transformado inicialmente no DNA, deste para as proteínas e destas para o fenótipo (sem falar da fisiologia e do comportamento). Mas esse é um processo longo e nem sempre retilíneo e que, em seu curso, frequentemente interpõe desafios para taxonomistas, sistematas e filogeneticistas, ao apresentar uma realidade não categorizada

Um dos problemas enfrentados pelos agentes responsáveis por programas de manejo ou controle de espécies invasoras é reconhecer com segurança os padrões morfológicos específicos que caracterizam e separam indivíduos de uma e outra espécie. Esse problema se agrava quando as espécies apresentam morfotipos etários diferentes e quando ocorre hibridação. Para os trabalhos de controle ou manejo de espécies, os agentes de campo precisam ter ferramentas precisas de identificação, uma vez que frequentemente precisam tomar decisões momentâneas, muitas vezes irreversíveis.

Um estudo que relacione a variação de cor dos diversos tipos de sagüis encontrados na região de ocorrência do *C. aurita* pode trazer respostas sobre o nível de segurança que uma avaliação de campo pode ter na categorização de indivíduos de diferentes espécies e de seus híbridos, portanto passíveis de serem objeto de programas de manejo ou controle.

A variação de cor pode ser encontrada em uma ampla variedade de animais e, desde a época de Darwin, várias hipóteses evolutivas foram levantadas acerca da coloração animal como respostas adaptativas (Bergman e Beehner, 2008). A biologia evolutiva e comportamental desempenha um importante papel na investigação sobre as funções adaptativas dessas colorações (Stevens *et al.*, 2007). Segundo (Endler, 1990), o padrão observado na coloração animal pode estar diretamente relacionado à comunicação intraespecífica, à termorregulação e à autoproteção frente a predadores. Os principais focos de estudo relativos à variação de cor nos animais, são as investigações evolutivas e funcionais acerca da camuflagem, aposematismo, mimetismo e sinalização social e sexual (Stevens *et al.*, 2007). Em vista dos grandes avanços decorrentes do conhecimento do funcionamento da visão e como ela varia entre as espécies, tem se tornado indispensável a busca por meios de quantificar propriedades cromáticas (Stevens *et al.*, 2007).

Até pouco tempo atrás, estudos tendiam a utilizar percepções humanas, portanto, subjetivas, para avaliar a variação de cor. Entretanto, a interpretação dessa variação vão além do que os olhos humanos podem ver, sendo requerido, dessa forma, um meio eficaz de quantificação colorimétrica (Pike, 2011). Essa quantificação de cores começou a ser feita em uma escala contínua de modelos convencionais de cores, desenvolvidos para os seres humanos, e passíveis de análises estatísticas (Villafuerte e Negro, 1998) décadas antes da era digital.

Quantificar cores demanda um conhecimento sobre as características físicas da luz, o que ocorre durante sua transmissão até o objeto e deste até o receptor, e como se dá sua recepção e interpretação. Em outras palavras, o espectro de luz que atinge a superfície de um receptor (como o olho ou a câmara fotográfica) a partir de um objeto colorido depois de iluminado é uma função do espectro de luz do ambiente agindo como fonte luminosa, do espectro de refletância do objeto e da transmissão do espectro pelo meio (ar ou água).

A percepção (biológica) da cor e do brilho de um elemento depende, portanto, de três fatores: 1) as características físicas da refletância (proporção entre o fluxo de radiação eletromagnética incidente dividido pelo fluxo refletido) e da transmissão até a superfície do olho; 2) as características físicas de transmissão, refração e foto-recepção dentro do olho; e 3) os processos neurais da retina e do cérebro que criam a percepção da cor e do brilho.

Para um receptor de imagem como câmaras digitais, o conceito permanece o mesmo trocando-se o aparato biológico (olho) pelo aparato mecânico artificial, e o sistema nervoso pelo sistema de sensores digitais.

A luz existe como um fluxo de fótons ou como um quanta (pacote) de energia. Vertebrados e invertebrados respondem diretamente à quantidade de fótons que seus foto-receptores captam e não à energia do fóton (Lythgoe, 1979 *apud* Endler, 1990; Hurvich e Jameson, 1896) portanto, a intensidade de uma onda de luz deve ser interpretada como o fluxo de fótons e medido em moles por metro quadrado por segundo. Entre os comprimentos de onda de 400nm a 700nm, uma lâmpada de halogênio emite $20 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 1000 lux enquanto uma lâmpada fluorescente emite $13 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 1000 lux, sendo que a primeira tem um espectro mais rico em comprimentos de onda longos (Li-Cor, 1982).

Objetos com padrões de cores que correspondam aos comprimentos de onda mais intensos de diferentes fontes luminosas aparecerão mais brilhantes para essas cores (Endler, 1990).

O espectrofotômetro é uma ferramenta capaz de medir cores (em comprimento de ondas) de animais de forma objetiva e padronizada, contudo, a espectrometria é um processo complicado para o caso de animais de vida livre pois exige que a amostragem seja feita com muita proximidade do animal e com uma fonte de iluminação constante (Bergman and Beehner, 2007). Esse processo também tem outras limitações uma vez que exige uma amostragem de área muito restrita (pontual), desta forma, casos que exibem vários padrões de coloração demandam um número significativo de amostragens tornando o processo lento e trabalhoso, e ainda um animal imóvel (Endler e Mielke, 2005; Pike, 2011). Essas limitações tornam impraticáveis o uso desta técnica em muitos estudos de campo.

A fotografia tem sido cada vez mais utilizada em estudos de coloração animal, por conta da sua precisão e da flexibilidade que a imagem digital proporciona (Bergman e Beehner, 2008; Stevens *et al.*, 2007; Villafuerte e Negro, 1998). Além disso, o processo de fotografar é relativamente rápido, permitindo a obtenção e armazenamento de grande quantidade de dados (Stevens *et al.*, 2007).

A substituição do espectrofotômetro pela utilização de fotografias digitais para fins científicos implicou em uma inclusão de novos fatores capazes de causar distorções na aquisição de dados. Existe uma enorme variação de modelos de câmaras (e sensores) e de lentes com capacidades diferentes de transmissão, recepção e gravação dos dados gerados a partir de um objeto iluminado (veja Stevens, 2007 para maiores detalhes).

Cada pixel do sensor de uma câmara digital contém um fotodiodo (dispositivo que converte a luz em sinal elétrico) capaz de medir a intensidade da luz em um amplo espectro. Sobre o sensor fica um conjunto de filtros que dividem os componentes da luz (R, G e B - vermelho, verde e azul) deixando que cada pixel seja somente sensível a um único componente (Stevens, 2007). As imagens digitais consistem numa matriz de fotocélulas microscópicas onde a cor é registrada como valores de brilho (na faixa de 0-255) de vermelho, verde e azul (RGB).

Um dos requisitos necessários para uniformização de imagens são os padrões de cor. Ainda anterior ao desenvolvimento da captura digital de cores, foi a

elaboração de um sistema de composição de cores padronizadas por Albert H. Munsell no início do século XX, que dividiu as cores em uma composição de matiz, pureza da cor e luminosidade. O Catálogo de Cores de Munsell se tornou uma referência importante em todas as áreas que, de alguma forma, precisaram de uma resposta objetiva e científica sobre comparações e qualidades de cores.

O uso de padrões de cores permite a correção da variação dos valores de R, G e B devido a fontes diferentes de luz e também permite a correção das distorções causadas por razões inerentes aos artefatos utilizados como captadores e gravadores de imagens digitais. A resolução das questões que produzem diferentes valores de RGB, de um objeto de cor fixa, é fundamental para que um trabalho científico sobre coloração seja realizado, tanto para que estatísticas possam ser feitas de forma confiável dentro do próprio estudo, como para gerar dados utilizáveis em outros trabalhos.

Este estudo traz um conjunto de imagens feitas de três espécies de sagüis (e híbridos) que hoje dividem a área de ocorrência da espécie nativa *Callithrix aurita* (sagüi-da-serra-escuro) objetivando realizar uma comparação dos padrões de cores entre os diferentes fenótipos de modo a avaliar se existe distância colorimétrica categorizável entre os grupos. Resultados positivos podem garantir a identificação de indivíduos que não pertencem a espécie nativa ou que são híbridos, facilitando o manejo em áreas de proteção, assim como atribuindo confiabilidade na seleção e proteção dos indivíduos “puros” da espécie ameaçada *C. aurita*.

4.2 Objetivo

Caracterizar, através de comparação colorimétrica de imagens fotográficas padronizadas, sagüis das espécies *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* que convivem na área de ocorrência natural do *C. aurita*. Também é objetivo deste capítulo identificar padrões colorimétrico dos híbridos entre as espécies invasoras (*C. jacchus* e *C. penicillata*) e a espécie nativa (*C. aurita*) buscando reconhecer esses híbridos separadamente das espécies puras.

4.2.1 Objetivos específicos

- Comparar os canais de cores R, G e B (Vermelho, Verde e Azul), obtidos de fotografias tiradas de indivíduos das três espécies, *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* e seus híbridos que são gerados entre as espécies invasoras e a nativa;
- Encontrar variações nos padrões de coloração destas três espécies e dos híbridos que possam diferenciá-las;
- Desenvolver uma ferramenta de custo baixo para identificar indivíduos puros da espécie nativa ameaçada de extinção para facilitar decisões de manejo de híbridos e das espécies invasoras.

4.3 **Material de métodos**

4.3.1 Área de Estudo

Sagüis de vida livre, nativos, invasores e híbridos, foram capturados em diferentes localidades do território nacional, em áreas de floresta e em áreas residenciais fronteiriças com áreas de mata e em cativeiros. Essa amostragem mais ampla objetivou, não só que o material proveniente destas áreas aumentasse o tamanho amostral (N) e a variação ambiental garantindo maior solidez estatística, mas também que indivíduos buscados em seus locais de ocorrência natural servissem como referência das espécies locais: *C. jacchus* (Recife), *C. penicillata* (Brasília) e *C. aurita* (Rio de Janeiro e São Paulo).

Sagüis da espécie de interesse principal desse estudo, *Callithrix aurita*, foram buscados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro (PARNASO), em particular na sede de Petrópolis, onde já havia relatos de ocorrência

da espécie. Nesta região foram capturados sagüis dentro do parque e também em áreas circundantes (Figura 33) onde se encontrou animais nativos puros, animais invasores puros e híbridos entre ambos. Outra área onde sagüis de vida livre foram capturados foi em uma região rural perto da cidade de Juiz de Fora (MG).

Fotos de sagüis de cativeiro foram tiradas no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) (Figuras 34 e 35), no Centro de Primatologia de Brasília (CP-UnB) (Fig. 36), no Zoológico de Guarulhos (Fig. 37a) e no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) em Recife (Fig. 37b). As amostras provenientes de *C. jacchus* no CRAS e de *C. penicillata* no CP-UnB serviram para garantir que os animais invasores puros coletados no estado do Rio de Janeiro fossem de fato representativos de suas espécies.

Figura 33 - Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro onde ocorreu o maior esforço de captura de animais de vida livre.



Figura 34 - Armadilhas na sede do PARNASO; B – Armadilhas montadas na região periurbana de Nogueira

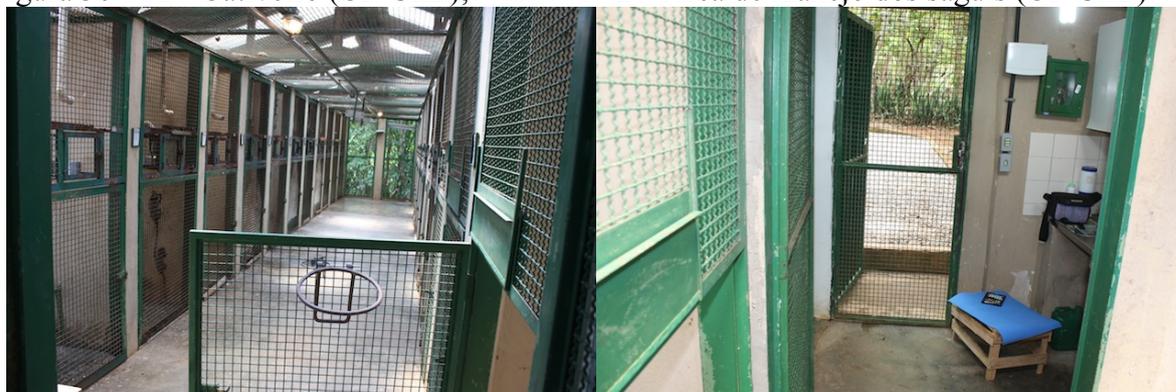


Fonte: O autor, 2015.

Figura 35 - *C. aurita* sendo fotografado no CPRJ



Figura 36 – A – Cativeiro (CP-UnB); B – Área de manejo dos sagüis (CP-UnB)



Fonte: O autor, 2015.

Figura 37 – Indivíduos de *Callithrix aurita* no Zoológico de Guarulhos (SP); B – Sagüis em fase de adaptação para soltura no Santuário dos Três Reinos em Recife (PE)



Fonte: O autor, 2015.

4.3.2 Forma de captura de animais de vida livre:

Os sagüis foram capturados em armadilhas do tipo Tomahawk que foram abertas em plataformas. As plataformas foram feitas com tubos de PVC e suspensas em árvores onde os sagüis tinham sido observados. O número de armadilhas utilizadas em cada plataforma era em número que se aproximasse ao dobro do tamanho estimado do grupo visado (Fig. 38). Essas armadilhas foram armadas abertas e travadas por um período de 15 a 60 dias para adaptação dos primatas. A partir do momento em que se verificou que os sagüis estavam visitando as armadilhas elas foram destravadas e monitoradas a fim de evitar ataques de outros animais ou qualquer eventualidade que pudesse trazer risco à integridade física dos sagüis capturados. A partir do momento que o grupo foi capturado, as armadilhas foram trazidas para o chão e cobertas com um pano, para diminuir o estresse dos animais.

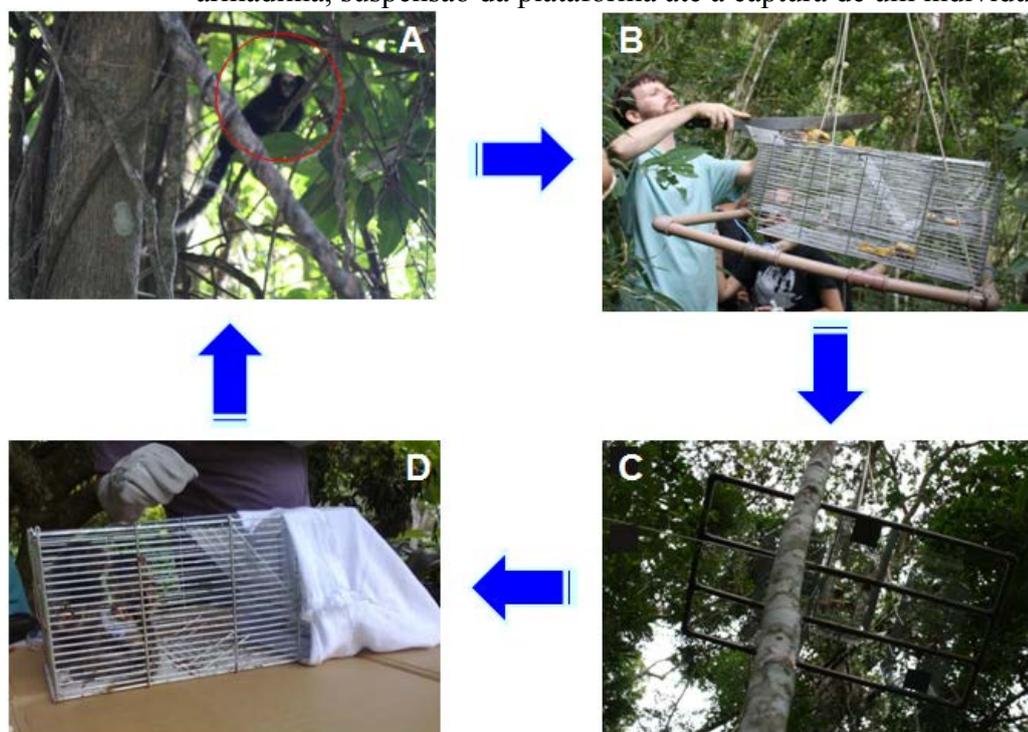
Figura 38 - Armadilhas com sagüis adaptados à ceva (Juiz de Fora – MG).



Fonte: O autor, 2015.

Dentro das armadilhas os sagüis foram levados para um local escolhido e arrumado previamente, dentro de ambientes edificados quando houve essa possibilidade, ou para campo aberto. Um a um os sagüis foram tirados de dentro das armadilhas para um saco de pano, pesados e contidos manualmente com luvas grossas de raspa de couro para a anestesia e posterior realização dos procedimentos para coleta de material biológico, dados biométricos e imagens fotográficas (Figura 39).

Figura 39 – Sequência de metodologia desde a observação do sagüi, preparação da armadilha, suspensão da plataforma até a captura de um indivíduo.



Fonte: O autor, 2015.

Seguindo a metodologia usada por Pereira (2006) os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina, na proporção de 10 mg/kg, por via intramuscular, com seringa de 1 mL e agulha 13x4. Durante o tempo em que os animais estavam anestesiados, foi feita a coleta de sangue por punção do plexo arteriovenoso inguinal, e algumas gotas foram despejadas sobre papel FTA. Os animais capturados foram também tatuados e marcados com colares para eventuais reconhecimentos futuros, em caso de recaptura e/ou para visualização à longa distância.

Cada indivíduo capturado foi fotografado por uma câmara digital de forma padronizada utilizando um padrão de cores conhecido como ColorChecker®. Todas as fotografias foram tiradas com uma câmara digital Canon Rebel XS, com um ajuste de pixels aproximado de 10,0 megapixels (Esta é uma câmara com elevada qualidade óptica e controle sobre medição e exposição). A lente utilizada foi a Canon Zoon EF-S 18 – 55 mm.

Todas as fotos deste estudo foram realizadas com a configuração de qualidade 'Raw + ▲ L', que têm uma taxa de compressão de 1: 4, criando duas imagens por disparo, uma imagem sem ajustes de cor (*Raw*), e outra em tipo de arquivo Joint Photographic Experts Group (JPEG). O *raw* é um negativo digital que contém todas as informações que foram captadas pela câmera e, portanto, qualquer tipo de alteração no arquivo pode ser revertido ao original, sem perdas. Além disso, as informações fornecidas e armazenadas pelos arquivos *raw* garantem uma maior fidelidade nas etapas de padronização, principalmente no que diz respeito à exposição, balanço de branco e temperatura de cor. Foram usadas configurações manuais de tempo de integração (velocidade do obturador) e abertura de lente.

Como, de forma geral, as fotos foram feitas sob diferentes situações externas (variação nas condições de luz), buscamos restringir ao máximo os elementos variáveis. A luz é fator determinante para definição e constituição dos níveis de cores das imagens, logo decidimos que as fotos teriam o “ISO” (“sensibilidade do filme”) de 100 ou 200, a abertura do diafragma entre 9 e 11 (para garantir maior profundidade de foco), a distância entre a câmera e objeto fotografado de aproximadamente 1 metro, a distância focal de 35mm, o balanço do branco definido como 'automático' e a luz de flash acionada. A velocidade do obturador foi o parâmetro escolhido para variar de forma mais livre de acordo com as variações locais.

Cada sagüi foi fotografado sobre uma folha de borracha EVA (Etil Vinil Acetato) de 40 cm x 60 cm de cor que contrastava (azul claro ou roxo) com a cor dos sagüis. Isso facilitou retirar a cor de fundo quando necessário. Foram feitas fotos do animal inteiro deitado lateralmente com o padrão de cor colocado próximo ao corpo de cada sagüi (Figura 40).

Figura 40 - Sagüi anestesiado sobre folha de EVA junto ao padrão de cor e com uma régua para servir de escala, pronto para ser fotografado.



Fonte: O autor, 2015.

Ao terminar os procedimentos, os animais foram postos de volta nas armadilhas, onde se esperou a recuperação do anestésico. Posteriormente, os animais foram levados aos mesmos locais onde haviam sido capturados para serem libertos ou devolvidos para seus alojamentos.

Como padrão de cor, utilizamos um esquema de disposição de cores GretagMacbeth ColorChecker (®xrite). A cartela de cores ColorChecker é comumente usado para fotografias de campo, para calibração de cores e para avaliar a precisão de cor de um dispositivo de imagem. A cartela de cores ColorChecker consiste de uma matriz de 24 quadrados coloridos formulados para representar cores comuns e naturais, com cores primárias além de uma escala de cinzas (Figura 41).

Figura 41 – A) Paleta de cores ColorCheker; B) Nas primeiras colunas temos o número, o nome e a cor, bem como os valores de R, G e B padronizados.



A

No.	Number	sRGB			CIE L*a*b*			Munsell Notation	
		R	G	B	L*	a*	b*	Hue Value / Chroma	
1.	dark skin	115	82	68	37.986	13.555	14.059	3 YR	3.7 / 3.2
2.	light skin	194	150	130	65.711	18.13	17.81	2.2 YR	6.47 / 4.1
3.	blue sky	98	122	157	49.927	-4.88	-21.925	4.3 PB	4.95 / 5.5
4.	foliage	87	108	67	43.139	-13.095	21.905	6.7 GY	4.2 / 4.1
5.	blue flower	133	128	177	55.112	8.844	-25.399	9.7 PB	5.47 / 6.7
6.	bluish green	103	189	170	70.719	-33.397	-0.199	2.5 BG	7 / 6
7.	orange	214	126	44	62.661	36.067	57.096	5 YR	6 / 11
8.	purplish blue	80	91	166	40.02	10.41	-45.964	7.5 PB	4 / 10.7
9.	moderate red	193	90	99	51.124	48.239	16.248	2.5 R	5 / 10
10.	purple	94	60	108	30.325	22.976	-21.587	5 P	3 / 7
11.	yellow green	157	188	64	72.532	-23.709	57.255	5 GY	7.1 / 9.1
12.	orange yellow	224	163	46	71.941	19.363	67.857	10 YR	7 / 10.5
13.	blue	56	61	150	28.778	14.179	-50.297	7.5 PB	2.9 / 12.7
14.	green	70	148	73	55.261	-38.342	31.37	0.25 G	5.4 / 8.65
15.	red	175	54	60	42.101	53.378	28.19	5 R	4 / 12
16.	yellow	231	199	31	81.733	4.039	79.819	5 Y	8 / 11.1
17.	magenta	187	86	149	51.935	49.986	-14.574	2.5 RP	5 / 12
18.	cyan	8	133	161	51.038	-28.631	-28.638	5 B	5 / 8
19.	white (.05*)	243	243	242	96.539	-0.425	1.186	N	9.5 /
20.	neutral 8 (.23*)	200	200	200	81.257	-0.638	-0.335	N	8 /
21.	neutral 6.5 (.44*)	160	160	160	66.766	-0.734	-0.504	N	6.5 /
22.	neutral 5 (.70*)	122	122	121	50.867	-0.153	-0.27	N	5 /
23.	neutral 3.5 (.1.05*)	85	85	85	35.656	-0.421	-1.231	N	3.5 /
24.	black (1.50*)	52	52	52	20.461	-0.079	-0.973	N	2 /

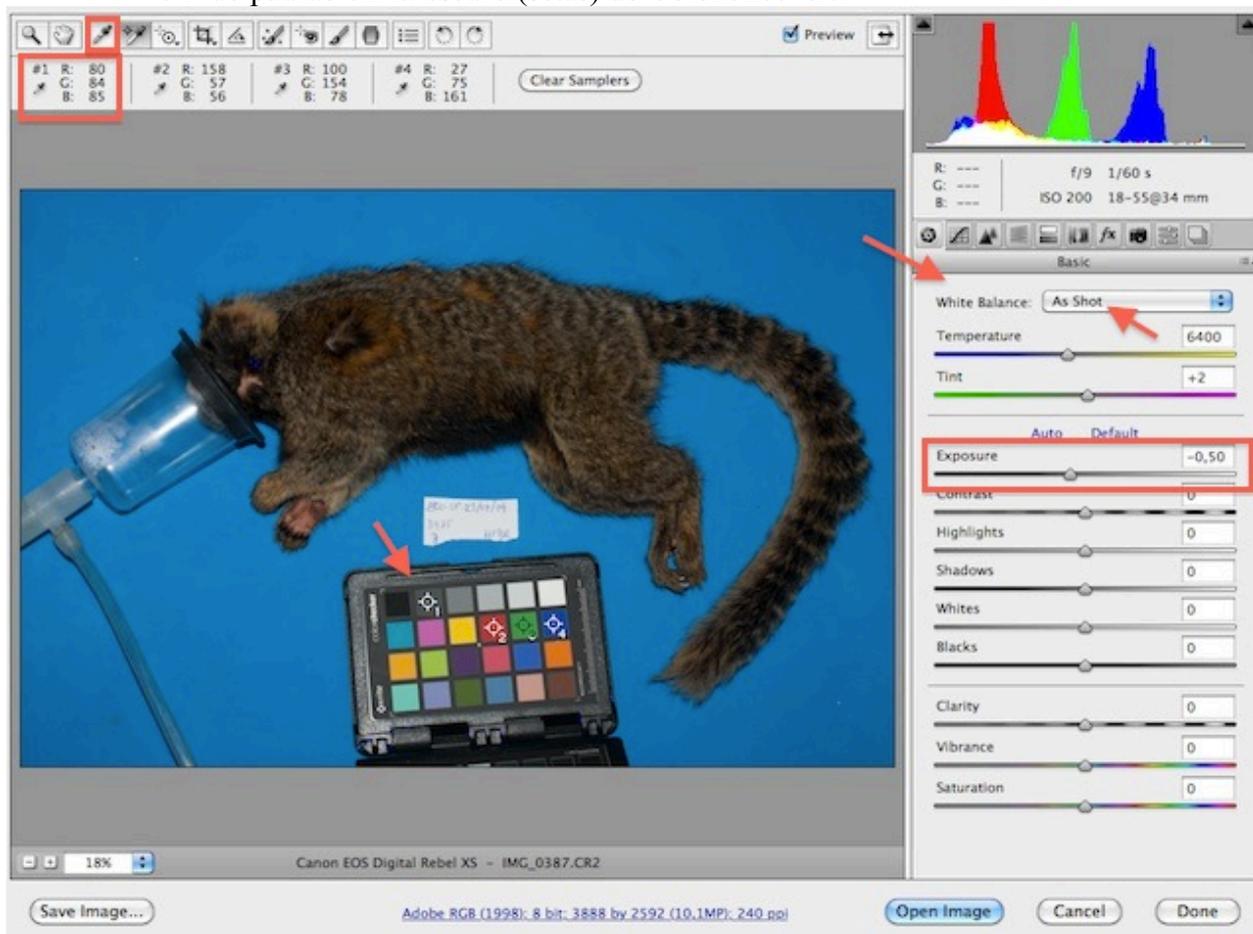
B

4.3.3 Análise colorimétrica das imagens fotográficas

O objetivo da análise colorimétrica das imagens fotográficas obtidas é atribuir valores de vermelho, verde e azul (R, G e B, respectivamente) para cada imagem. Para isso, as fotografias obtidas e salvas em arquivo *Raw* foram analisadas utilizando-se o software Photoshop CS6[©]. As imagens digitais consistem numa matriz de fotocélulas microscópicas onde a cor é registrada como valores de brilho (na faixa de 0-255) de vermelho, verde e azul (RGB).

Em cada arquivo aberto com o Photoshop CS6[©] foi feita, inicialmente, a padronização de cores utilizando o ColorChecker presente na imagem. Ao abrir a imagem no Photoshop, a primeira coisa que acontece é uma “pré-abertura” da foto para ajustes prévios onde é oferecido ao usuário a ferramenta de balanço de branco (entre outras). Esta ferramenta selecionada e “clificada” sobre um dos 24 quadrados de cores do ColorChecker causa uma redefinição dos valores de cores da imagem de acordo com a cor do quadrado escolhida. Para as fotos deste trabalho usamos a ferramenta *Balanço de Branco* sobre a cor cinza escuro “Neutral 3.5” (primeira depois do preto), que possui valores de referência de R, G e B padronizados em 85, 85, 85 (Figura 42). Uma vez a ferramenta de balanço de branco pressionada sobre o cinza, os valores de R, G e B são igualados em um mesmo valor. Isso é feito, porque comumente os valores de R, G e B são diferentes entre si, pois são produzidos originariamente pela máquina fotográfica de acordo com sua “interpretação” da iluminação local. Ainda neste momento, antes da foto ser de fato aberta, foi feito o ajuste na opção “exposição” para ajustar (para cada foto) os valores já igualados entre si para o padrão 85, 85, 85, pois a ferramenta de balanço de branco iguala os números mas não nos mesmos valores de referência do ColorChecker, e é no ajuste da exposição que colocamos esses valores equivalentes ao padrão. Só então é marcada a opção de “abrir” a foto. Desta forma todas as fotos têm seus quadrados cinza escuro homogeneizados com valores de R = 85, G = 85 e B = 85 (Figura 42).

Figura 40 - Imagem do programa Photoshop aberto na foto antes de igualar os valores de R, G e B do padrão cinza-escuro (setas) do ColorChecker.

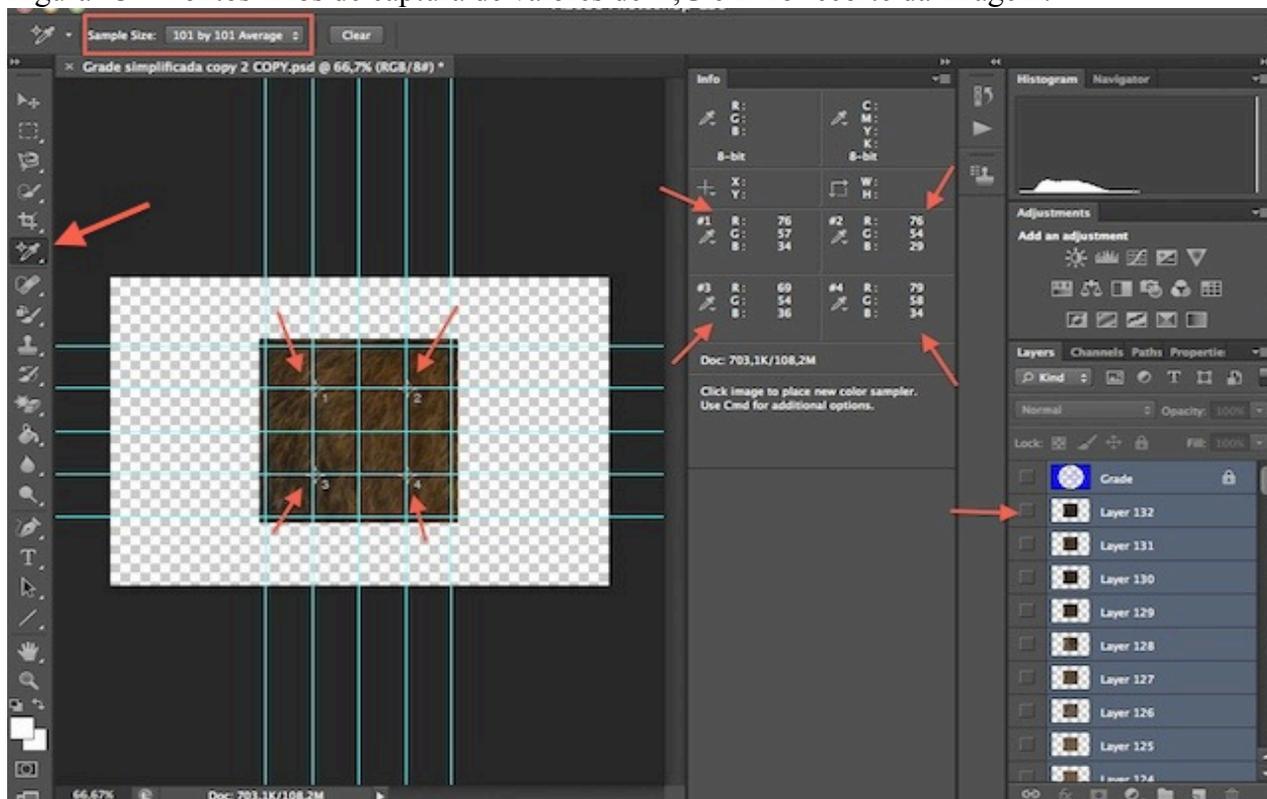


Fonte: O autor, 2015.

Para podermos comparar os valores de R, G e B entre todas as fotos foi necessário definir uma mesma área de amostragem de cada animal. Como os sagüis foram fotografados todos na mesma posição, optamos pela região da pata traseira do animal, especificamente a área da lateral externa do joelho (entre a ponta frontal e a dobra anterior), que se apresentou de maneira mais homogênea em todas as imagens. A área escolhida foi então selecionada com a ferramenta de “Marcação Retangular” recortada da imagem em forma de quadrado de lados com 2,40cm (aproximadamente o valor real anatomicamente) e colada sobre uma grade circunscrita em uma imagem neutra previamente confeccionada, no próprio software de análise. Essa grade foi composta por 5 linhas horizontais cruzadas por 5 linhas verticais, formando uma moldura com 25 pontos de cruzamento equidistantes sobre o recorte da imagem do sagüi. Assim, formou-se um ponto central com oito vértices em seu entorno

compondo um quadrado interno, e 16 periféricos formando o quadrado maior (Figura 43).

Figura 43 – Pontos fixos de captura de valores de R,G e B no recorte da imagem.



Fonte: O autor, 2015.

O *Photoshop CS6* oferece entre suas opções a “ferramenta classificadora de cores” cuja função é exatamente medir os valores de R, G e B (separadamente) da área onde a ferramenta é colocada, além disso, essa medida pode ser tirada de um único pixel ou como uma média (3x3, 5x5, 11x11, 31x31, 51x51 e 101x101 pixels). Essa ferramenta foi posta nos quatro vértices do quadrado interno e foram tiradas as medidas das maiores médias (101x101 pixels), o suficiente para cobrir quase completamente a área dos quatro quadrados pequenos circundantes de cada vértice. Esta amostragem das médias de 101x101 pixels ao redor dos quatro pontos internos e equidistantes proporcionou uma amostragem sem sobreposição da quase totalidade do recorte.

Para validar a padronização, que permite a comparação entre as imagens, e demonstrar a semelhança das cores do padrão entre as diversas fotos geradas, foi feito um teste comparando as cores do padrão ColorChecker que precisam ter valores

similares de RGB em todas as fotos para cada um de seus quadrados coloridos (APÊNDICE A). Foram selecionadas 44 fotos entre os três fenótipo mais os híbridos e retirados os valores R, G e B dos quadrados pequenos de cores vermelho, verde e azul do ColorChecker que aparece ao lado de cada sagüi fotografado. Esses valores foram avaliados descritivamente.

Cada sagüi teve, portanto, uma imagem da área do joelho (2,4x2,4cm) amostrada gerando quatro pontos amostrados e cada ponto subdividido em 3 cores (com um valor para cada) cada qual com suas médias de 101x101 pixels. Esses valores foram transpostos para uma planilha do programa Microsoft Office Excel e organizados em três colunas (R, G e B) com quatro médias para cada cor para cada indivíduo, de onde foi feita a média das médias e o desvio padrão das médias (erro padrão).

Uma nova planilha foi organizada com apenas um valor, portanto, para cada cor para cada sagüi. Ao lado desses valores também foram postas outras informações como a localização e data de coleta, o nome ou número identificador do sagüi, o gênero do animal, o fenótipo, informações genéticas e de parentesco, os parâmetros das fotos (abertura, velocidade, flash, balaço de branco e distância focal) e o número identificador de cada imagem.

Os dados das planilhas foram transpostos para os softwares SYSTAT 13.0 e MINITAB 16 onde foram feitas as análises estatísticas descritiva e paramétrica (análise de variância e regressão logística nominal).

Inicialmente, foram tratadas somente as espécies consideradas válidas, para que se pudesse consolidar visualmente e estatisticamente o que ocorre com os valores de R, G e B entre elas. Desta forma, tirando deste conjunto amostral as imagens feitas dos sagüis híbridos (19 no total), restaram 57 fotos para serem dispostas e analisadas.

Os híbridos foram definidos como tal por apresentarem um genótipo misto, ou por pertencerem ao um mesmo grupo de híbridos genotipados (para aqueles em que falhou a genotipagem), ou pela avaliação visual apenas (somente em dois casos).

Inicialmente, o grupo de híbridos não foi tratado considerando o tipo de hibridação e sim como um grupo único sem distinção das possíveis formas de hibridação, tanto por uma questão amostral, uma vez que não obtivemos um N suficientemente grande para constituição de grupos de híbridos comparáveis, quanto

pelo fato de lidarmos somente com híbridos de *aurita*, o que, *per se*, caracterizaria um agrupamento. Posteriormente, contudo, os grupos de híbridos foram separados em pequenos subgrupos de acordo com o tipo de hibridação, que não garante validade estatística mas apresenta resultados interessantes.

4.4 Resultados

Foram capturados e fotografados 112 sagüis nas diferentes localidades amostradas (TABELA 23) As amostras de cativeiro, em muitos casos, não tinham as localizações exatas do local de proveniência, apresentando referências menos precisas como uma cidade, predominantemente no estado de São Paulo.

Tabela 24 - Localidades onde houve amostragem de sagüis

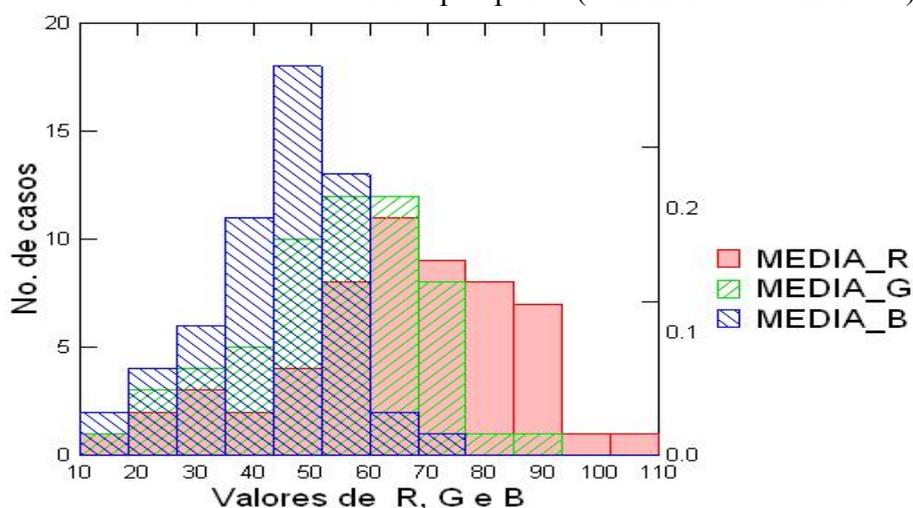
Estado	Município	Bairro	No.de Sagüis
Rio de Janeiro	Petrópolis	Bonfim	6
Rio de Janeiro	Petrópolis	Correias	5
Rio de Janeiro	Petrópolis	Nogueira1	5
Rio de Janeiro	Petrópolis	Nogueira2	11
Rio de Janeiro	Petrópolis	Mosela	7
Rio de Janeiro	Petrópolis	Caxambú	1
Rio de Janeiro	Teresópolis	Sede Parnaso-	3
Minas Gerais	Juiz de Fora	Floresta	6
Rio de Janeiro	Guapimirim	CPRJ	16
Rio de Janeiro	Niterói	Zoológico	3
São Paulo	Guarulhos	Zoológico	9
Distrito Federal	Brasília	CPB	10
Pernambuco	Recife	CRAS	30
TOTAL			112

Dos 112 sagüis capturados, somente 76 fotos com qualidade aproveitável para análise estatística foram escolhidas para este estudo. Como uma pré-condição deste trabalho foi usar imagens feitas em campo, isso implicou em lidar com condições externas variáveis, como luminosidade, vento, inclinação e disposição do terreno, estado geral do animal (sujo, molhado, machucado), e efetivação da anestesia. Essas variáveis resultaram em algumas fotos inutilizáveis e outras com pequenas diferenças entre si, mas que puderam ser comparadas entre si. Justamente por essa razão adotamos o uso do ColorCheker, para garantir a formação de um conjunto de fotos comparáveis depois de padronizadas.

4.4.1 Resultados sem os híbridos

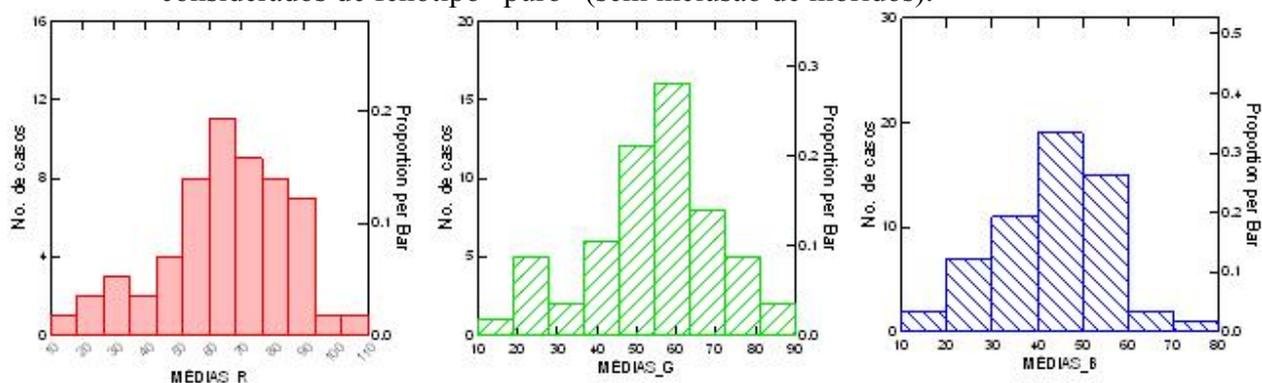
A distribuição dos valores de R, G e B observados em indivíduos puros de *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* se comportaram normalmente. (Fig. 44).. O vermelho obteve valores maiores que o verde e que o azul. Como o valor máximo para cada cor é de 255 e como os picos se dão entre 55 e 85, percebe-se que as amostras tiveram uma mistura dos três valores (R, G e B) intermediária com um equilíbrio deslocado positivamente para o vermelho.

Figura 44 – Distribuição dos valores de médias de R, G e B de todos os indivíduos considerados de fenótipo “puro” (sem inclusão de híbridos).



Os histogramas de cada cor separadamente não apresentaram picos diferenciados entre os fenótipos, distribuindo-se normalmente (Teste de Shapiro-Wilk, $p > 0.15$ para as três cores) (Figura 45).

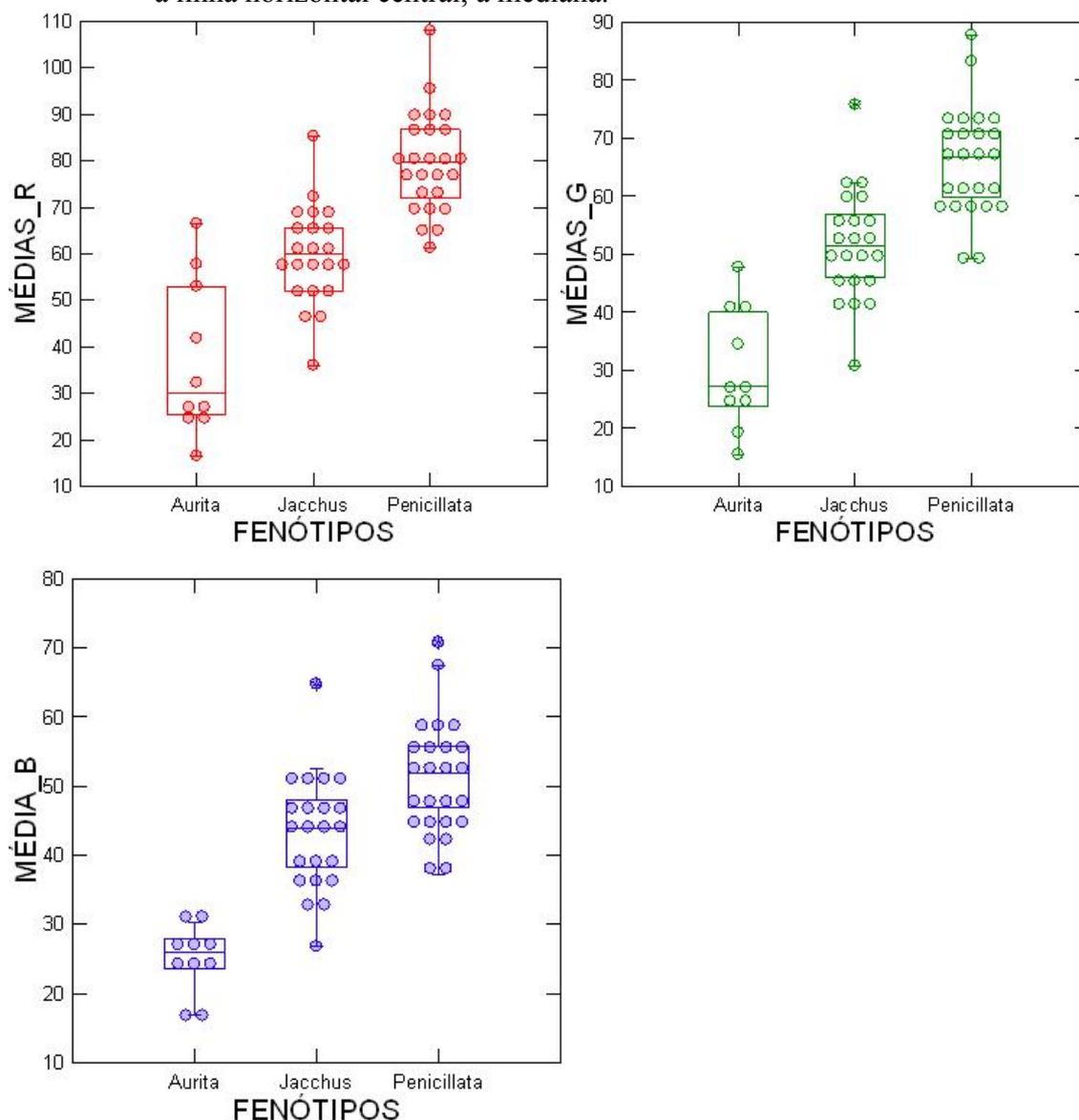
Figura 45 - Distribuição dos valores de médias de R, G e B de todos os indivíduos considerados de fenótipo “puro” (sem inclusão de híbridos).



As cores avaliadas separadamente resultaram em valores significativos para todos os casos (Cor R $F_{2,54}=52,249$; $p<0,0001$; Cor G $F_{2,54}=53,041$; $p<0,0001$; Cor B $F_{2,54}=43,174$; $p<0,0001$). E todas as espécies foram diferentes entre si para cada uma das cores (teste de Tukey *a posteriori*, $p<0,001$).

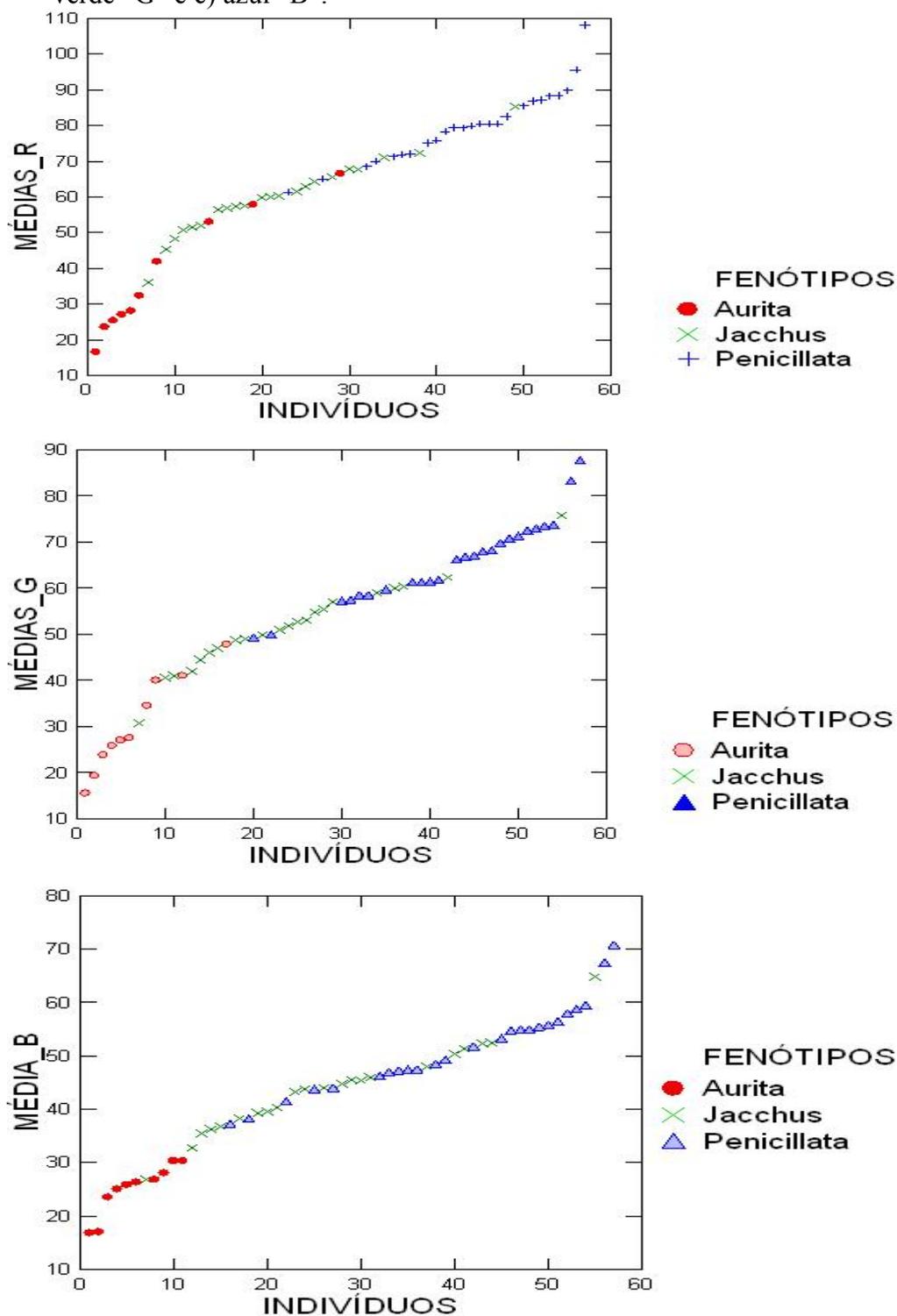
A disposição dos dados em diagrama de caixas demarca com maior definição a ocupação do espaço pela maioria dos pontos mostrando a separação das caixas com a maioria dos indivíduos e alguma sobreposição, mais marcante entre os fenótipos jacchus e penicillata para as médias de azul (Fig. 46).

Figura 46 - Diagramas de caixa mostrando a dispersão das médias das cores (R, G e B) para cada fenótipo das três espécies válidas. A caixa representa 50% das observações e a linha horizontal central, a mediana.



Os pontos referentes aos valores das médias de vermelho, verde e azul, alinhados em ordem crescente para todos os indivíduos das três espécies, deixam visível (Figura 47) a sequência iniciada com valores mais baixos da espécie *C. aurita* seguida com sobreposição pelo *C. jacchus* e este pelo *C. penicillata*.

Figura 47 - Disposição em ordem crescente dos valores das médias de a) vermelho “R”, b) verde “G” e c) azul “B”.



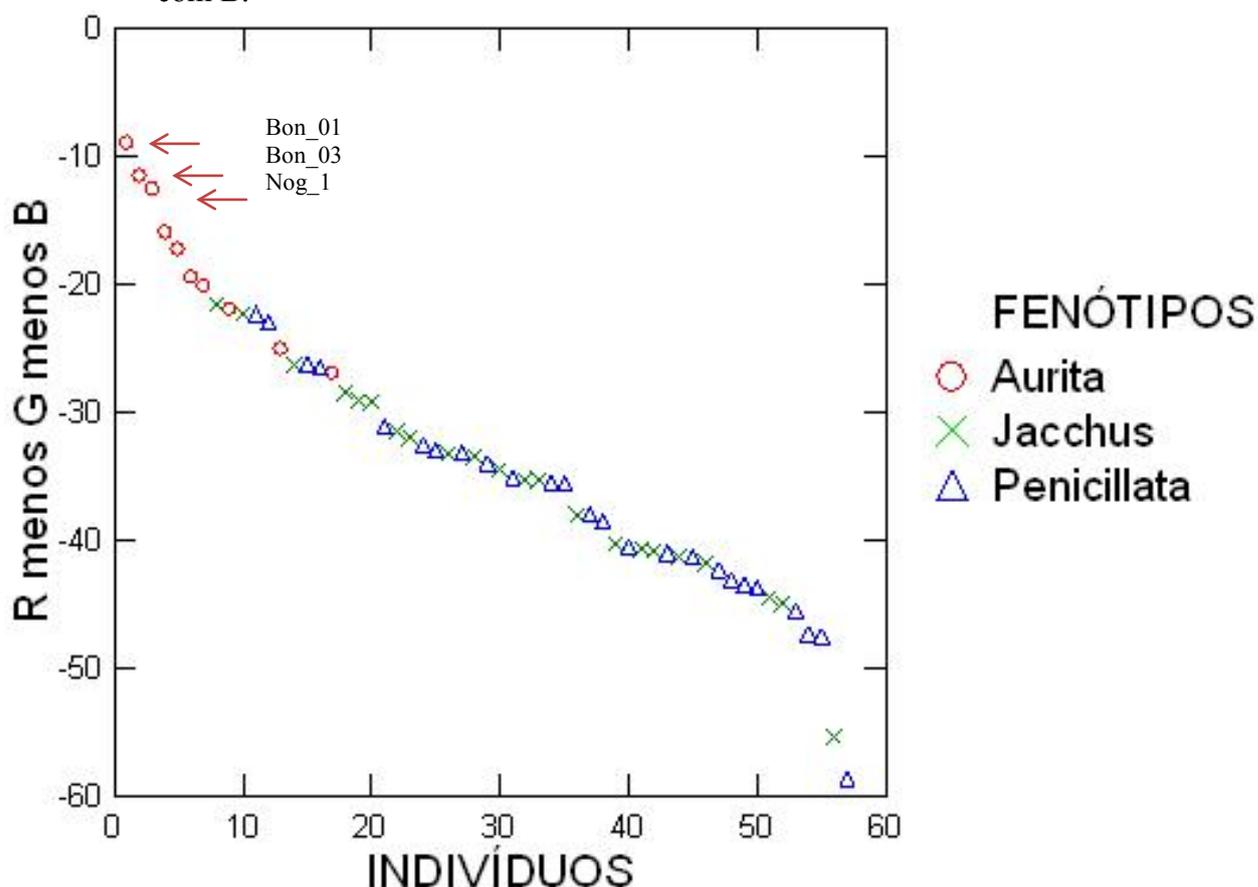
4.4.1.1 Operações com os dados

Outras análises foram geradas na tentativa de buscar situações em que as espécies apresentassem menor sobreposição de valores.

A operação de subtração, onde foi tirada dos valores das médias de vermelho a soma dos valores de verde com azul, isto é $R - (G+B)$, resultou em uma distribuição inversa do conjunto, em que os *C. aurita* ficaram com valores maiores que os demais (Figura 48). Essa nova distribuição não isolou o grupo dos *C. aurita*, mas colocou os mesmos indivíduos de *C. aurita*, que apareceram mesclados com *C. jacchus* e *penicillata* (para as médias de R) e com *C. jacchus* (para as médias de G), em uma posição inversa, isto é no início da distribuição, sendo portanto os mais distantes (e consequentemente identificáveis) dos demais indivíduos das outras duas espécies.

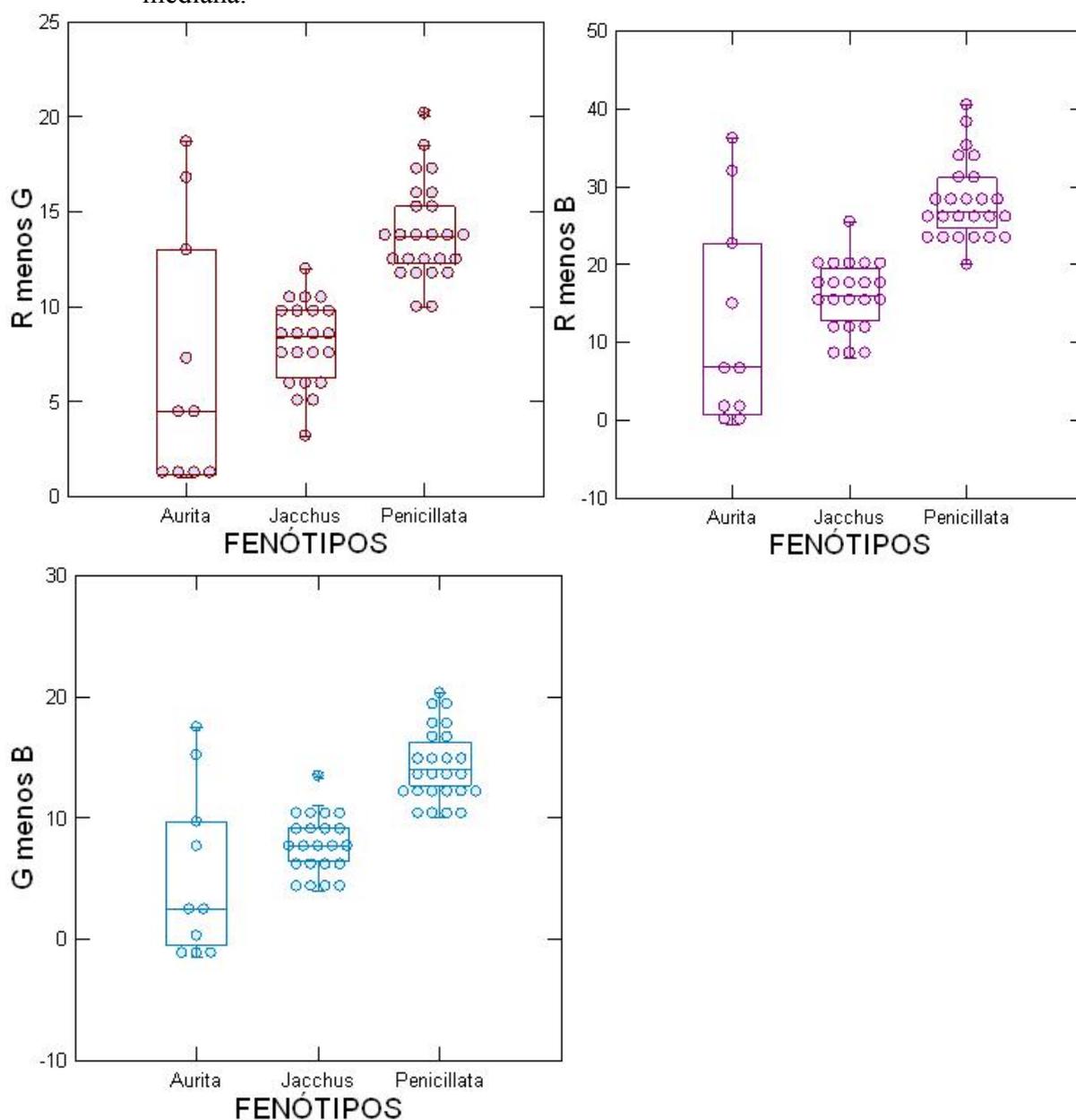
Os indivíduos *C. aurita* puros (Bon_01, Bon_03 e Nog_1) coletados dentro ou no entorno do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO) foram os que se distinguiram dos *C. aurita* provenientes de São Paulo com valores maiores (mais claros), em particular para R e G, e que, para essas cores, não seriam percebidos como de uma espécie (*aurita*) separada das espécies *C. jacchus* e *C. penicillata*. Para os valores de azul, entretanto, esses indivíduos (do PARNASO) conseguiram se agrupar aos seus companheiros de espécies, mas ainda fazendo fronteira em sucessão linear com os indivíduos *C. jacchus* (com valores mais baixos de azul), sendo que um *C. jacchus* se interpõe dentro da sequência de *C. aurita* (Figura 47). Quando usada a operação $R-(G+B)$ esses mesmos indivíduos “ambíguos” invertem suas posições e são os mais diferentes em relação aos *C. jacchus* e *C. penicillata*.(Figura 48).

Figura 48 - Disposição em ordem crescente dos valores das médias de R menos a soma de G com B.



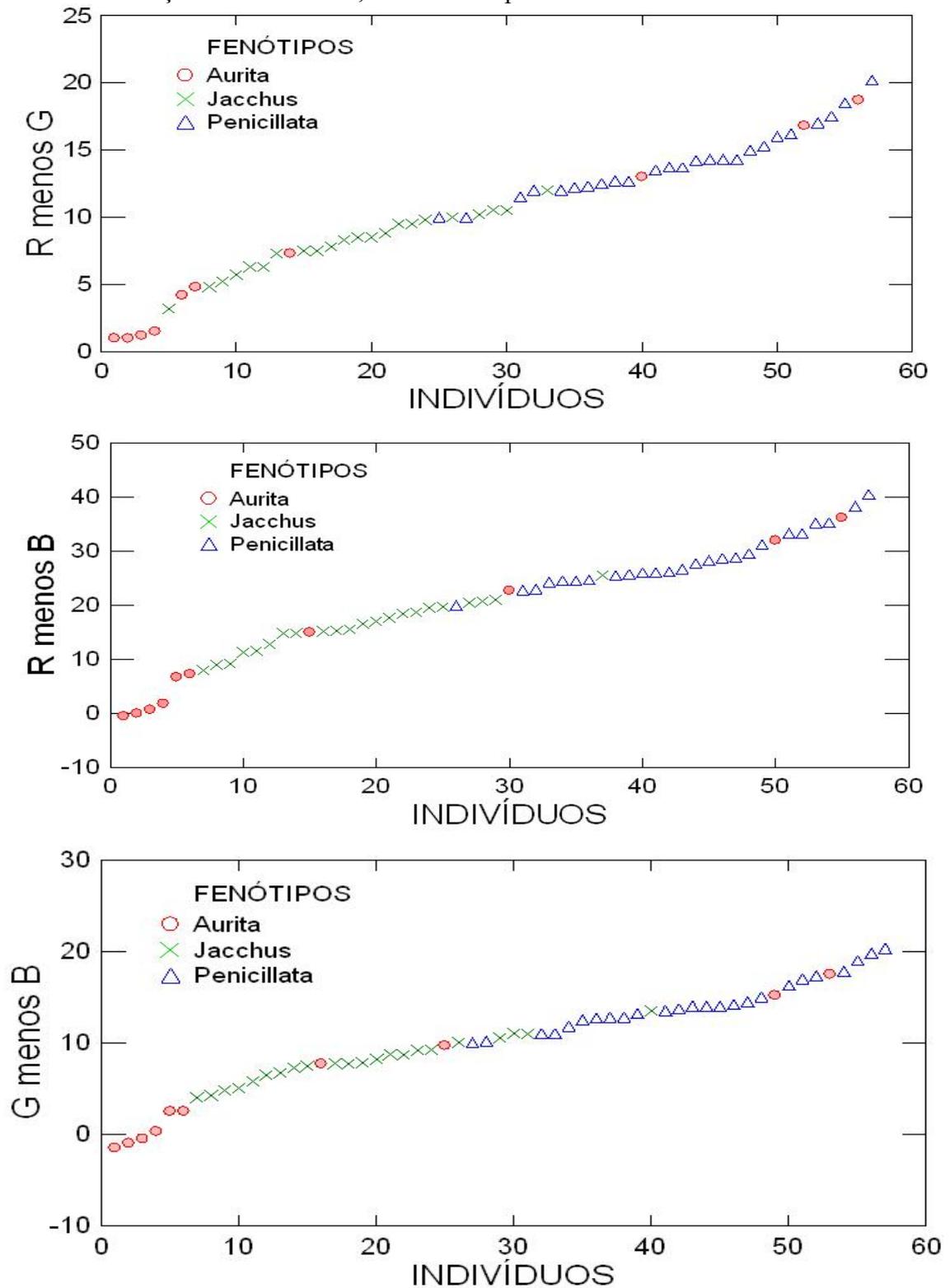
A operação matemática simples de subtração dos valores separados por duplas (R-G; R-B e G-B) (Figuras 49) foi significativo (R-G, $F_{2,54} = 23,180$, $p < 0,001$; R-B, $F_{2,54} = 26,548$, $p < 0,001$; G-B, $F_{2,54} = 28,179$, $p < 0,001$), porém não foi uma boa ferramenta para isolar o grupo aurita, pois ainda houve sobreposição. No entanto funcionou melhor que as médias isoladas, para a separação entre os grupos jacchus e penicillata (R-G, $p < 0,001$; R-B, $p < 0,001$ e G-B, $p < 0,001$). Nos diagramas de caixa (Figura 49), essas espécies aparecem ainda mais separadas entre si do que o que foi visto para as médias de R, G e B.

Figura 49 - Diagramas de caixa mostrando a dispersão dos valores da subtração entre as duplas feitas pelas três médias de cores para cada fenótipo das três espécies válidas. A caixa representa 50% das observações e a linha horizontal central, a mediana.



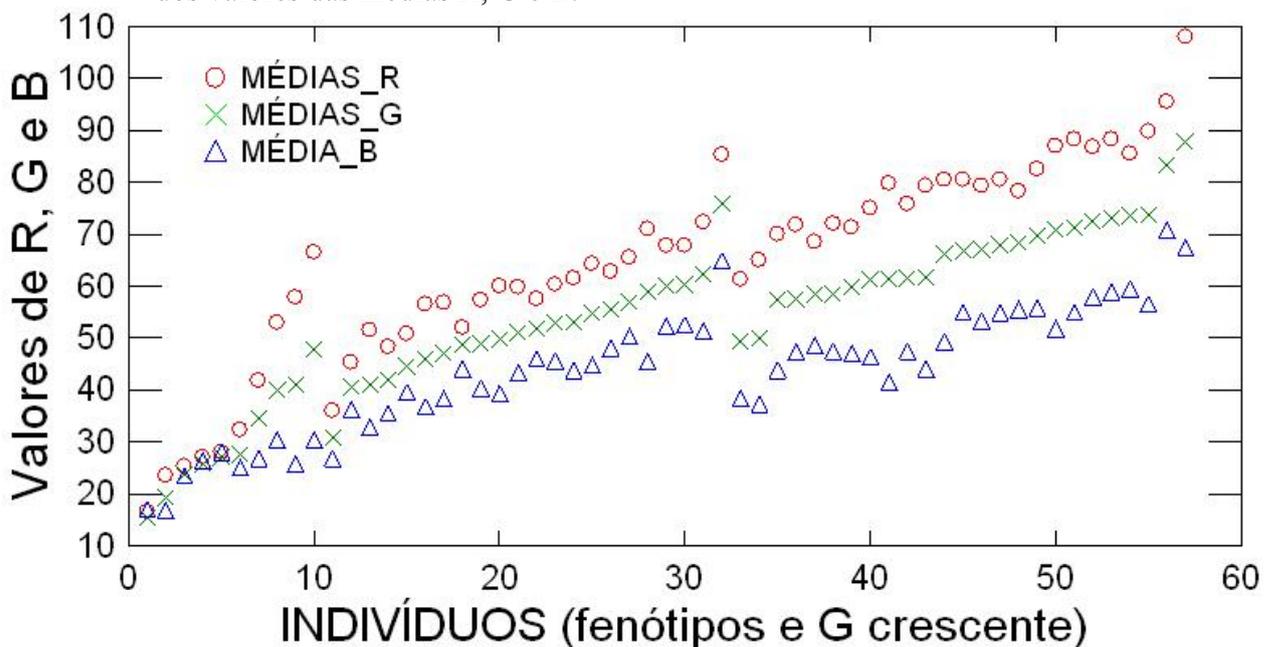
Nos gráficos de dispersão é possível visualizar a posição dos indivíduos de cada espécie distribuídos linearmente e nitidamente menos sobrepostos para as espécies *C. jacchus* e *C. penicillata*. A subtração R-B foi a que melhor separou estes dois grupos (Figura 50).

Figura 50 - Disposição em ordem crescente, diferenciados por espécies, dos valores das subtrações das médias R, G e B em duplas.



Observando a dispersão dos valores de RGB, as distâncias entre o R e o G (que é a cor intermediária) e entre esta e o B tem dois perfis mais homogêneos, um do grupo dos *C. jacchus* posicionados entre os valores 11 e 32 e outro entre os valores de 33 até 57, intervalo onde estão os *C. penicillata*, que fica claramente mais amplo que o anterior. Os *C. aurita* revelam, por outro lado, a heterogeneidade dessa relação interna de seu grupo, posicionados no início do gráfico entre os valores de 1 a 10 (Figura 51). Para os aurita, novamente, os indivíduos com pequena separação entre R, G e B são os provenientes de São Paulo e os últimos são os coletados em Petrópolis.

Figura 51 - Disposição em ordem crescente (da média G), mas agrupados por espécies (presumidas) (*C. aurita* 1 ao 10; *C. jacchus* 11 ao 32; e *C. penicillata* 33 ao 57), dos valores das médias R, G e B.



4.4.1.2 Modelo de regressão logística nominal.

Modelo com Média_B como variável dependente:

A operação de regressão logística nominal sobre os valores das médias de cada cor independentemente gerou modelo sendo que: A) De acordo com o primeiro conjunto de logits estimados (Logit1), temos os parâmetros estimados na mudança

dos logitos de *C. penicillata* em relação a *C. aurita*. O coeficiente Media_B (0,7137) é a variação estimada no logito com um aumento de 1 unidade na Media_B. O valor de $p=0,007$ para Media_B indica que uma mudança na Media_B afeta a escolha de *C. penicillata* em relação a *C. aurita*. O coeficiente positivo indica que a escolha de *C. penicillata* sobre *C. aurita* quando a Media_B aumenta. B) De acordo com o segundo conjunto de logitos estimados (Logit2), temos os parâmetros estimados na mudança dos logitos de *C. jacchus* em relação a *C. aurita*. O coeficiente Media_B (0,5815) é a variação estimada no logito com um aumento de 1 unidade na Media_B. O valor de $p=0,025$ para Media_B indica que uma mudança na Media_B afeta a escolha de *C. jacchus* em relação a *C. aurita*. O coeficiente positivo indica que a escolha de *C. jacchus* sobre *C. aurita* quando a Media_B aumenta.

Logistic Regression Table							
Predictor	Coef	SE Coef	Z	P	Odds Ratio	95% CI	
						Lower	Upper
Logit 1: (Pen/Aur)							
Constant	-24,0927	8,18466	-2,94	0,003			
Media_B	0,713711	0,263878	2,70	0,007	2,04	1,22	3,42
Logit 2: (Jac/Aur)							
Constant	-17,9537	7,85510	-2,29	0,022			
Media_B	0,581449	0,258898	2,25	0,025	1,79	1,08	2,97

Modelo:

$$\log\left(\frac{p_2}{p_1}\right) = -24,0927 + 0,713711 \times \text{Media}_B$$

$$\log\left(\frac{p_3}{p_1}\right) = -17,9537 + 0,581449 \times \text{Media}_B$$

onde

p_1 é a probabilidade do sagüi ser da espécie *C. aurita*

p_2 é a probabilidade do sagüi ser da espécie *C. penicillata*

p_3 é a probabilidade do sagüi ser da espécie *C. jacchus*

Foi calculada a probabilidade de cada sagüi pertencer a cada uma das três espécies, utilizando o modelo acima. O indivíduo foi caracterizado na espécie que

apresentou a maior probabilidade de ocorrência de acordo com a tabela de validação (Tabela 24):

Tabela 25 – Tabela de probabilidade de reconhecimento da espécie pela média de azul do recorte fotográfico de um determinado indivíduo.

Fenótipo	Modelo			Total
	<i>C. aurita</i>	<i>C. penicillata</i>	<i>C. jacchus</i>	
<i>C. aurita</i>	10	0	0	10
<i>C. penicillata</i>	0	19	6	25
<i>C. jacchus</i>	1	6	15	22
Total	11	21	25	57

Para distinguir a espécie *C. aurita* das demais espécies invasoras, este modelo, cuja variável dependente é Media_B, conseguiu distinguir todos os sagüis deste grupo corretamente.

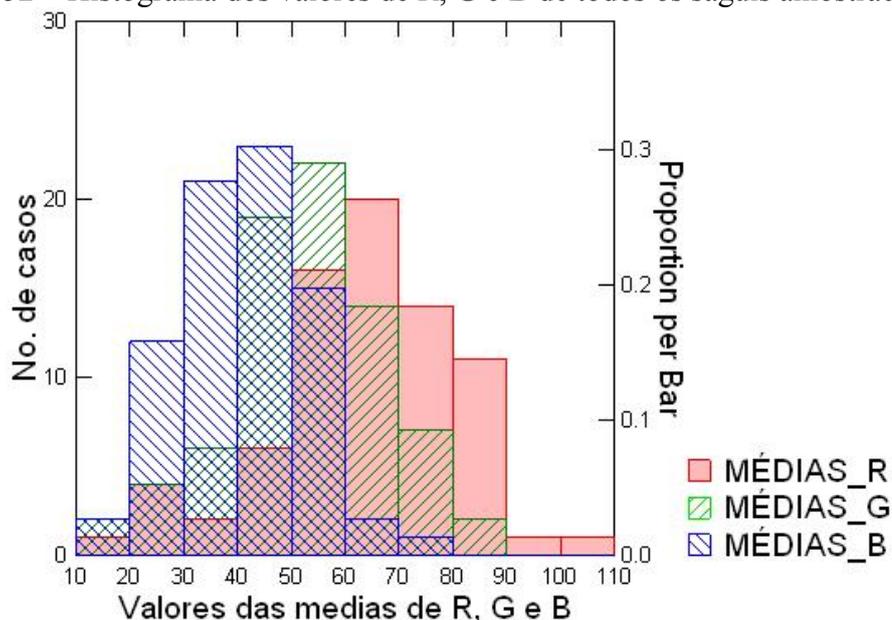
4.4.2 Resultados considerando os híbridos.

O total de imagens usadas para as análises que se seguem foram as 57 anteriores (das espécies consideradas puras) somadas às 19 imagens geradas com os híbridos, resultando em 76 imagens.

4.4.2.1 Análise das médias R, G e B

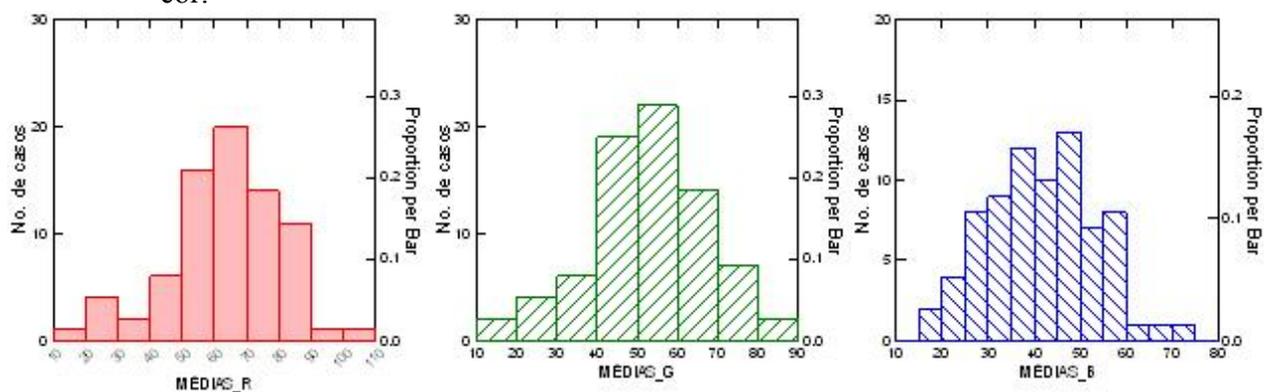
A distribuição dos valores de R, G e B observados para todos os indivíduos sem separação por espécies comportou-se normalmente (Figura 52).

Figura 52 – Histograma dos valores de R, G e B de todos os sagüis amostrados.



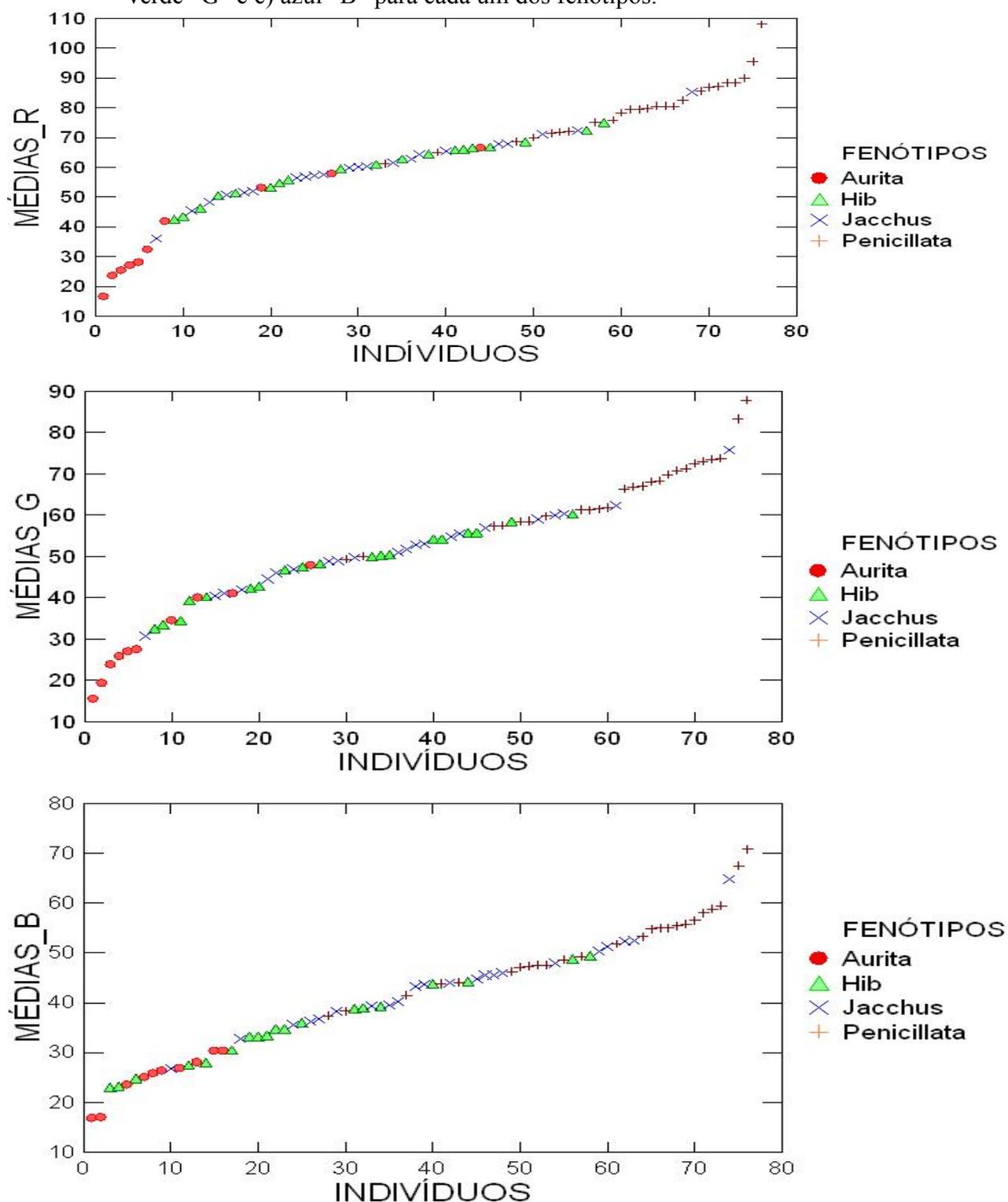
Os histogramas de cada cor separadamente não apresentaram picos diferenciados entre os fenótipos, distribuindo-se normalmente (Teste de Shapiro-Wilk, $p > 0.15$ para as três cores) (Figura 53).

Figura 53 – Histograma dos valores de R, G e B de todos os sagüis amostrados separados por cor.



Os gráficos de dispersão das médias de RGB evidencia a sobreposição dos híbridos com as espécies puras (Figura 54).

Figura 54 - Disposição em ordem crescente dos valores das médias de a) vermelho “R”, b) verde “G” e c) azul “B” para cada um dos fenótipos.

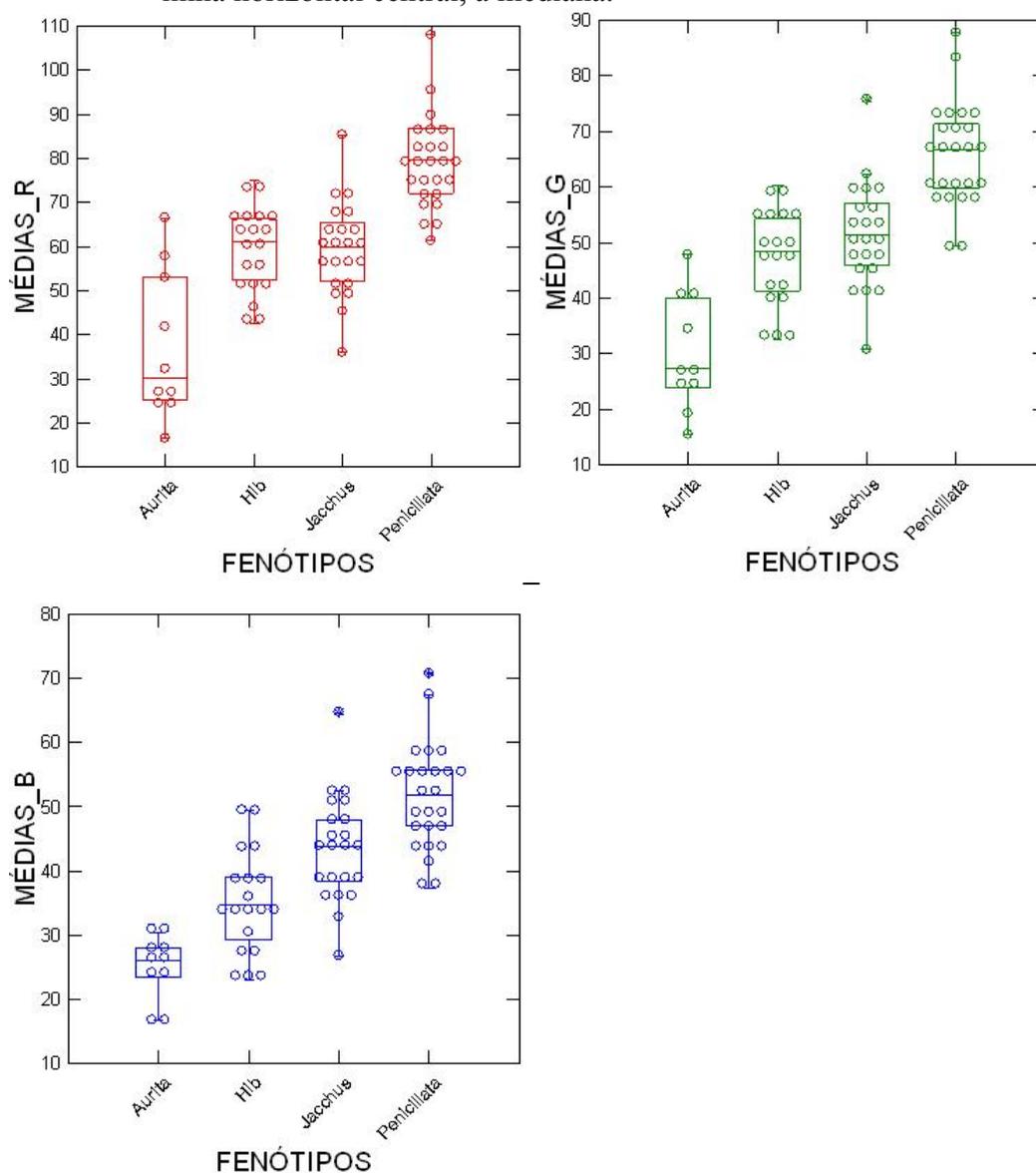


As cores avaliadas separadamente resultaram em valores significativos para todos os casos (Cor R $F_{2,54}=38,896$; $p<0,001$; Cor G $F_{2,54}=39,726$; $p<0,001$; Cor B $F_{2,54}=34,371$; $p<0,001$). Os fenótipos puros de cada espécie foram diferentes entre si

para cada uma das cores (teste de Tukey *a posteriori*, $p < 0,003$). Porém, para a cor vermelha e verde não houve diferenças significativas entre as médias dos híbrdos e *C. jacchus* ($p = 1,000$ e $p = 0,457$, respectivamente). A cor azul foi diferente, não apenas para os fenótipos puros, mas também entre os fenótipos puros com híbrdos (aurita-híbrido $p = 0,007$; jacchus-híbrido, $p = 0,004$; penicillata-híbrido, $p = 0,001$).

Os diagramas de caixa mostram os quatro conjuntos, três espécies mais os híbrdos, em uma posição intermediária entre as espécies para as cores R e G. As cor B, por outro lado, apresenta uma individualização para um padrão híbrdo (figura 55).

Figura 55 - Diagrama de caixa mostrando a dispersão das médias das cores para cada fenótipo das três espécies válidas e híbrdos. A caixa representa 50% das observações e a linha horizontal central, a mediana.



Resultados considerando híbridos separados por tipos

Dentre os 19 indivíduos híbridos, três não tiveram seus genótipos definidos, cinco foram identificados como híbridos de aurita com *C. jacchus*, sete como híbridos de aurita com penicillata e quatro foram identificados como híbridos de aurita com kuhlii. Os resultados da ANOVA para cada cor resultaram em valores significativos (Cor R $F_{5,67}=23,196$; $p<0,001$; Cor G, $F_{6,69}=21,258$; $p<0,001$; Cor B $F_{6,69}=18,344$; $p<0,001$). Os fenótipos puros de cada espécie foram diferentes entre si para cada uma das cores, porém, alguns híbridos não diferiram dos fenótipos puros (Fig. 56) (Tabela 25).

Figura 56 - Diagrama de caixa mostrando a dispersão das médias das cores para cada fenótipo das três espécies válidas e da combinação de híbridos. A caixa representa 50% das observações e a linha horizontal central, a mediana.

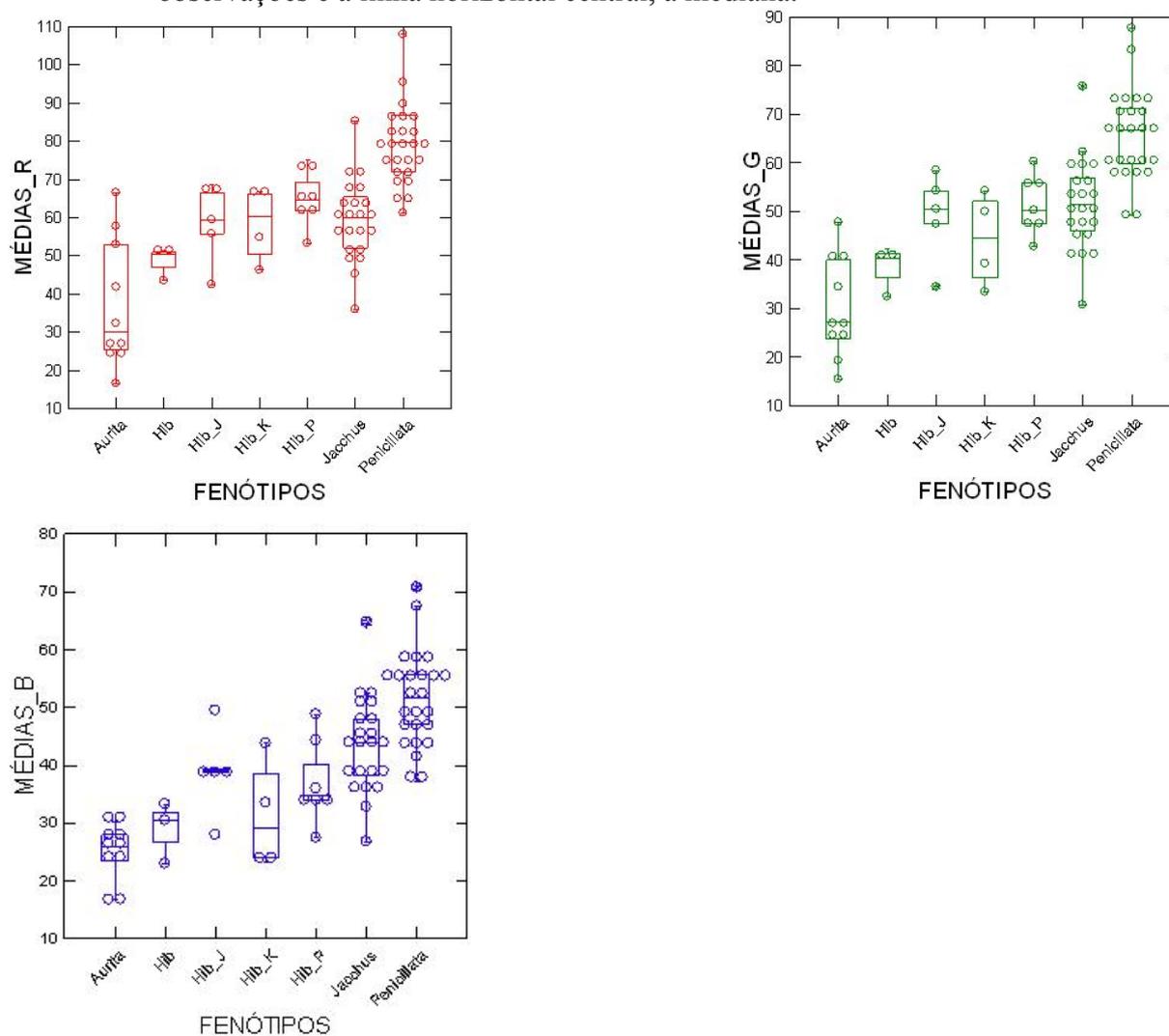
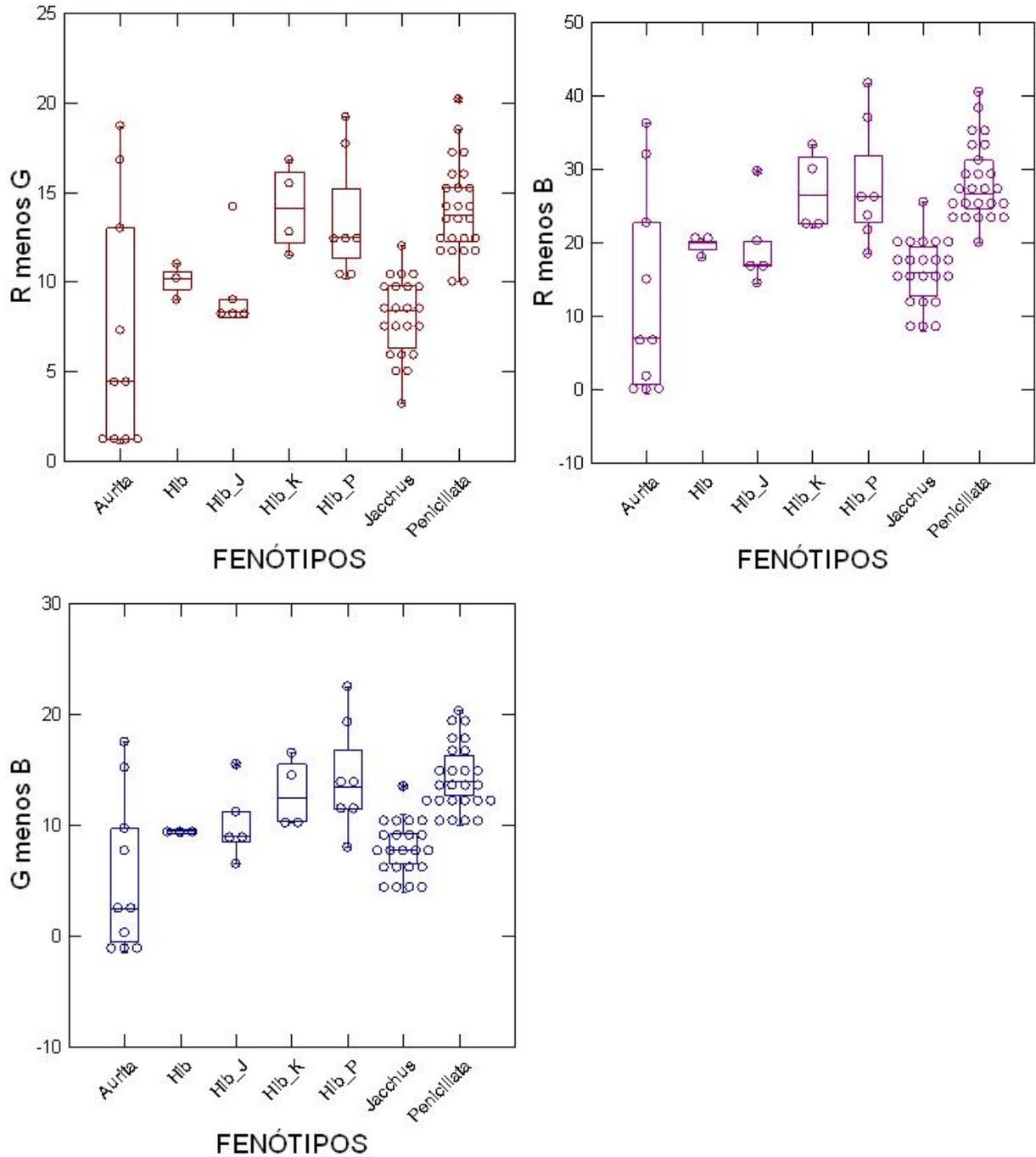


Tabela 26 - Níveis de significância (p) do Teste de Tukey para cada par de fenótipo dentro de cada cor (R, G e B).

Fenótipo (i)	Fenótipo (j)	p (R)	p (G)	p (B)
Aurita	Hib_J	0.012	0.005	0.023
Aurita	Hib_K	0.026	0.135	0.796
Aurita	Hib_P	0.000	0.000	0.032
Aurita	Jacchus	0.000	0.000	0.000
Aurita	Penicillata	0.000	0.000	0.000
Hib_J	Hib_K	1.000	0.985	0.758
Hib_J	Hib_P	0.951	0.999	1.000
Hib_J	Jacchus	1.000	0.998	0.885
Hib_J	Penicillata	0.003	0.005	0.019
Hib_K	Hib_P	0.961	0.866	0.894
Hib_K	Jacchus	1.000	0.764	0.066
Hib_K	Penicillata	0.009	0.001	0.000
Hib_P	Jacchus	0.912	1.000	0.457
Hib_P	Penicillata	0.033	0.006	0.001
Jacchus	Penicillata	0.000	0.000	0.010

As diferenças entre as médias da subtração dos valores de RGB umas pelas outras (R- G, R-B e G-B), são significativas (R-G, $F_{6,69}=10,002$; $p<0,001$; R-B, $F_{6,69}=10,714$; $p<0,001$; G-B, $F_{6,69}=10,783$; $p<0,001$), apesar do aumento da amplitude que estes valores mostram para os *C. aurita* e o novo posicionamento das subdivisões dos híbridos. Os híbridos de *C. jacchus* tenderam a se alinhar com os *C. jacchus* puros, e os híbridos de *C. penicillata* tenderam a se alinhar com os *C. penicillata* puros (Figura 57).

Figura 57 - Diagrama de caixa mostrando a dispersão dos valores da subtração entre as duplas feitas pelas três médias de cores para cada fenótipo das três espécies válidas e seus híbridos. A caixa representa 50% das observações e a linha horizontal central, a mediana.



4.5 Discussão

4.5.1 Validação

O uso de *softwares (plug-in)* como o usado por Bergman e Beehner (2008) garante uma padronização das fotografias com maior rapidez, mas é mais custoso financeiramente. O processo manual de padronização é trabalhoso e demanda uma verificação da sua eficiência comparando os quadrados de cores do ColorChecker de cada foto e verificando a variação. Os valores das médias de R, G e B de cada quadrado (quadrado vermelho, quadrado verde e quadrado azul) do ColorCheker não podem ter uma variação muito grande, pois isso significaria que o padrão não está igual em todas as fotos, isto é, não serve como padrão impedindo que os valores de R, G e B, que compõem a amostra dos pêlos de cada sagüi fotografado, sejam comparáveis.

Embora haja uma pequena variação nas linhas do gráfico (apêndice A) elas não representam uma impossibilidade de comparação. Além disso, essa pequena variação ainda é minimizada na comparação da média gerada por vários indivíduos agrupados dentro de um mesmo fenótipo, isto é, uma foto de um aurita com valores um pouco menores é compensada por outra com valores um pouco maiores na composição das médias

4.5.2 Sem híbridos

Como os histogramas foram gerados sem a categorização por espécies, isto é, tendo a população amostral sido tratada como única, seria desejável, para confirmar a diferenciação colorimétrica das três espécies, que houvesse também três concentrações (picos) de valores distinguíveis entre si em cada distribuição de cor (seleção disruptiva), à semelhança da separação vista entre valores de R, G e B no histograma anterior. Isso não acontece, contudo, pode-se notar, nas cores vermelho e verde, que ocorre uma elevação inicial da curva antes da parábola maior, resultado

do predomínio de um padrão escurecido (próximo ao preto) de algumas amostras provenientes dos sagüis coletados em São Paulo, da espécie *C. aurita*. Esta espécie teve a maior variação intraespecífica das médias individuais

A distribuição dos pontos das médias das três espécies determinadas como puras, vista no gráfico de caixas já antecipa a separação das três espécies pelas medidas colorimétricas de suas médias de R, G e B, pois percebe-se a separação do valor das médias destes pontos. Por outro lado estes gráficos também mostram que esta separação não é plena como seria desejável para que se evitasse erros individuais com maior segurança, pois existe sobreposição de pontos.

A disposição dos indivíduos ordenados em ordem crescente pelo valor das médias de R revela de maneira peculiar essa disposição sobreposta de alguns indivíduos, que podem ser vistos longe de seus “nichos”, como alguns *C. aurita* mesclados com *C. jacchus* e um *C. jacchus* bem isolado de seu grupo e posicionado para além da metade do grupo de *C. penicillata* (esses valores foram refeitos e confirmados).

Em relação aos indivíduos de fenótipo aurita, ficou evidente durante a amostragem, que havia uma plasticidade marcante separando indivíduos provenientes do estado de São Paulo com um padrão mais escuro, próximo do preto, dos *C. aurita* de vida livre amostrados no estado do Rio de Janeiro, que são mais claros (com valores colorimétricos mais altos), e que é vista na disposição dos pontos das médias de vermelho e de verde desta espécie

A distribuição em ordem crescente dos valores de azul (Médias_B) da espécie aurita, vista na figura 47 teve, por outro lado, uma dispersão mais restrita que a das cores verde e vermelho, mostrando-se agrupada de forma bastante coesa, sendo a melhor das três distribuições para distinguir esta espécie, uma vez que agrupou aqueles indivíduos que se mostraram sobrepostos com as outras duas espécies para as médias R e G. Inversamente, a distribuição do azul dos *C. penicillata* se espalha mais do que as anteriores chegando a valores menores do que 40, demonstrando maior sobreposição com *C. jacchus*

Dados genéticos garantem que os *C. aurita* analisados são descendentes de indivíduos da mesma espécie por linhagem materna (marcador molecular mitocondrial – COI) e paterna (marcador molecular do cromossoma Y – SRY), mas não garantem que não tenha havido miscigenação prévia em outros cromossomos.

Uma segurança como essa precisaria de análises com outros marcadores moleculares. Isso significa que, embora pouco provável se considerado o histórico da espécie, a plasticidade colorimétrica encontrada nestes indivíduos tratados como *C. aurita* puros pode também ser derivada de introgressões não identificáveis por marcadores de linhagens materna e paterna.

O caso do indivíduo *C. jacchus* mais isolado de seu grupo e com valores de vermelho e verde, que o colocam agrupado com os *C. penicillata*, não têm uma explicação semelhante à dos *C. aurita*. Esse indivíduo é proveniente de Recife – PE assim como a maioria dos demais de seu grupo, tendo sido o único a apresentar tal padrão discrepante. Como esse indivíduo não esteve disponível para outras avaliações, dificilmente será elucidada a questão, contudo, o reexame das demais imagens deste sagüi (não publicadas) sugere a possibilidade de que tal discrepância possa ser relacionada à sua aparência mais idosa (pelos mais claros geram valores colorimétrico mais elevados).

A análise de variância (ANOVA) das médias de R, G e B, separadamente, definiu estatisticamente o que era vislumbrado nos gráficos descritivos, e o teste de Tukey (*post hoc*) valida a separação das espécies entre todos os três pares possíveis. Não deve ser confundido, entretanto, a separação entre as espécies pela análise das variâncias, que isola cada categoria bem apartada umas das outras, com a distribuição das médias, onde se percebe a sobreposição de casos entre espécies distintas.

Essa sobreposição dos valores das médias entre as espécies indica a necessidade de se estabelecer uma faixa de probabilidade de pertencimento de indivíduos em uma determinada categoria (espécie), ou que se encontre uma nova composição de fatores capazes de assegurar uma classificação correta com baixa taxa de erro.

Pode ser visto no gráfico (Figura), onde aparecem todas as médias alinhadas em ordem crescente, mas agrupadas por espécie, que existe outro fator de diferenciação entre os conjuntos de indivíduos. Na verdade, esse fator de separação é mais evidente entre as espécies *C. jacchus* e *C. penicillata* que apresentam um padrão de espaçamento entre as médias das três cores (verticalmente portanto) diferente entre si, sendo que essas distâncias são menores entre grupo de indivíduos *C. penicillata* e maiores para o grupo de *C. jacchus*. Desafortunadamente a plasticidade

do grupo de *C. aurita* não permitiu uma padronização deste grupo para essa medida. O maior e, portanto, mais significativo espaçamento é traduzido matematicamente pela subtração entre o maior valor (R) e o menor valor (G): $R-G$ e estabelece uma diferenciação destas duas espécies com poucas sobreposições. Embora a distinção entre as espécies *C. jacchus* e *C. penicillata* não seja em si o foco deste trabalho, e de que estas espécies sejam bem reconhecidas pelas suas diferenças na coloração e disposição dos tufos auriculares, a separação colorimétrica encontrada neste estudo ressalta uma diferenciação categórica destas espécies através da coloração corporal somando, em termos científicos, essa diferença morfológica às demais que caracterizam as espécies.

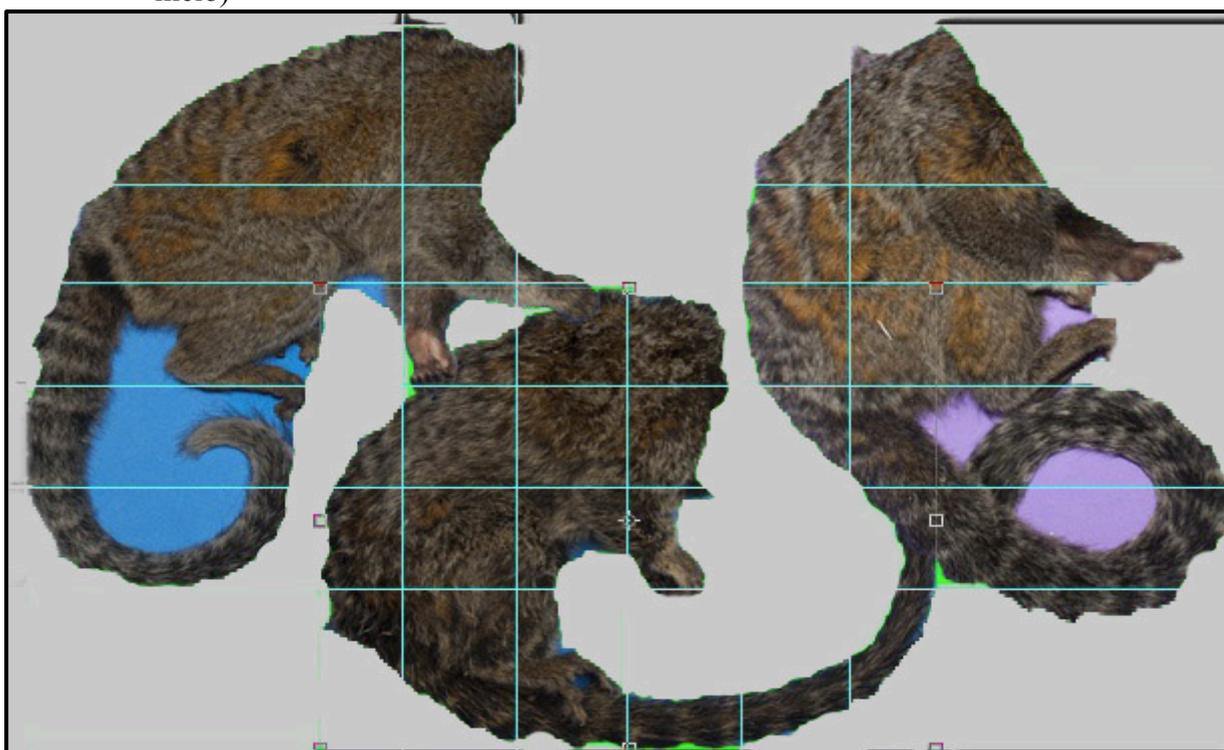
A diferenciação dos *C. aurita* das outras duas espécies não é de difícil percepção, os *C. aurita* contrastam tanto pelo padrão de coloração do corpo mais escuro e avermelhado quanto pela ausência de listras (exceto na cauda), fazendo que seu corpo, entre o preto e o preto mesclado de ruivo, se diferencie do padrão acinzentado e listrado encontrado em ambos *C. jacchus* e *C. penicillata*. Surpreende, contudo, que estas espécies mais semelhantes entre si tenham sido distintamente diferenciadas pela ANOVA e pelo teste de Tukey. A ferramenta estatística, portanto, é capaz de separar *C. jacchus* de *C. penicillata* pelos seus padrões de cores com maior eficiência que a acuidade visual (considerando exclusivamente a parte do dorso no animal, excluindo-se a parte da cabeça onde se diferencia estas duas espécies pelos tufos auriculares). Mas é fundamental entender que esta diferenciação é feita sobre as médias e não sobre indivíduos. Foi visto nos gráficos de dispersão que pode ocorrer sobreposições eventuais nas regiões limites de separação entre os padrões de cores das três espécies, o que significa dizer que nem sempre haverá certeza da identificação específica a partir da avaliação colorimétrica (como feita neste estudo) em casos fronteiros. Por outro lado, para os demais casos, a avaliação das cores R, G e B pode ser uma ferramenta bastante útil e economicamente viável para alocação de indivíduos dentro das categorias destas três espécies.

A identificação colorimétrica dos indivíduos da espécie focal deste estudo ficou bem definida para os indivíduos com coloração mais escura, padrão dos indivíduos encontrados em São Paulo, mas os indivíduos do Rio de Janeiro, que apresentaram uma coloração mais clara não ficaram destacados das demais espécies para as médias de vermelho e de verde, e mesmo para as médias de azul, onde ocorre

uma separação das espécies, essa separação não tem uma fronteira larga de distinção e sobreposições eventuais podem ocorrer. A Figura inverteu a posição dos indivíduos ambíguos do Rio de Janeiro (que estavam mesclados entre indivíduos do grupos de *C. jacchus*, ou na fronteira para a as médias de azul) , isolando-os nas primeiras colocações do gráfico (valores mais altos).

Embora os autores que descrevem as espécies do gênero *Callithrix* cite pequenas diferenças entre a coloração do corpo de *C. jacchus* e *C. penicillata*, fazer a distinção entre essas espécies sem considerar a área da cabeça não é tão fácil. Provavelmente muitos biólogos conhecedores dessas espécies não se sentiriam seguros em identificar uns de outros sem as características marcantes da área da cabeça desses animais (Figura 58).

Figura 58 - Imagem de corpos de sagüis (2 *C. penicillata*, nas extremidades, e 1 *C. jacchus* no meio)



Fonte: O autor, 2015.

É recorrente entre os agentes envolvidos em manejo, o questionamento sobre como garantir o reconhecimento de uma espécie sem a presença de um especialista. Os resultados deste estudo foram eficientes para trazer um auxílio neste sentido, mas foi positivo para respaldar o menor problema, que é a separação das três espécies puras. Ainda assim é uma ferramenta a mais, além das pouco atraentes chaves de identificação.

Ainda não foi resolvida a garantia de reconhecimento das espécies de sagüis através de fotos à distância, e a captura dos animais manteve-se necessária. Embora esse trabalho tenha sido realizado com animais anestesiados, a captura de imagens da região externa dos membros inferiores faz com que não seja obrigatória a contenção química dos animais, e agentes treinados podem realizar uma contenção manual de modo que seja feita uma fotografia desta parte do sagüi ao lado de um padrão de cores.

A metodologia sugerida por Bergman e Beehner (2008) em que o padrão de cores é fotografado no mesmo local onde esteve um animal imediatamente depois de ter sido tirada uma foto do indivíduo para garantir a mesma iluminação e uma calibração das cores através da combinação das imagens, parece pouco viável para ser usada com sagüis. Grandes primatas usam o solo e são menos agitados que sagüis, portanto conseguir uma imagem da área desejável de um animal em um ângulo compatível com uma análise comparável provou-se factível com Geladas. Não deixa de ser imaginável adaptar sagüis através de ceva a estarem em um local onde se possa alocar um padrão de cores e tentar ajustar a situação de modo a facilitar uma captura de imagem sem uma variação angular inviabilizante, ainda assim, ficam de fora as fotografias tiradas de improviso.

A equação retirada da regressão logística produz um resultado probabilístico em que, depois de retirada a média de azul de um determinado indivíduo, podemos ver que chances ele tem de estar em uma determinada categoria das espécies puras. Se o objetivo é distinguir a espécie *C. aurita* das demais espécies invasoras, sem considerar os híbridos, podemos usar este modelo que conseguiu distinguir todos os sagüis do grupo *C. aurita* corretamente.

Embora não se tenha alcançado uma equação eficaz para determinar híbridos (colorimetricamente reconhecíveis), essa abordagem permite uma ampliação da equação com um conjunto de novos valores que representem alguma outra (ou outras) característica diferenciável entre indivíduos, capazes de, somadas, aumentar a discriminação e reconhecer os híbridos.

Com a disseminação das espécies invasoras no território do *C. aurita*, cada vez mais chegam sagüis nas mãos de agentes governamentais (IBAMA, Polícia Ambiental, Centros de recuperação e triagem de fauna, zoológicos, parques, unidades de conservação, entre outras) que carecem de identificação (um problema particular

de onde co-ocorrem espécies congêneres) e que geram o espinhoso problema de destinação dos animais, sobretudo porque a espécie local está em processo de extinção. A metodologia proposta neste estudo oferece, no mínimo, um respaldo acessível para que sagüis, das espécies puras, capturados pelas diversas entidades governamentais possam ser identificados no mesmo local, sem a necessidade de consultas a especialistas, de retirada e envio de material biológico e de dispendiosas análises genéticas. Será necessário, contudo, ter um aparelho capaz de criar arquivos de imagem RAW e um padrão de cores para que se possa ajustar as imagens.

4.5.3 Com híbridos

Quando consideradas somente três espécies (espécies puras) os gráficos ficaram mais claros, a introdução dos híbridos gera um gráfico mais cheio, mas ainda assim evidencia a extensão e a localização dos híbridos alinhados e misturados junto aos demais.

No gráfico de dispersão fica evidente a ampla distribuição dos híbridos no conjunto das três espécies em todas as cores, mas, para o azul, os híbridos atingem os menores valores, se mesclado mais acentuadamente com os *C. aurita* que nas cores anteriores (R e G).

No diagrama de caixas a posição do grupo de híbridos ficou bastante nivelada com a do grupo de *C. jacchus* na amostragem das médias da cor vermelha (R), para esses mesmos dois grupos, na amostragem da cor verde (G), esse nivelamento decaiu um pouco, ainda mantendo uma sobreposição já na do azul (G), os quatro grupos se separam ratificando uma individualização do grupo híbrido

Os resultados, levando em consideração o grupo de híbridos, presumidos como um grupo único, mostram através dos gráficos da estatística descritiva que os híbridos ocuparam um lugar intermediário preferencialmente entre as espécies *C. aurita* e *C. jacchus*. Os gráficos de dispersão sem separação por espécies e os diagramas de caixas mostram, com diferentes percepções, esse posicionamento do agrupamento dos híbridos. Novamente as médias de azul foram as que criaram

alguma distinção entre os quatro grupos, mas nos gráficos de dispersão categorizados por espécies pode-se notar uma ampla distribuição dos híbridos, mesmo para as médias de azul.

Híbridos separados

Alguns híbridos puderam ser separados pelo tipo de hibridação que ocorreu (identificados pela análise genética com marcadores moleculares de linhagens paterna e materna), contudo, o número amostral para essas subdivisões ficou muito reduzido para análises estatísticas robustas. De qualquer forma, analisar esses valores com ferramentas descritivas permite fazermos algumas suposições.

Nos diagramas de caixa para as operação de subtração das médias, os híbridos de *C. jacchus* tenderam a se alinhar com os *C. jacchus* puros, e os híbridos de *C. penicillata* tenderam a se alinhar com os *C. penicillata* puros. Uma tendência como essa pode significar o reconhecimento do tipo de hibridação que está ocorrendo com determinado indivíduo ou em determinada região, especialmente em relação aos híbridos entre *C. aurita* e *C. jacchus*, uma vez que híbridos de *C. aurita* com *C. penicillata* e *C. aurita* com *C. kuhlii* não se diferenciam bem.

A não separação dos híbridos em um grupo identificável mantém o problema do reconhecimento e manejo destes indivíduos. Embora o teste *post hoc* da análise de variância das médias de cor azul também tenha separado os híbridos das demais espécies puras, é justamente neste conjunto que os híbridos ficam mais misturados com os *C. aurita*. No âmbito da questão da invasão do território de ocorrência da ameaçada espécie do sagüi-da-serra-escuro, importa mais distanciar todos dos *C. aurita* do que compreender que todos esses híbridos são híbridos com a espécie local ou que híbridos não se diferenciam de alguma das espécies invasoras. Mas o problema persiste com os indivíduos do Rio de Janeiro se misturando com os híbridos e demais espécies para os valores das médias de R e de G, ou com as médias de B que trazem os híbridos para dentro do agrupamento de *C. aurita* que se separava quando os híbridos não foram considerados. Para o estado de São Paulo essa técnica pode servir para isolar os *C. aurita* puros dos demais, mas não no Rio de Janeiro.

Poderia ser suposto que esse padrão mais claro do Rio de Janeiro fosse uma consequência de uma população que passou por algum processo de hibridação suficientemente antigo para não ter sido percebido, mas isso não é corroborado pelas características de marcadores moleculares de linhagem, onde tanto para o marcador materno quanto para o paterno, os indivíduos do Rio de Janeiro apresentaram marcas moleculares idênticas às dos demais *C. aurita*.

4.6 Conclusão

O teste colorimétrico feito com as médias de R, G e B de cortes da área lateral do joelho de fotografias padronizadas pelo uso de uma paleta de cores (ColorCheker), foi eficiente para separar estatisticamente as espécies “puras” de sagüis *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. aurita*, sendo que as médias de azul foram as que apresentaram melhores resultados para indetificar a espécie *C. aurita*, e para as espécies *C. jacchus* de *C. penicillata* a melhor separação foi feita pela subtração das médias.

O teste não conseguiu distinguir um agrupamento colorimétrico exclusivo para os híbridos (de *C. jacchus* ou *C. penicillata* com *C. aurita*) de forma a distinguir com segurança indivíduos puros da espécie *C. aurita*.

A escolha de outra área anatômica, para ser somada ao resultados deste estudo, deve ser investigada para que novos valores contrubuem na distinção da espécie pura *C. aurita* de seus híbridos. Essa investigação é suportada uma vez que a observação visual de muitos indivíduos é capaz de identificar os híbridos dos puros.

5 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo, como um todo, manteve como sentido orientador de fundo, um objetivo conservacionista. Mesmo o capítulo referente à pesquisa bibliográfica manteve um viés voltado para a conservação do *Callithrix aurita*.

O segundo capítulo oferece alguns argumentos novos e reafirma outros para a proteção desta espécie ameaçada: 1) aumenta a segurança, desta vez através da ferramenta de genética molecular e de um “N” amostral mais significativo (20), de uma identidade genética sólida entre indivíduos *C. aurita*. Isso diminui os questionamentos sobre a certeza da identidade dos animais que passarão por manejo e também de que temos apenas uma espécie de *C. aurita*, isto é, todos os indivíduos classificados do ponto de vista genético como aurita estão dentro do mesmo grupo; 2) reafirma este grupo como uma espécie distinta bem estabelecida por distância genética com divergência evolutiva mais antiga do que as demais têm entre si (exceto *C. flaviceps*), o que aumenta o caráter de raridade deste ramo filogenético, aumentando também seu valor como ramos evolutivo a ser conservado. Isto não é um argumento óbvio, mas é um argumento muito importante por sua capacidade de confrontar um pensamento não raro encontrado entre agentes envolvidos com conservação ambiental, de todos os sagüis são iguais e desempenham um papel ecológico semelhante, e portanto: “Porque lutar contra esses que estão se saindo tão bem, para salvar este outro que também é sagüi e ainda é menos forte?”. O isolamento evolutivo da espécie *C. aurita* contribui como fator vinculado ao argumento de coevolução e interdependência dos ecossistemas e funciona como um posicionamento e resposta científica para situações como esta; 3) os resultados dos dois marcadores genéticos de linhagem paterna e materna juntos indicam que ainda há grupos puros de *C. aurita*, e este resultado é um detalhe fundamental para o planejamento de um programa de conservação e manejo da espécie, uma vez que o sucesso de programas de recuperação de espécies em extinção está ligado ao número de espécimes puros que restam na natureza e de sua diversidade genética. Por outro lado, os resultados destes mesmos marcadores que provam diversos casos de hibridação entre a espécie nativa e as espécies invasoras, atrelados ao mapeamento dessas ocorrências, atestam o encontro, a competição e a hibridação entre essas espécies. Esses resultados também funcionam como apoio e fundamentação para os órgãos públicos e sociedade articulada promover ações para salvaguardar a espécie nativa.

Os resultados do capítulo voltado para amostras de museu exerce, em termos de manejo e conservação, um papel de garantia de que a espécie considerada nativa amostrada hoje, em meio a um difundido processo de invasão e hibridação com sagüis congêneres, é a mesma espécie de *C. aurita* que ocorria no sudeste antes do alastramento das espécies invasoras, e não uma “espécie” híbrida. Esses resultados reforçam a segurança de que os esforços pessoais e institucionais, e os aportes financeiros investidos com o objetivo de estudar e proteger a espécie nativa ameaçada estão sendo corretamente alocados.

Os resultados do capítulo que trabalha o reconhecimento das espécies por padrões de cores analisados a partir de imagens digitais possibilitam o uso desta técnica como uma ferramenta para reconhecimento de indivíduos “puros” da espécie nativa *C. aurita* em relação às outras espécies presentes na região Sudeste. Essa ferramenta foi funcional para identificação entre indivíduos de fenótipos considerados puros e pode ser usada de forma simples e de baixo custo, evitando a solicitação de análises genéticas ou de especialistas em taxonomia para garantir a origem taxonômica de indivíduos de sagüis envolvidos em situações de manejo. O caso dos híbridos não ficou resolvido, mas não será difícil aprimorar essa metodologia para que, também os híbridos sejam incorporados de forma eficiente em um esquema de reconhecimento por fotografia digital.

CONCLUSÃO GERAL

O conhecimento genético de primatas tem aumentado ajudando a identificar espécies e a sua classificação dentro das categorias de ameaçadas de extinção.

A espécie do sagüi-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*) ficou melhor caracterizada molecularmente do já havia sido antes, uma vez que vários indivíduos oriundos de diferentes localidades fizeram parte da amostragem de identificação com marcador mitocondrial COI. Todos eles foram tiveram 100% de identidade.

Essa espécie apresentou uma distância genética aproximadamente cinco vezes maior do que as outras espécies mostraram entre si, solidificando sua posição, já estabelecida por outros estudos, de um ser um ramo com um destino evolutivo bem estabelecido. O que, do ponto de vista genético, aumenta seu valor para fins de conservação.

Os casos de hibridação ficaram provados e identificados geograficamente, mostrando a penetração das espécies invasoras no habitat da espécie nativa com esse agravante da descaracterização genética e da competição sexual.

O uso de primers de COI para amplificar e sequenciar trechos menores de DNA foram bem sucedidos embora a comparação com um espécimen mais antigo, arquivado em museu, não tenha ficado bem caracterizada, mas mostrou a presença do DNA da espécie *C. aurita*, mesmo que contaminada com outro DNA. Isto ajuda a garantir a identidade da espécie ameaçada.

Para as demais espécies do gênero *Callitrix* apareceram mais haplótipos do que espécies deixando a questão sobre a existência de espécies crípticas ou sobre a possibilidade de uma irradiação incompleta, afetando em particular o grupo reconhecido fenotipicamente por *C. penicillata*.

A proposição de uma metodologia de captura de imagem digital para identificação das espécies foi exitosa para os casos das espécies puras, mas precisará de incluir outros parâmetros (provavelmente a área dos tufos auriculares) para garantir a discriminação de híbridos. Sendo que, para os casos de miscigenação mais antigos, somente a ferramenta molecular poderá identificar indivíduos híbridos que já tenham voltado a se parecerem com uma das espécies originárias.

Os mapas que incluem informações de outros pesquisadores (fotos de sagüis em diversas regiões do sudeste) se soma e deixa claro a gravíssima situação em que se encontra a

espécie do sagüi-da-serra-escuro no âmbito total de sua área de ocorrência, a grande maioria das observações da espécie nativa vem acompanhada de fotos, em pontos imediatamente vizinhos, de uma espécie invasora ou já de híbridos.

Esta tese se soma aos estudos mais aprofundados de Pereira (2006, 2010), de Bechara (2012) e de Nunes (2015), mostrando em tempo real o processo de extinção de uma espécie, que levará a cabo este nefasto destino caso o poder público e a sociedade civil organizada não consigam se articular eficientemente e rapidamente.

Um vaticínio que fica lançado é de que, caso não se implementem políticas e ações enérgicas para a conservação do *Callithrix aurita*, quinze a trinta anos bastarão para escrever o nome desta espécie conjugada no passado.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, R. R.; BISHOP, J. M. Morphological and molecular evidence reveals recent hybridization between gorilla taxa. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 64, n. 1, p. 271–90, jan. 2010.
- ALLENDORF, F. W. *et al.* The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 613–622, 2001.
- ANDRADE, C. C. F. **Estudo da estrutura genética das populações de saguis (*Callithrix spp.*) introduzidos na Área de Proteção Ambiental da Bacia do Rio São João / Mico-leão-dourado, no Estado do Rio de Janeiro.** [s.l.] Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006.
- AURICCHIO. **Primatas do Brasil.** São Paulo: Terra Brasilis, 1995.
- AVISE, J. C. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. **Trends in ecology & evolution**, v. 4, n. 9, p. 279–81, 1989.
- BAKER, R. J.; BRADLEY, R. D. Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. **Journal of mammalogy**, v. 87, n. 4, p. 643–662, 1 ago. 2006.
- BARROSO, C. M. L. *et al.* Update on the Phylogenetic Systematics of New World Monkeys: Further DNA Evidence for Placing the Pygmy Marmoset (*Cebuella*) within the Genus *Callithrix*. **International Journal of Primatology**, v. 18, n. 4, p. 651–673, 1997.
- BATISTA, A. V; LENCIONI, F.; MITTMANN, J. **Hibridação em cativeiro entre espécies do gênero *Callithrix*.** Anais do XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2011
- BECHARA, I. M. **Abordagens metodológicas em Biogeografia da Conservação para avaliar risco de extinção de espécies: um estudo de caso com *Callithrix aurita* (Primates: Callitrichidae).** [s.l.] UFRJ, 2012.
- BEGOTTI, R. A.; LANDESMANN, L. F. Predação de ninhos por um grupo híbrido de sagüis (*Callithrix jacchus/penicillata*) introduzidos em área urbana: implicações para a estrutura da comunidade. **Neotropical Primates**, v. 15, n. 1, p. 28–32, 2008.
- BENIRSCHKE, K.; ANDERSON, J. M.; BROWNHILL, L. E. Marrow Chimerism in Marmosets. **Science**, v. 138, n. 3539, p. 513–5, 1962.
- BERGER, C.; PARSON, W. Mini-midi-mito: Adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples. **Forensic Science International: Genetics**, v. 3, n. 3, p. 149–153, 2009.
- BERGEY, C. M. *et al.* A New Method for Genome-wide Marker Development and Genotyping Holds Great Promise for Molecular Primatology. **International Journal of Primatology**, v. 34, n. 2, p. 303–314, 2013.
- BERGMAN, T. J.; BEEHNER, J. C. A simple method for measuring colour in wild animals: Validation and use on chest patch colour in geladas (*Theropithecus gelada*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 94, n. 2, p. 231–240, 2008.

- BERNARDO, C. S. S.; GALETTI, M. Densidade e tamanho populacional de primatas em um fragmento florestal no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 827–832, 2004.
- BICCA-MARQUES, J. C.; SILVA, V. M.; GOMES, D. F. Ordem Primates. *In*: REIS, N. R. *et al.* (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina, Brasil: [s.n.]. p. 437.
- BLAIR, M. E.; GUTIERREZ-ESPELETA, G. A.; MELNICK, D. J. Subspecies of the Central American Squirrel Monkey (*Saimiri oerstedii*) as Units for Conservation. **International Journal of Primatology**, v. 34, n. 1, p. 86–98, 2013.
- BOVENDORP, R. S.; GALETTI, M. Density and population size of mammals introduced on a land-bridge island in southeastern Brazil. **Biological Invasions**, v. 9, p. 353–357, 2007.
- BRAND, K.; MATTHEWS, S. (EDS.). **GISP - Programa Global de Espécies Invasoras**. 1. ed. [s.l.] GISP, 2005.
- BRANDÃO, L. D.; DEVELEY, P. F. Distribution and conservation of the buffy tufted-ear marmoset, *Callithrix aurita*, in lowland coastal Atlantic forest, south-east Brazil. **Neotropical Primates**, v. 6, n. 3, p. 86–88, 1998.
- BRASIL. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçada de Extinção. **Diário Oficial da União**, v. 245, p. 121, 2014.
- BROWN, K. S. J.; BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. *In*: WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. (Eds.). **Tropical deforestation and species extinction**. [s.l.] Chapman & Hall, 1992. p. 119–142.
- BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA barcoding of marine metazoa. **Annual review of marine science**, v. 3, n. June 2015, p. 471–508, 2011.
- BUCKNER, J. C. *et al.* Biogeography of the marmosets and tamarins (Callitrichidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 82, n. May, p. 413–425, 2014.
- CANALE, G. R. *et al.* Pervasive defaunation of forest remnants in a tropical biodiversity hotspot. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.
- CANAVEZ, F. C. *et al.* Molecular phylogeny of new world primates (Platyrrhini) based on beta2-microglobulin DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 12, n. 1, p. 74–82, 1999.
- CARVALHO, R. S. *et al.* Molecular identification of a Buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*) incorporated in a group of invasive marmosets in the Serra dos Orgãos National Park, Rio de Janeiro - Brazil. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 4, n. 1, p. 10–11, 2013.
- CASAS-MARCE, M.; REVILLA, E.; GODOY, J. A. Searching for DNA in museum specimens: A comparison of sources in a mammal species. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 502–507, 2010.
- CASTRO, C. S. S. Tamanho da área de vida e padrão de uso do espaço em grupos de sagüis, área grupos *Callithrix jacchus* (Linnaeus) (Primates, Callitrichidae) (Primates, Callitrichidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1, p. 91–96, 2003.

CDB. **Decision adopted by the conference of the parties to the convention on biological diversity at its seventh meeting: Alien species that threaten ecosystems, habitats or species.** *Anais* of the Conference of the parties to the convention on biological diversity.

Kuala Lumpur: UNEP/CBD/COP/DEC, 2004. Disponível em:

<<https://www.cbd.int/decision/cop/default.shtml?id=7750>>

CEBALLOS, G. *et al.* Accelerated modern human – induced species losses: Entering the sixth mass extinction. **Sciences Advances**, v. 1, n. 5, p. 1–5, 2015.

CERQUEIRA, R.; MARROIG, G.; PINDER, L. Marmosets and Lion-tamarins distribution (Callitrichidae , Primates) in Rio de Janeiro State , South-eastern Brazil. **Mammalia**, v. 62, n. 2, p. 213–226, 1998.

CHAPMAN, C. A.; ONDERDONK, D. A. Forests without primates: Primate/plant codependency. **American Journal of Primatology**, v. 45, n. 1, p. 127–141, 1998.

CHAVES, P. B. *et al.* Genetic diversity and population history of a critically endangered primate, the northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*). **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20722, jan. 2011.

CHAVES, R. *et al.* The place of *Callimico goeldii* in the Callitrichine phylogenetic tree: evidence from von Willebrand factor gene intron II sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 13, n. 2, p. 392–404, 1999.

CHIARELLO, A. G. Effects of fragmentation of the Atlantic forest on mammal communities in south-eastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 89, n. 1, p. 71–82, 1999.

_____. Density and Population Size of Mammals in Remnants of Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 14, n. 6, p. 1649–1657, 2000.

_____. Primates of the Brazilian Atlantic Forest: The Influence of Forest Fragmentation on Survival. *In*: MARSH, L. K. (Ed.). . **Primates in Fragments**. [s.l.] Academic / Plenum, 2003. p. 99–121.

CHIARELLO, A. G.; MELO, F. R. DE. Primate Population Densities and Sizes in Atlantic Forest Remnants of Northern Espírito Santo, Brazil. **International Journal**, v. 22, n. 3, p. 379–396, 2001.

CODENOTTI, T. L.; SILVA, V. M. Resultados da enquete sobre ocorrência de primatas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Neotropical Primates**, v. 12, n. 2, p. 83–89, 2004.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Situação atual dos calitriquídeos que ocorrem no Brasil.** *Anais do I Congresso Brasileiro de Primatologia*. Belo Horizonte: 1983

_____. Sistemática, distribuição geográfica e situação atual dos símios brasileiros (Platyrrhini : Primates). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, p. 1063–1079, 1990.

_____. Apontamentos sobre *Callithrix aurita* (E. Geoffroy, 1812), um sagüi pouco conhecido (Callitrichidae, Primates). *In*: RYLANDS, A. B.; BERNARDES, A. T. (Eds.). . **A Primatologia no Brasil – Vol. 3**. Belo Horizonte: undação Biodiversitas e Sociedade Brasileira de Primatologia., 1991. p. 145–158.

COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. New Data on the Taxonomy of the Brazilian Marmosets of the Genus *Callithrix* Erxleben, 1777. **Folia Primatologica**, v. 20, p. 241–264, 1973.

- COIMBRA-FILHO, A. F.; PISSINATTI, A.; RYLANDS, A. B. Experimental multiple hybridism among *Callithrix* species from eastern Brazil. *In*: RYLANDS, A. B. (Ed.). . **Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology**. [s.l.] Oxford University Press, 1993. p. 95–120.
- CORRÊA, H. K. M. **Ecologia e comportamento alimentar de um grupo de saguis-da-serra-escuros (*Callithrix aurita* E. Geoffroy 1812) no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Cunha, São Paulo, Brasil**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.
- CÔRREA, H. K. M.; COUTINHO, P. E. G.; FERRARI, S. F. Between-year differences in the feeding ecology of highland marmosets (*Callithrix aurita* and *Callithrix flaviceps*) in southeastern Brazil. **Journal of Zoology**, v. 252, p. 421–427, 2000.
- CORTÉS-ORTIZ, L. *et al.* Hybridization in large-bodied New World primates. **Genetics**, v. 176, n. 4, p. 2421–5, ago. 2007.
- COSENZA, B. A. P.; MELO, F. R. Primates of the Serra do Brigadeiro State Park, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 6, n. 1, p. 18–20, 1998.
- COSTA, L. P. *et al.* Conservação de mamíferos no Brasil. Megadiversidade. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 103–112, 2005.
- COUTINHO, P. E. G. **Comportamento reprodutivo de um grupo de *Callithrix aurita* (Platyrrhini, Primates) no Parque Estadual Serra do Mar, núcleo Cunha, São Paulo, Brasil**. [s.l.] Universidade Federal do Pará / Museu Paraense Emílio Goeldi, 1996.
- CROPP, S.; BOINSKI, S. The Central American squirrel monkey (*Saimiri oerstedii*): introduced hybrid or endemic species? **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 16, n. 3, p. 350–365, 2000.
- CUNHA, A. A. Alterações na composição da comunidade e o status de conservação dos mamíferos de médio e grande porte da Serra dos Órgãos. *In*: CRONEMBERGER, C.; VIVEIROS DE CASTRO, E. B. (Eds.). . **Ciência e conservação na Serra dos Órgãos**. Petrópolis, Brasil: IBAMA, 2007. p. 221–224.
- DAVID, V. A. **Padrão de atividades, ecologia alimentar e área de vida de um grupo de *Callithrix penicillata* (Humboldt, 1812) (Primates, Callitrichidae) (sagüi-de-tufos-pretos)**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2005.
- DETWILER, K. M.; BURRELL, A. S.; JOLLY, C. J. Conservation Implications of Hybridization in African Cercopithecine Monkeys. **International Journal of Primatology**, v. 26, n. 3, p. 661–684, jun. 2005.
- DEVIVO, M. **Taxonomia de *Callithrix Erxleben, 1777* (Callitrichidae, Primates)**. [s.l.] Fundação Biodiversitas, 1999.
- DIGBY, L. J.; BARRETO, C. E. Social Organization in a Wild Population of *Callithrix jacchus*. **Folia Primatologica**, v. 61, p. 123–134, 1993.
- DOWLING, T. E.; SECOR, AND C. L. the Role of Hybridization and Introgression in the Diversification of Animals. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, n. 1, p. 593–619, 1997.
- DUDLEY, N.; STOLTON, S. **Running pure**. [s.l.] WWF / World Bank, 2003.
- ENDLER, J. A. On the measurement and classification of colour in studies of animal colour patterns. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 41, n. 4, p. 315–352, 1990.

ENDLER, J. A.; MIELKE, P. W. J. Comparing color patterns as birds see them. **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 86, p. 405–431, 2005.

FAITH, D. P. Phylogenetic diversity , functional trait diversity and extinction : avoiding tipping points and worst-case losses. **Philosophical Transactions B**, v. 370, 2015.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap** *Evolution*, 1985.

FERREIRA, V. R. *et al.* **Levantamento de espécies recebidas no Zoológico da cidade do Rio de Janeiro no ano de 2007** Anais do XXXII Congresso Anual da Sociedade de Zoológicos do Brasil. **Anais...**Sorocaba – SP: 2008

FIORE, A. DI. Molecular genetic approaches to the study of primate behavior, social organization, and reproduction. **American journal of physical anthropology**, v. Suppl 37, p. 62–99, jan. 2003.

FOREST, F. *et al.* Phylogeny, extinction and conservation: embracing uncertainties in a time of urgency. **Philosophical Transactions Royal Society B**, v. 370, 2015.

FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetics Research**, v. 66, n. 02, p. 95–107, 1995.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 1. ed. Cambridge: Cambridge Univ Press, 2002.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727–736, 2008.

FUZESSY, L. F. *et al.* Morphological Variation in Wild Marmosets (*Callithrix penicillata* and *C. geoffroyi*) and Their Hybrids. **Evolutionary Biology**, v. 41, n. 3, p. 480–493, 2014.

GARBINO, G. S. T. How many marmoset (Primates: Cebidae: Callitrichinae) genera are there? A phylogenetic analysis based on multiple morphological systems. **Cladistics**, p. 1–27, 2015.

GENOVESI, P.; BERTOLINO, S. Human dimension aspects in invasive alien species issues : the case of the failure of the grey squirrel eradication project in Italy. *In*: MCNEELY, J. A. (Ed.). **The Great Reshuffling Human dimensions of Invasive Alien Species**. [s.l.] IUCN, 2001. v. 1996p. 113–120.

GOODMAN, M. *et al.* Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 9, n. 3, p. 585–98, jun. 1998.

GRATIVOL, A. D.; BALLOU, J. D.; FLEISCHER, R. C. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2001.

GRELLE, C. E. V.; CERQUEIRA, R. **Limites climáticos, vegetacionais e de altitude das distribuições geográficas de *Callithrix aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi* e *C. kuhlii* (Primates: Callitrichidae)**. Livro de Resumos do IX Congresso Brasileiro de Primatologia. **Anais...**Sociedade Brasileira de Primatologia, 1999

_____. Determinantes da distribuição geográfica de *Callithrix flaviceps* (Thomas). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 2, p. 414–420, 2006.

- GUERRA, R. F.; TAKASE, E.; SANTOS, C. V. Cross-fostering between two species of marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*). **Revista Brasileira De Biologia**, v. 58, n. 3, p. 665–669, 1998.
- GUSCHANSKI, K. *et al.* Next-generation museomics disentangles one of the largest primate radiations. **Systematic Biology**, v. 62, n. 4, p. 539–554, 2013.
- HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>
- HARADA, M. L. *et al.* **DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the sister-grouping of Cebus and Saimiri from two unlinked nuclear genes.** *Molecular phylogenetics and evolution*, 1995.
- HARBICHT, A.; WILSON, C. C.; FRASER, D. J. Does human-induced hybridization have long-term genetic effects? Empirical testing with domesticated, wild and hybridized fish populations. **Evolutionary applications**, v. 7, n. 10, p. 1180–91, 2014.
- HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- HEDMARK, E.; ELLEGREN, H. Microsatellite genotyping of DNA isolated from claws left on tanned carnivore hides. **International Journal of Legal Medicine**, v. 119, n. 6, p. 370–373, 2005.
- HERSHKOVITZ, P. **Living New World monkeys (Platyrrhini) with an introduction to Primates. Vol. I.** Chicago: Chicago University Press, 1997.
- HURVICH, L. M.; JAMESON, D. Color vision and color coding. **Science**, v. 3, n. 65, p. 478–480, 1896.
- IBGE. **Mapa de Vegetação do Brasil** Rio de Janeiro Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, , 1993.
- IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 32, n. 2, p. 128–144, 1991.
- IUCN. **IUCN Guidelines for the prevention of biodiversity loss caused by alien invasive species.** Gland: IUCN – The World Conservation Union, 2000.
- _____. **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2.** Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- JOHNSON, N. K.; REMSEN JR., J. V.; CICERO, C. Refined colorimetry validates endangered subspecies of the Least Tern. **The Condor**, v. 100, n. 1, p. 18–26, 1998.
- JUNQUEIRA, A. C. M.; LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, n. 1, p. 39–45, 2002.
- LAURANCE, W. F. Reflections on the tropical deforestation crisis. **Biological Conservation**, v. 91, p. 109–117, 1999.
- LEVACOV, D.; JERUSALINSKY, L.; FIALHO, M. D. S. Levantamento dos primatas recebidos em centros de triagem e sua relação com o tráfico de animais silvestres no Brasil. *In*: MELO, F. R. DE; MOURTHÉ, Í. (Eds.). **A Primatologia no Brasil volume 11.** [s.l.] Sociedade Brasileira de Primatologia, 2011. p. 281–305.

LI-COR (ED.). **Radiation Measurements and Instrumentation. Publication 8202-LM.** Lincoln, Nebraska: Li-Cor Coop., 1982.

LYRA-NEVES, R. M. *et al.* Comportamentos interespecíficos entre *Callithrix jacchus* (Linnaeus) (Primates, Callitrichidae) e algumas aves de Mata Atlântica, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 3, p. 709–716, 2007.

MACK, R. N. *et al.* Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. **Ecological Applications**, v. 10, n. 3, p. 689–710, 2000.

MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 5, p. 229–237, 2005.

MALUKIEWICZ, J. *et al.* Hybridization Effects and Genetic Diversity of the Common and Black-Tufted Marmoset (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) Mitochondrial Control Region. v. 00, 2014.

_____. Natural and Anthropogenic Hybridization in Two Species of Eastern Brazilian Marmosets (*Callithrix jacchus* and *C. penicillata*). **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0127268, 2015.

MARROIG, G. Espécies ou subespécies em *Callithrix*? **Neotropical Primates**, v. 3, n. 1, p. 10–13, 1995.

MARROIG, G.; CHEVERUD, J. M. Did natural selection or genetic drift produce the cranial diversification of neotropical monkeys? **The American naturalist**, v. 163, n. 3, p. 417–428, 2004.

MARROIG, G.; CROPP, S.; CHEVERUD, J. M. Systematics and Evolution of the *Jacchus* Group of Marmosets (Platyrrhini). **American Journal of Physical Anthropology**, v. 123, n. 1, p. 11–22, 2004.

MARTINS, M. M. Feeding ecology of *Callithrix aurita* in a forest fragment of Minas Gerais. **Neotropical Primates**, v. 6, n. 4, p. 125–126, 1998.

MARTINS, M. M.; SETZ, E. Z. F. Diet of Buffy Tufted-Eared Marmosets (*Callithrix aurita*) in a Forest Fragment in Southeastern Brazil. **International Journal of Primatology**, v. 21, n. 3, p. 467–476, 2000.

MELLO, F. R. **Caracterização molecular de *Callithrix aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi* e de seus prováveis híbridos (Primates, Callitrichinae).** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 1999.

MELO, F. R. **Primates e áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade no vale do rio Jequitinhonha , Minas Gerais** **Primates e áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade no vale do rio Jequitinhonha , Minas Gerais.** [s.l: s.n.].

_____. The near extinction of a population of northern muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*) in Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 13, n. 1, p. 10–14, 2005.

MELO, F. R.; RYLANDS, A. B. *Callithrix aurita*. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Eds.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção.** 1. ed. Brasília: MMA, 2008. p. 735–737.

MELO-JÚNIOR, T. A.; ZARA, F. J. Black-tufted-ear Marmoset *CALLITHRIX PENICILLATA* (Primates: Callitrichidae) Following the Army Ant *LABIDUS PRAEDATOR* (Formicidae: Ecitoninae) in the Cerrado and the Atlantic Forest, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 14, n. 1, p. 32–33, 2007.

MENDES, S. L. Hybridization in free-ranging *Callithrix flaviceps* and the taxonomy of the Atlantic Forest marmosets. **Neotropical Primates**5, v. 5, n. 1, p. 6–8, 1997a.

_____. **Padroes biogeograficos e vocais em *Callithrix***. [s.l.] UNICAMP, 1997b.

MENEZES, A. N.; BONVICINO, C. R.; SEUÁNEZ, H. N. Identification, classification and evolution of owl monkeys (*Aotus*, Illiger 1811). **BMC evolutionary biology**, v. 10, p. 248, 2010.

MERCÊS, M. P. *et al.* Morphology and mitochondrial phylogenetics reveal that the Amazon River separates two eastern squirrel monkey species: *Saimiri sciureus* and *S. collinsi*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, p. 426–435, 2015.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. **Methods in Enzymology**, v. 101, n. 1962, p. 20–78, 1983.

MIRANDA, G. H. B.; FARIA, D. S. Ecological aspects of black-pinellated marmoset (*Callithrix penicillata*) in the Cerradão and dense Cerrado of the Brazilian Central Plateau. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 3, p. 397–404., 2001.

MITTERMEIER, R. A. *et al.* **Hotspots Revisited : Earth's biologically richest and most endangered ecoregions**. [s.l: s.n.].

MITTERMEIER, R. A.; COIMBRA-FILHO, A. F. Systematics: species and subspecies. *In*: COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. (Eds.). . **Ecology and behavior of neotropical primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1981. p. 29–109.

MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F. Systematics: species and subspecies an update. *In*: MITTERMEIER, R. A. *et al.* (Eds.). . **Ecology and behavior of neotropical primates, volume 2**. Washington, DC: World Wildlife Fund, 1988. p. 13–75.

MMA. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Brasília: MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Núcleo Mata Atlântica e Pampa, 2010.

MODESTO, T. C.; BERGALLO, H. G. Ambientes diferentes, diferentes gastos do tempo entre atividades: o caso de dois grupos mistos do exótico *Callithrix* spp. Na Ilha Grande, RJ, Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 3, p. 112–118, 2008.

MORAES-BARROS, N.; MORGANTE, J. S. A simple protocol for the extraction and sequence analysis of DNA from study skin of museum collections. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 1181–1185, 2007.

MORAIS JR., M. M. **Saguís do gênero *Callithrix*: Espécies invasoras no norte do estado do Rio de Janeiro**XI Congresso Brasileiro de Primatologia. **Anais...**Porto Alegre, RS: Sociedade Brasileira de Primatologia, 2005

_____. Os saguis, *Callithrix jacchus* e *penicillata*, como espécies invasoras na região de ocorrência do mico-leão dourado. *In*: OLIVEIRA, P. P.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R. (Eds.). . **Conservação do Mico-leão dourado Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. [s.l.] Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. p. 86–117.

_____. **Os saguis exóticos invasores na bacia do rio sao joao**. [s.l: s.n.].

MOREIRA, M. A. M. SRY evolution in Cebidae (Platyrrhini: Primates). **Journal of Molecular Evolution**, v. 55, n. 1, p. 92–103, 2002.

MORSELLO, C. **Áreas protegidas públicas e privadas: seleção e manejo**. São Paulo, Brasil: [s.n.].

MOURA-BRITTO, M.; PATROCÍNIO, D. N. M. A fauna de espécies exóticas no Paraná: contexto nacional e situação atual. *In*: CAMPOS, J. B.; TOSSULINO, M. G. P.; MULLER, C. R. C. (Eds.). **Unidades de Conservação: Ações para valorização da biodiversidade**. Paraná, Brasil: Instituto Ambiental do Paraná, 2005. p. 53–94.

MULLIS, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, n. 1, p. 263–273, 1986.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

NAGAMACHI, C. Y. *et al.* Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group jacchus (Platyrrhini, Primates). **American journal of primatology**, v. 41, n. 1, p. 53–60, jan. 1997.

NATORI, M. Interspecific relationships of *Callithrix* based on the dental characters. **Primates**, v. 27, n. July, p. 321–336, 1986.

_____. Craniometrical variations among eastern Brazilian marmosets and their systematic relationships. **Primates**, v. 35, n. 2, p. 167–176, 1994.

NEVES, L. G. **Distribuição geográfica e conservação de *Callithrix kuhlii* (Coimbra-Filho, 1985) (Primates, Callithrichidade) no Sul da Bahia**. [s.l: s.n.].

NORRIS, D. *et al.* Density and Spatial Distribution of Buffy-tufted-ear Marmosets (*Callithrix aurita*) in a Continuous Atlantic Forest. **International Journal of Primatology**, v. 32, n. 4, p. 811–829, 2011.

NUNES, N. D. **O sagui-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*) e os saguis invasores no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ, Brasil: distribuição espacial e estratégias de conservação**. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

OLIVEIRA, A. B. L. **Presença ou ausência do *callithrix aurita* em fragmentos de mata atlântica**. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 2012.

OLIVEIRA, L. C.; GRELE, C. E. V. Introduced primate species of an Atlantic Forest region in Brazil: present and future implications for the native fauna. **Tropical Conservation Science**, v. 5, n. 1, p. 112–120, 2012a.

_____. Introduced primate species of an Atlantic Forest region in Brazil : present and future implications for the native fauna. **Tropical Conservation Science**, v. 5, n. 1, p. 112–120, 2012b.

OLMOS, F.; MARTUSCELLI, P. Habitat and distribution of the buffy-tufted-ear marmoset *Callithrix aurita* in São Paulo State, Brazil, with notes on its natural history. **Neotropical Primates**, v. 3, n. 3, p. 75–79, 1995.

OPAZO, J. C. *et al.* Phylogenetic relationships and divergence times among New World monkeys (Platyrrhini, Primates). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 1, p. 274–280, 2006.

PADRONE, J. M. B. **O comércio ilegal de animais silvestres: avaliação da questão ambiental no Estado do Rio de Janeiro.** [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2004.

PASSAMANI, M. *et al.* Hybridization between *Callithrix geoffroyi* and *Callithrix penicillata* in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 5, n. 1, p. 9–10, 1997.

PAULA, H. M. G. *et al.* Estudos preliminares da presença de sagüis no Município de Bauru, São Paulo, Brasil. **Neotropical Primates**, v. 13, n. 3, p. 28–30, 2005.

PEREIRA, D. G. **Interações entre espécies exóticas invasoras e espécies nativas: Calitriquídeos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ.** [s.l.] Univesidade Federal Fluminense, 2006.

_____. **Densidade, genética e saúde populacional como ferramentas para propor um plano de controle e erradicação de invasão biológica: o caso de *Callithrix aurita* (Primates) no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, RJ, Brasil.** [s.l.] UERJ, 2010.

PEREIRA, D. G.; OLIVEIRA, M. E. A. DE; RUIZ-MIRANDA, C. R. Interações entre calitriquídeos exóticos e nativos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos - RJ. **Revista Espaço e Geografia**, v. 11, n. 1, p. 87–114, 2008.

PERELMAN, P. *et al.* A molecular phylogeny of living primates. **PLoS genetics**, v. 7, n. 3, p. e1001342, mar. 2011.

PERES, C. A.; PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F. DA. Riverine Barriers and Gene Flow in Amazonian Saddle-Back Tamarins. **Folia Primatol**, v. 67, p. 113–124, 1996.

PIKE, T. W. Using digital cameras to investigate animal colouration: Estimating sensor sensitivity functions. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 849–858, 2011.

PIMENTEL, D. *et al.* Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. **BioScience**, v. 50, n. 1, p. 53–65, 2000.

PINTO, M. P.; GRELE, C. E. V. Minimizing conservation conflict for endemic primate species in Atlantic forest and uncovering knowledge bias. **Environmental Conservation**, v. 39, n. 01, p. 30–37, 2012.

POLANC, P. *et al.* Genotyping success of historical Eurasian lynx (*Lynx lynx* L.) samples. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 2, p. 293–298, 2012.

PONTES, A. R. M. *et al.* Fragmentation causes rarity in common marmosets in the Atlantic forest of northeastern Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 1175–1182, 2007.

PORTER, C. A. *et al.* Sequences of the primate ϵ -globin gene: Implications for systematics of the marmosets and other New World primates. **Gene**, v. 205, n. 1-2, p. 59–71, 1997.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados.** 3. ed. São Paulo, Brasil: Atheneu, 2003.

PRISTON, N. E. C.; WYPER, R. M.; LEE, P. C. Buton macaques (*Macaca ochreata brunnescens*): Crops, conflict, and behavior on farms. **American Journal of Primatology**, v. 74, n. 1, p. 29–36, 2012.

RABOY, B. E.; CANALE, G. R.; DIETZ, J. M. Ecology of *Callithrix kuhlii* and a Review of Eastern Brazilian Marmosets. **International Journal of Primatology**, v. 29, p. 449–467, 2008.

- RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. Extinction By Hybridization and Introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, n. 1, p. 83–109, 1996.
- RIBEIRO, M. C. *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.
- _____. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. *In*: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Eds.). . **Biodiversity Hotspots**. London: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 405–434.
- ROCHA, C. F. D. *et al.* **A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro e nas restingas da Mata Atlântica**. [s.l.] Rima, 2003.
- ROCHA, C. F. D. *et al.* Fauna de anfíbios, répteis e mamíferos do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. **Publ. Avul. Nac. Rio de Janeiro**, p. 3–23, 2004.
- ROMANELLI, C. *et al.* **Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health - A State of Knowledge Review**. 1. ed. [s.l.] WHO/CBD, 2015.
- ROOSMALEN, M. G. M. VAN; ROOSMALEN, T. VAN. The description of a new marmoset genus, *Callibella* (Callitrichinae, Primates), including its molecular phylogenetic status. **Neotropical Primates**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2003.
- ROSENBERGER, A. L.; MATTHEWS, L. J. *Oreonax* – Not a genus. **Neotropical Primates**, v. 15, n. 1, p. 8–12, 2008.
- ROSS, C. N.; FRENCH, J. A.; ORTÍ, G. Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 15, p. 6278–82, 10 abr. 2007.
- RUIZ-GARCIA, M. *et al.* Molecular systematics and phylogeography of *Cebus capucinus* (Cebidae, Primates) in Colombia and Costa Rica by means of the mitochondrial COII gene. **American Journal of Primatology**, v. 74, n. 4, p. 366–380, 2012.
- RUIZ-MIRANDA, C. R. *et al.* Distribuição do sagui (*Callithrix jacchus*) nas áreas de ocorrência do Mico-Leão-Dourado (*Leontopithecus rosalia*) no Estado do Rio de Janeiro. **Neotropical Primates**, v. 8, n. 3, p. 98–101, 2000.
- _____. Behavioral and Ecological Interactions between Reintroduced Golden Lion Tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus , 1758) in Brazil ' s Atlantic Coast Forest Fragments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. January, p. 99–109, 2006.
- RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 1, n. 1, p. 9–10, 1986.
- RYLANDS, A. B. Systematics, Geographic Distribution, and Some Notes on the Conservation Status of the Callitrichidae. *In*: RYLANDS, A. B. (Ed.). . **Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology**. 1. ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1993. p. 412.
- _____. Sagüi-da-serra-escuro. *In*: FONSECA, G. A. B. *et al.* (Eds.). . **Livro Vermelho dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção**. Belo Horizonte, Brasil: Fundação Biodiversitas, 1994a. p. 479.

_____. Mico-leão-dourado. *In*: FONSECA, G. A. B. *et al.* (Eds.). . **Livro Vermelho dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção**. Belo Horizonte, Brasil: Fundação Biodiversitas, 1994b. p. 469.

_____. Primates of the Atlantic Forest - origin, distributions, endemism, and communities. *In*: NRCONK, M. A.; ROSENBERGER, A. L.; GARBER, P. A. (Eds.). . **Adaptative Radiations of Neotropical Primates**. [s.l.] Plenum Press, 1996. p. 21–51.

_____. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in Callitrichidae. **American Journal of Primatology**, v. 38, p. 5–18, 1996.

_____. An Assessment of the diversity of new world primates. **Neotropical Primates**, v. 8, n. 2, p. 61–93, 2000.

_____. **Callithrix aurita**. *In*: IUCN 2010. **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1**. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 16 jun. 2010.

RYLANDS, A. B.; CHIARELLO, A. G. Official List Of Brazilian Fauna Threatened With Extinction. **Neotropical Primates**, v. 11, n. 1, p. 43–49, 2003.

RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. The systematics and distributions of the Marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Mico*) and *Callimico* (*Callimico*) (*Callitrichidae*, *Primates*). *In*: FORD, S. M.; PORTER, L. M.; DAVIS, L. C. (Eds.). . **The Smallest Anthropoids**. [s.l.] Springer, 2009. p. 25–61.

RYLANDS, A. B.; FARIA, D. S. Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix*. *In*: RYLANDS, A. B. (Ed.). . **Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology**. Oxford: Oxford University Press, 1993. p. 262–272.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRIGUEZ-LUNA, E. Conservation of neotropical primates: Threatened species and an analysis of primate diversity by country and region. **Folia Primatologica**, v. 68, n. 3-5, p. 134–160, 1997.

SAKAI, A. K. *et al.* The population biology of invasive species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 32, p. 305–322, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F. *et al.* Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 4, p. 1209–1213, 1973.

SANGER, F.; NICKLEN, S. DNA sequencing with chain-terminating. v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SCHNEIDER, H. *et al.* Molecular phylogeny of the New World Monkeys (*Platyrrhini*. *Primates*). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 2, n. 3, p. 225–242, 1993.

SCHNEIDER, H. *et al.* Molecular phylogeny of the New World monkeys (*Platyrrhini*, *primates*) based on two unlinked nuclear genes: IRBP intron 1 and epsilon-globin sequences. **American journal of physical anthropology**, v. 100, n. 2, p. 153–179, 1996.

SCHNEIDER, H. *et al.* Can molecular data place each neotropical monkey in its own branch? **Chromosoma**, v. 109, n. 8, p. 515–523, fev. 2001.

- SCHNEIDER, H. *et al.* A molecular analysis of the evolutionary relationships in the Callitrichinae, with emphasis on the position of the dwarf marmoset. **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 1, p. 1–10, 2012.
- SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. The systematics and evolution of New World primates - A review. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, p. 348–357, 2015.
- SCHWITZER, C. *et al.* (EDS.). **Primates in Peril: The World's Most Endangered Primates 2014 - 2015**. Arlington, VA: IUCN SSC Primate Specialist Group (PSG), International Primatological Society (IPS), Conservation International (CI), and Bristol Zoological Society, 2014.
- SENA, L. *et al.* Mitochondrial COII Gene Sequences Provide New Insights into the Phylogeny of Marmoset Species Groups (Callitrichidae, Primates). **Folia Primatologica**, v. 73, n. 5, p. 240–251, 2002.
- SILVA, B. T. F.; SAMPAIO, M. I. C.; SCHNEIDER, H. Natural hybridization between Saimiri taxa in the Peruvian Amazonia. **Primates**, v. 33, n. January, p. 107–113, 1992.
- SILVA, I. DE O.; ALVARENGA, A. B. B.; BOERE, V. Occasional Field Observations of the Predation on Mice, Dove and Ants by Black-Tufted-Ear Marmosets (*Callithrix penicillata*). **Neotropical Primates**, v. 15, n. 2, p. 59–64, 2008.
- SILVA, L. G. *et al.* Patch Size, Functional Isolation, Visibility and Matrix Permeability Influences Neotropical Primate Occurrence within Highly Fragmented Landscapes. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0114025, 2015.
- SIMBERLOFF, D. Eradication—preventing invasions at the outset. **Weed Science**, v. 51, n. 2, p. 247–253, 2003.
- _____. Biological invasions: What's worth fighting and what can be won? **Ecological Engineering**, v. 65, p. 112–121, 2014.
- _____. Non-native invasive species and novel ecosystems. **F1000Prime Reports**, v. 7, n. April, p. 1–7, 2015.
- SORAIA, C.; CASTRO, S. DE. Tamanho da área de vida e padrão de uso do espaço em grupos de sagüis, área grupos *Callithrix jacchus* (Linnaeus) (Primates, Callitrichidae) (Primates, Callitrichidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1, p. 91–96, 2003.
- SOSMA. **Relatório anual**. [s.l.] SOS Mata Atlântica, 2013.
- STEVENS, M. *et al.* Using digital photography to study animal coloration. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, p. 211–237, 2007.
- STEVENSON, M. F.; RYLANDS, A. B. The marmosets, genus *Callithrix*. In: MITTERMEIER, R. A. *et al.* (Eds.). **Ecology and Behavior of Neotropical Primates – Volume 2**. Washington DC: WWF, 1988. p. 612.
- TAGLIARO, C. H. *et al.* Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region. **Molecular biology and evolution**, v. 14, n. 6, p. 674–84, jun. 1997.
- TAGLIARO, C. H. *et al.* Molecular studies of *Callithrix pygmaea* (Primates, Platyrrhini) based on transferrin intronic and ND1 regions: Implications for taxonomy and conservation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 729–737, 2000.

- TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
- TOBE, S. S.; KITCHENER, A. C.; LINACRE, A. M. T. Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit i mitochondrial genes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.
- TRAAD, R. M.; LEITE, J. C. DE M. Introdução das espécies exóticas *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812) e *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) em ambientes urbanos (Primates: Callitrichidae). **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 2, p. 9–23, 2012.
- VEITCH, C.; CLOUT, M. Turning the tide: the eradication of invasive species. **Proceedings of the International Conference on Eradication of Island Invasives**, n. 27, p. 155 – 164, 2002.
- VERONA, C. E. S.; PISSINATTI, A. Primatas do Novo Mundo. *In*: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). . **Tratado de animais selvagens**. São Paulo, Brasil: Roca, 2007. p. 358–377.
- VILELA, S. L.; FARIA, D. S. Dieta do *Callithrix penicillata* (Primate, Callitrichidae) em áreas de cerrado no Distrito Federal, Brasil. **Neotropical Primates**, v. 10, n. 1, p. 17–20, 2002.
- VILLAFUERTE, R.; NEGRO, J. J. Digital imaging for colour measurement in ecological research. **Ecology Letters**, v. 1, p. 151–154, 1998.
- VITOUSEK, P. M. *et al.* Introduced species: A significant component of human-caused global change. **New Zealand Journal Of Ecology**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 1997.
- VOGLER, A. P.; DESALLE, R. Diagnosing units of conservation management. **Conservation Biology**, v. 8, n. 2, p. 354–363, 1994.
- WALSH, P. D. Sample size for the diagnosis of conservation units. **Conservation Biology**, v. 14, n. 5, p. 1533–1537, 2000.
- WHITMEE, S. *et al.* Safeguarding human health in the Anthropocene epoch: report of The Rockefeller Foundation–Lancet Commission on planetary health. **The Lancet**, v. 6736, n. 15, 2015.
- WHITMORE, T. C. Tropical forest disturbance, disappearance, and species loss. *In*: LAURANCE, W. F.; BIERREGAARD JR., R. O. (Eds.). . **Tropical forest remnants**. [s.l.] University of Chicago Press, 1997. p. 3–12.
- WORLEY, K. C. *et al.* The common marmoset genome provides insight into primate biology and evolution. **Nature genetics**, v. 46, n. 8, p. 850–7, 2014.
- ZALBA, S.; ZILLER, S. R. Adaptive management of alien invasive species: putting the theory into practice. **Natureza & Conservacao**, v. 5, n. 2, p. 86–92, 2007.

ZILLER, S. R.; GALVÃO, F. A degradação da estepe gramíneo-lenhosa no Paraná por contaminação biológica de *Pinus elliottii* e *P. taeda*. **Floresta**, v. 32, n. 1, p. 41–47, 2002.

ZINNER, D. *et al.* Mitochondrial phylogeography of baboons (*Papio spp.*): indication for introgressive hybridization? **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 83, 2009.

ZINNER, D.; ARNOLD, M. L.; ROOS, C. The strange blood: Natural hybridization in primates. **Evolutionary Anthropology**, v. 20, n. 3, p. 96–103, 2011a.

_____. The strange blood: natural hybridization in primates. **Evolutionary anthropology**, v. 20, n. 3, p. 96–103, 2011b.

APÊNDICE A - Validação

Houve pouca variação nos valores de R, G e B contidos nos quadrados das mesmas cores do ColorChequer e extraídos das 44 fotos dos quatro fenótipos (Figura A1; Tabela A1). Esta validação permite que as comparações entre os fenótipos possam ser comparadas quanto aos valores de RGB.

Figura A1 - Variação do valores de R, G e B contidos nos quadrados das mesmas cores do ColorChequer (quadrados vermelho, verde e azul) e extraídos de cada foto em uma amostragem de 44 fotos com aproximadamente 10 fotos para cada fenótipo.

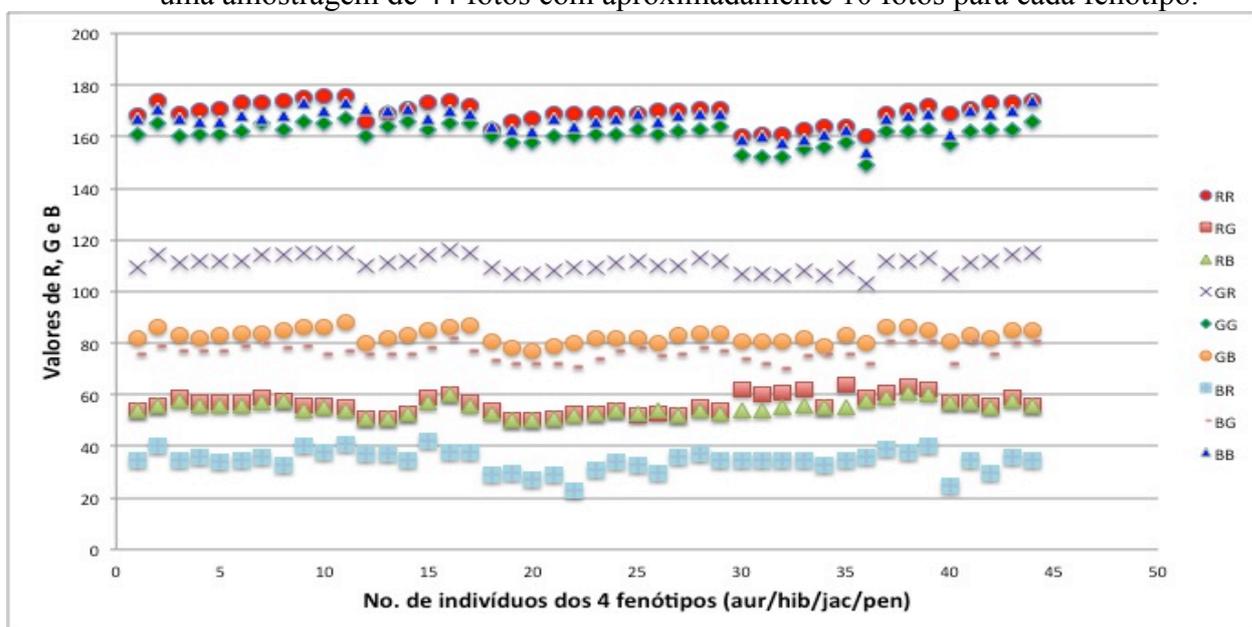
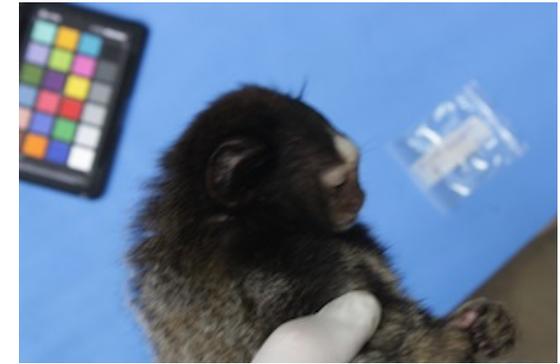
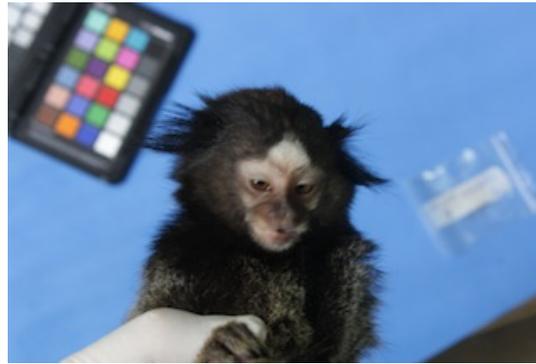


Tabela A1 - Média e desvio padrão dos valores de R, G e B amostrados sobre os quadrados de cores vermelho, verde e azul do ColorChecker de 44 das 76 fotos do estudo.

	RR	RG	RB	GR	GG	GB	BR	BG	BB
Média	169,3	56,4	55,0	110,9	161,0	82,8	34,7	76,4	166,6
Desvio Padrão	4,28	3,69	2,66	3,06	4,09	2,53	4,06	3,09	4,35

Apêndice B – Prancha de fotos (cont.)

Brasília Milena



Amora



Valente



Petrópolis - Andreas 1



Andreas 2



Andreas 4



Andreas

Juiz de Fora 2



Juiz de Fora 4



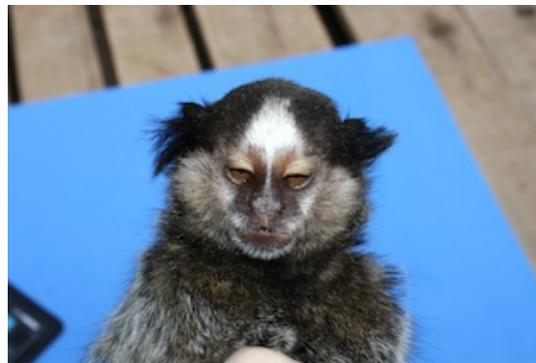
Juiz de Fora 5



Petrópolis - Romilda 4



Romilda 6



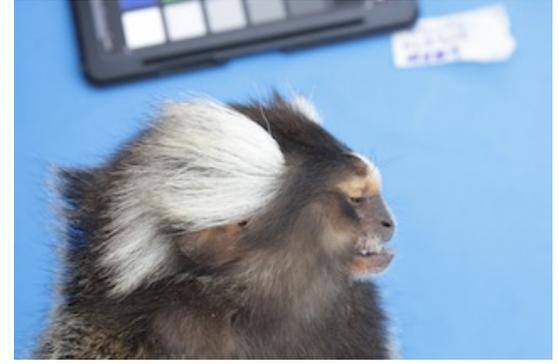
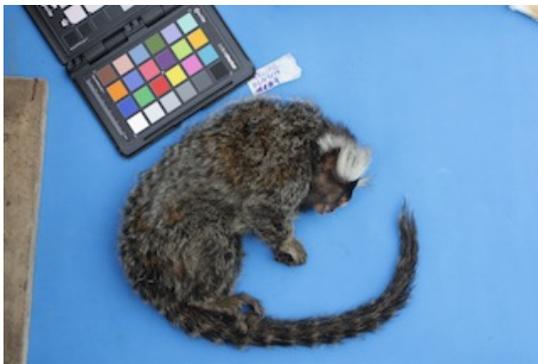
Romilda 7



Petrópolis – Sil 2



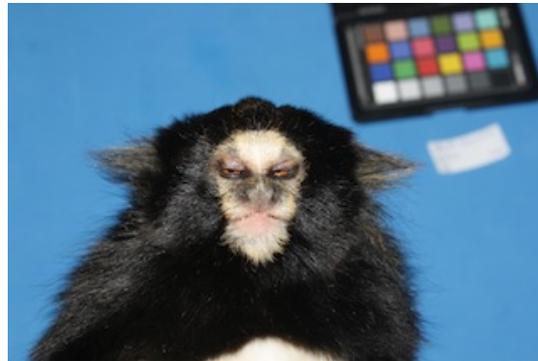
Recife 0038



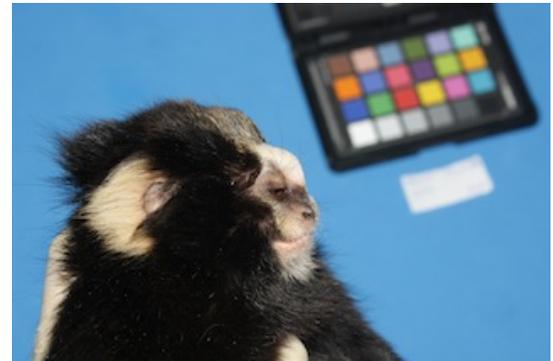
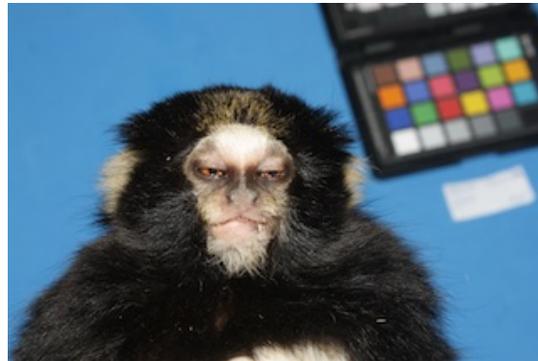
Recife 0080



Aurita Zoo 3370



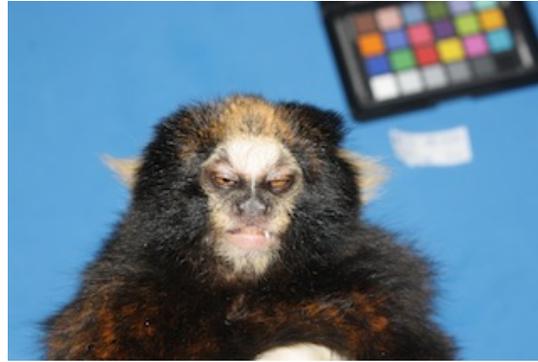
Aurita Zoo 2555



Aurita Zoo 3129



Aurita Zoo 3651



Aurita Petrópolis P05



Petrópolis Bon_1



Petrópolis Bon_3



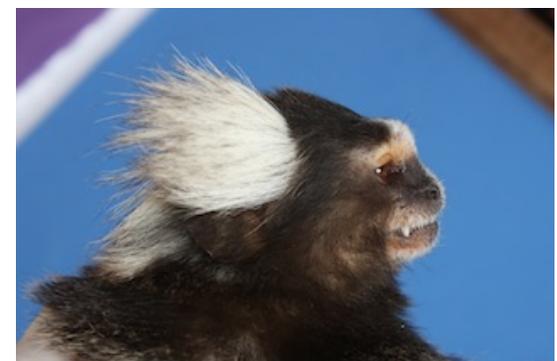
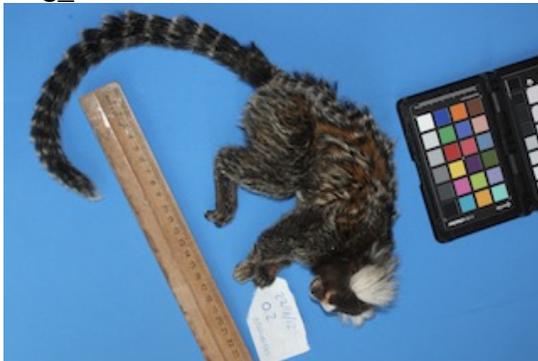
Teresópolis Tere_2



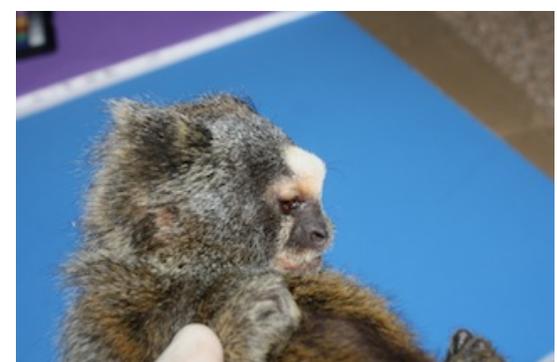
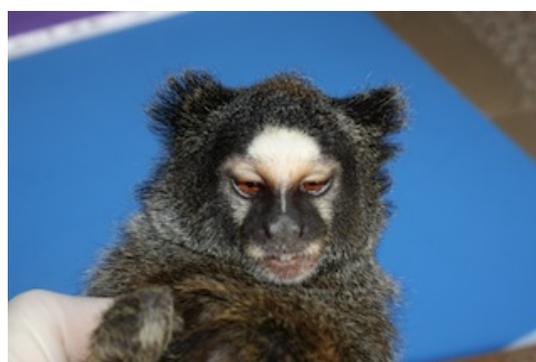
Petrópolis Nog_1 pai



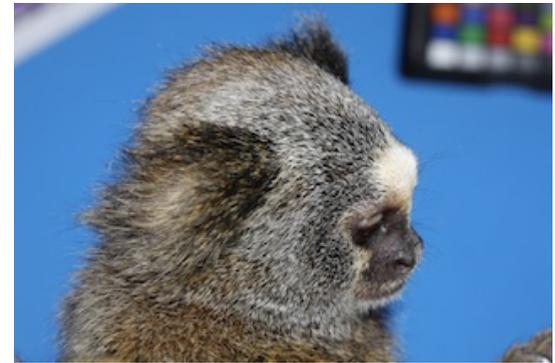
Nog_2 mãe



Híbrido - Nog_3 fl



Nog_4 fl



Nog_5 fl



Híbrido - Petrópolis Ot 3



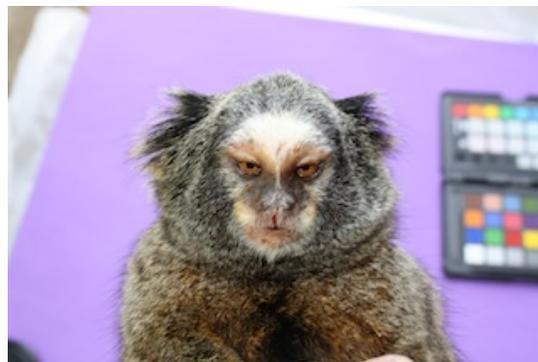
Híbrido -Petrópolis Ot_4



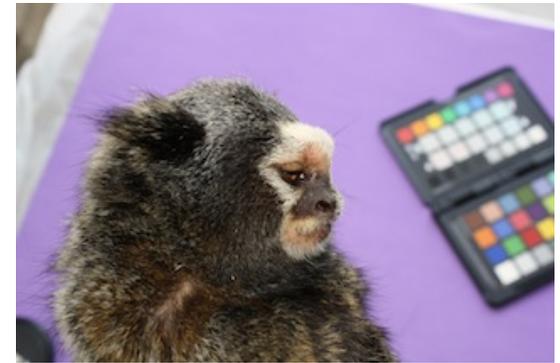
Híbrido - Petrópolis Ot_5



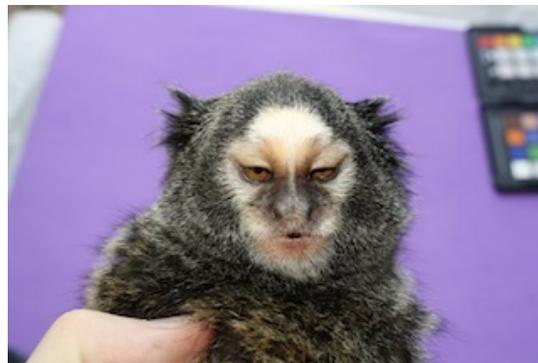
Híbrido - Petrópolis Ot_9



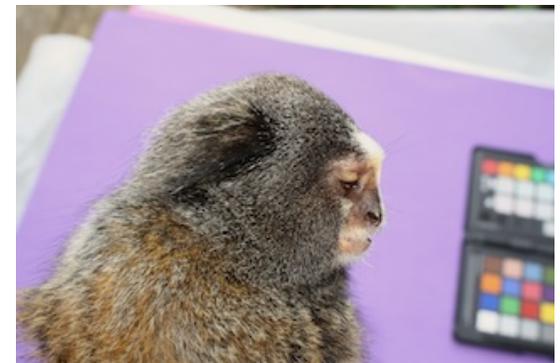
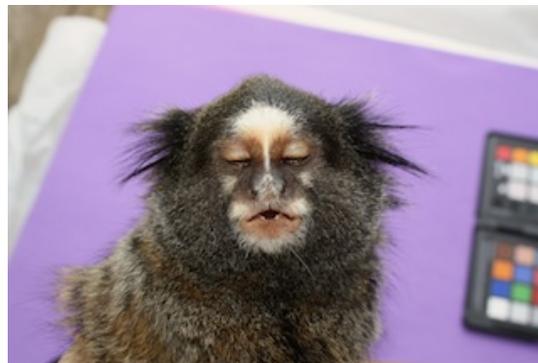
Híbrido - Petrópolis Ot_7



Híbrido - Petrópolis Ot_8



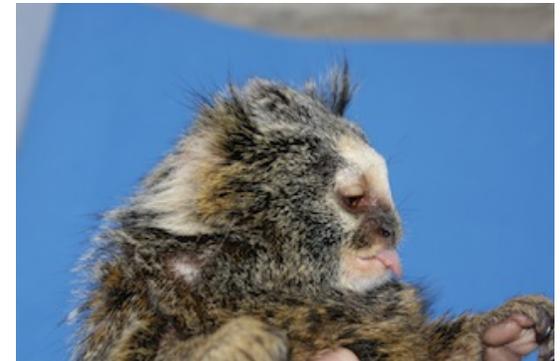
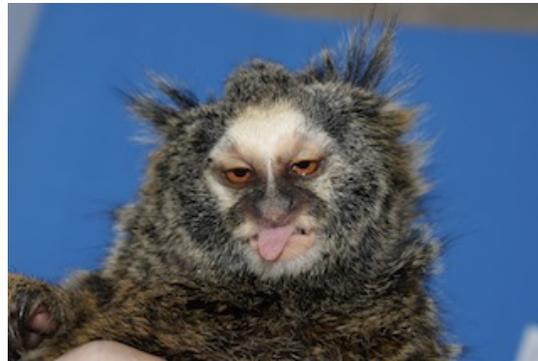
Híbrido - Petrópolis Ot_6



Híbrido – Petrópolis Ot_10



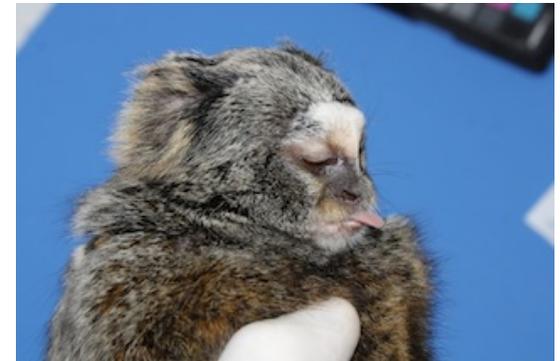
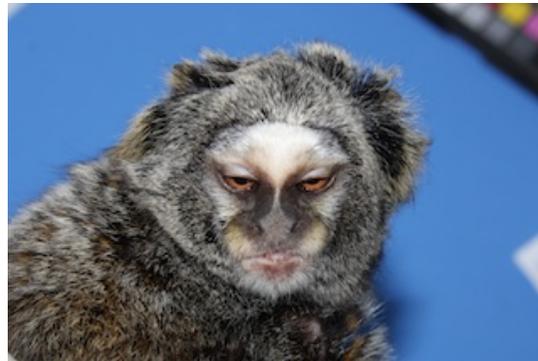
Híbrido – Zoo_3435



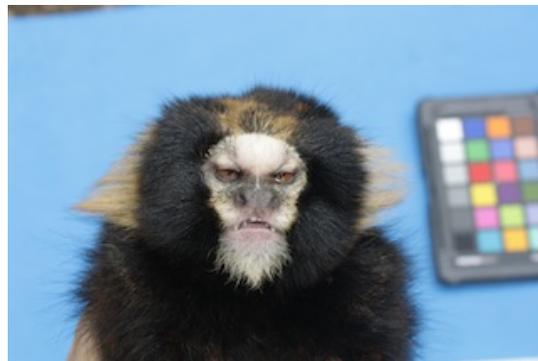
Híbrido – Zoo_2528



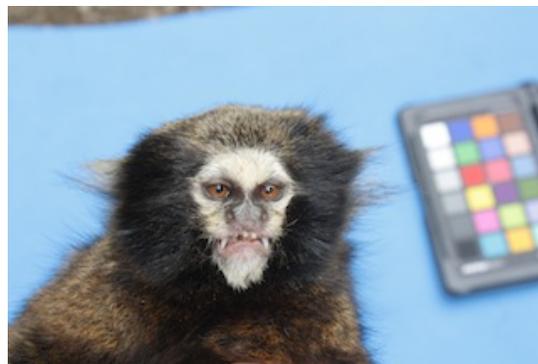
Híbrido – Zoo_2346



CPRJ 2161



CPRJ 2555



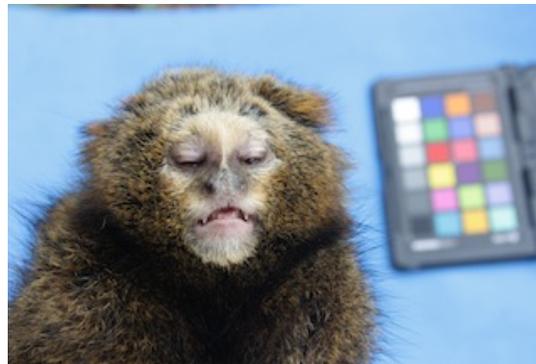
CPRJ 2519



CPRJ 3001



CPRJ 2521



CPRJ 2164



CPRJ 2159



Brasília Greguel



APÊNDICE C – Artigo publicado com parte dos resultados da tese.



www.elsevier.com/locate/FSIGSS

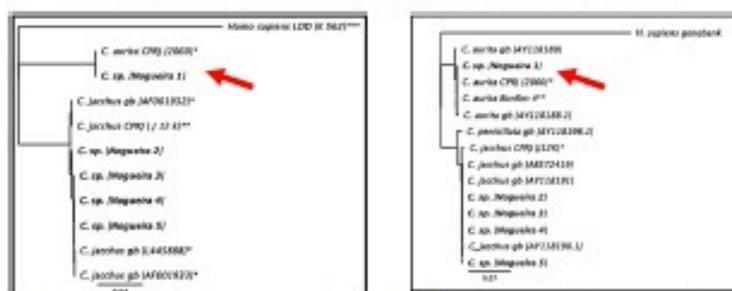


Fig. 2. (A) Neighbor-joining (NJ) tree of three *Callithrix* species, based on COII gene. (B) Neighbor-joining (NJ) tree of three *Callithrix* species, based on Cyt b gene.

Primates molecular identification using the sequencing of mitochondrial regions of the cytochrome b gene (Cyt b) and of the cytochrome C oxidase gene subunit II (COII) has been shown to be an effective, quick and low cost identification tool [4] to be broadly used in forensics and biodiversity conservation.

In this article we compare the mitochondrial molecular identification (CO II and Cyt b) of a group of marmosets (at the species level), to reveal the presence of a native male individual of the threatened *C. aurita* living among his invasive congener *C. penicillata* and *C. jacchus*.

2. Methodology

Specimens of one specific group of *Callithrix* sp. were collected at Nogueira, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil, an urban area at the foothills of Serra dos Órgãos National Park. Blood in FTA was submitted to the DNA extraction and purification protocol with the Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue kit. The DNA were amplified and sequenced using the pair of primers for CO II – CAA AAC GCC GCA TCY CCA ATC (forward)/GGC CTG GTC GTA TGG AAG (reverse), and for Cyt b – CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA (low)/CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A (heavy). Sequencing products were processed in an ABI 3500 capillary system, being visually checked and aligned using the software Geneious 6.1.6. Our final dataset consisted of a 301 bp of the Cyt b gene, and the 450 bp for the CO II gene. The alignments were visually inspected to minimize missing data. The Neighbor-joining (NJ) tree was constructed using the software Geneious 6.1.6 with the Tamura Nei Parameter (TN93) distance model.

3. Results and discussion

The Neighbor-joining trees, presented in Fig. 2A and B, separate the three species of the *Callithrix* genus (*C. jacchus*, *C. penicillata* and *C. aurita*) observed in this study. It shows four individuals from the Nogueira group (Nogueira group 2–5) joined together to the mainly *C. jacchus* branch, detaching and clustering the individual Nogueira 1 among the others characterized as *C. aurita*. The molecular result matches the phenotypical differentiation for the genus, gathering the visually distinguishable Nogueira 1 (Fig. 1) together with others molecularly and phenotypically defined as *C. aurita*. Local observation revealed that Nogueira 1 was the dominant male in the group and, consequently, the main responsible for mating. These mating events, if successful, will generate hybrids with the

potential to spread allopatric alleles back into the native, rare and endemic populations of *C. aurita*, which are already highly threatened by habitat loss. This case alerts to the critical situation for the *C. aurita* marmosets suffering the impact of the two major menaces to biodiversity: habitat loss and biological invasions.

4. Conclusions

The mitochondrial DNA sequencing methodology, with local group observations, were able to identify and discriminate an individual, from the rare and threatened *Callithrix aurita*, living as the dominant male in a group composed of genotypically and phenotypically different *Callithrix* individuals. This result reinforces the relevance of this genetic tool to demonstrate the ecological impacts of illegal commerce and introduction of allopatric primates.

Role of funding

This study was supported by CAPES and FAPERJ.

Conflict of interest

None.

Acknowledgement

We would like to thank Dr. Antonio Amorim for his continuous intellectual support.

References

- [1] C.V. Santos, K.F. Luz, F.S. Sant'Anna, As três espécies de primatas do gênero *Callithrix* (*Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata* e *Callithrix geoffroyi*) entre elas na ilha de Santa Catarina – SC: a importância da pesquisa na implantação do manejo. Congresso Brasileiro de Primatologia, Porto Alegre, 2005.
- [2] C.R. Ruiz-Miranda, A.G. Alfonso, Momi M.M. De, C.E. Vianna, A. Martins, B. Beck, Behavioral and ecological interactions between introduced Golden Lion Tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic Coast Forest fragments, Brazilian Archives of Biology and Technology 46 (2003) 919–930.
- [3] D.G. Pereira, Oliveira MIA de, C.R. Ruiz-Miranda, Interações entre callitriquídeos exóticos e nativos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos – RJ, Revista Espago e Geografia 11 (1) (2008) 87–114.
- [4] M. Ruiz-García, C. Vilqueez, E. Camargo, et al., Molecular phylogenetics of *aitia* (Platyrrhini, Callitidae). *International Journal of Primatology* 32 (5) (2011) 1218–1241. <http://dx.doi.org/10.1007/s10764-011-9539-2>.

APÊNDICE D – Artigo publicado com parte dos resultados da tese.



Barcode analysis using mini-amplicons strategy for museum samples of neotropical primates *Callithrix* spp.

S. Loiola^{a,1}, R.S. Carvalho^{a,b,1}, H.G. Bergallo^c, M. Weksler^d, E.F. Carvalho^a, D.A. Silva^{a,*}

^a Laboratório de Diagnósticos por DNA, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Ecologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

^d Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2015

Accepted 16 September 2015

Available online xxx

Keywords:

Mitochondrial DNA

Barcode species identification

Cytochrome C Oxidase subunit I

Museum specimens

Callithrix

ABSTRACT

The identification of species and the assignment of unidentified samples to a voucher reference database are among the most requested forensic analyses involving crimes against wildlife. Genomic DNA from forensic or museum samples, however, are frequently degraded, hampering the analysis of DNA fragments longer than 500 bp. Among studies targeting non-human species identification, one of the most frequently used fragments is the mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I (COI), in particular a 'barcode' region containing approximately 650 base pairs (bp). The main objective of this work was to develop a set of primers to amplify five shorter overlapping COI fragments for the neotropical marmosets (*Callithrix* spp.) to be used in samples from museum specimens. Taxidermized skins, bones, and hair tissues were sampled out of 9 museum specimens with a range archival from 81 to 2 years; PCR were performed with five mini-amplicons primers pairs and with the primer pair for the whole barcode COI fragment, followed by Sanger sequencing. As results, no amplification was observed using the primer pair for the longer COI sequence; however, using the new set of mini-amplicon primers, all types of samples were amplified. We established optimal PCR conditions for the employed primers and conclude that the mini-amplicon strategy for COI region typing is best suited for hardly degraded samples in forensic research, and in particular for museum samples.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biopiracy, animal mistreatment, and illegal animal trade are examples of crimes that are increasing and getting more space as a social concern. Internal trade of pets is a major threat to wildlife and ecosystems health because it represents a serious menace to local biodiversity. The Atlantic Rain Forest of Eastern South America is a hotspot [1] that is under many different threats. One of the problems that this ecosystem is facing is the illegal trade of native marmosets (*Callithrix* spp.), with irregular releases of animals from geographically distant sources, inside the habitat of the highly endangered Buffy-tufted-ear marmoset *Callithrix aurita*, which causes competition and hybridization, among other problems for wildlife conservation [2].

The correct identification of individuals is a crucial step in the resolution of forensic cases and in some cases it is necessary to compare genetic markers of live animals with a database of museum vouchers as species reference [3]. The use of DNA barcodes, short DNA sequences for species recognition and discrimination, are useful tools to accelerate species-level analysis of biodiversity and to facilitate conservation efforts and forensic elucidations. One of the most frequently used fragments for this purpose is a 'barcode' region located at the 5' end of the gene Cytochrome C oxidase subunit I (COI), containing approximately 650 base pairs (bp) flanked by regions for which universal conserved PCR primers were designed [4]. In case of ancient samples, often with degraded DNA, amplicons greater than 250 bp in length can be difficult to obtain [5]. The use of mini-amplicons strategy for molecular analysis, described by Berger and Parson [6], is effective for materials with a high degree of degradation, which is extremely valuable when is not possible to get a conclusive result by the traditional methods. Thus, the main objective of this work was to develop a set of primers to amplify five shorter and overlapping COI fragments of the neotropical primate genus

* Corresponding author at: Laboratório de Diagnósticos por DNA, Rua São Francisco Xavier, 524, 20550-013 Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: dayse.a.silva@gmail.com (D.A. Silva).

¹ These authors contributed equally to this work.

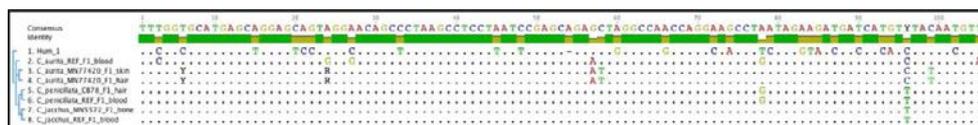


Fig. 1. Neighbor-joining tree (TN93) separating 3 species of marmosets sampled from a museum collection using the COI-F1 fragment. Reference samples (REF) from each species were also used for alignment.

Callithrix (marmosets) and test them with museum specimens, to obtain accurate reference data.

2. Methodology

Nine taxidermized specimens of *Callithrix* spp. (MN2827, MN2821, MN2818, MN2823, MN7420, MN79164, MN5572, MN3957 and MN23799) were sampled at the Museu Nacional-Universidade Federal do Rio de Janeiro (MN-UFRJ), Brazil. Samples of skins, bones, and hair were used to perform DNA extraction and purification using the QiagenQIAamp DNA Investigator kit. Before DNA extraction, the samples of bones and skins were cleaned with a scalpel to remove the superficial layer where contaminant DNA is commonly placed, and after it was hydrated with TE solution (Tris 10 mM and EDTA 1 mM, pH7.6). The hair samples were cleaned with absolute ethanol and swab. The samples presented a range of archival age from 81 to 2 years. The obtained DNA was amplified using 2 strategies: first we developed a pair of primers to amplify the whole barcode COI region (COL_2F; COL_708R; see below), then we developed a set of five overlapping mini-amplicons primers pairs for amplifications of the same region (706 bp) divided in five shorter fragments.

The primers pairs were:

F1: 2F(5'TTTTCAACCAACCACAAGACATCGG3')-172R
(5'AATAAATGCGGTGAGATGTGACGAT3');

F2: 102F(5'TAGGCCAACCGAAGC3')-317R
(5'GTAGGAGAAGTAGTGAGGGG3');

F3: 263F(5'CCCCGAATAAATAACATGACG3')-452R
(5'TGGAAGATACACCTGCT3');

F4: 389F(5'TCACACCCAGGAGCTTC3')-567R
(5'AGAAGGAGGACTGCTGAAT3') and

F5: 524F(5'CCCTATTCTGATGATCTGTACT3')-708R
(5'ACTTCTGGGTGGCCGAAAATCAGAA3').

All primers were developed using the software Geneious 4.8.2 and tested under different temperatures by running a PCR gradient. The optimal PCR condition was achieved by adjusting the annealing temperature to 55 °C. The PCR products obtained were enzymatically purified with illustra™ ExoStar1-Step (GE Healthcare), sequencing reactions were performed and purified with Sephadex® G-50 Medium (Sigma–Aldrich). The sequencing products were processed in an ABI 3500 capillary system, being visually checked and aligned using the software Geneious 4.8.2. The alignments were visually inspected to minimize missing data and a Neighbor-Joining (NJ) tree was constructed with the Tamura-Nei Parameter (TN93) distance model. Sequences from Genbank were used as reference for *Callithrix jacchus* (Accession number JF444285). For *C. aurita* and for *C. penicillata*, DNA from blood samples was amplified with the primers pairs 2F-708R, obtaining a unique 706 bp sequence.

3. Results

After we established optimal PCR conditions for all primers, our results showed positive COI amplification and sequencing for only 3 of 9 tested specimens. Two of them (MN7420 and

MN79164) had positive amplification for the 5 overlapping COI fragments, while the sample MN2821 amplified only for F2 and MN5572 amplified only for F1 fragment. These specimens were morphologically classified as *C. aurita* (MN2821 and MN7420), *C. penicillata* (MN79164) and *C. jacchus* (MN5572). Skin, hair and bone generated positive results in 5 samples out of 16. We had no successful amplification with museum samples for the whole barcode COI fragment with primers 2F and 708R.

The Neighbor-Joining (NJ) tree, presented in Fig. 1, shows the clustering of the museum species with reference *C. aurita*, *C. jacchus* and *C. penicillata* using the consensus sequences obtained from COI fragment F1 (106pb).

4. Discussion

Museum vouchers are important sources to guarantee identification of forensic samples by comparisons with wildlife collections [2]. This work shows some successful results and some difficulties to get COI molecular references from museum specimens of marmosets. Skin, hair and bone generated positive results, showing the accessibility of DNA in different types of taxidermized tissues. The five pairs of primers developed in this work originated their short sequences in younger samples (MN7420—from 2010/ MN79164–2009), but only primers F1 and F2 worked for older samples (F1–MN5572-1941/ F2–MN2821-1931). *C. aurita* were not monophyletic in the Neighbor-Joining tree (region F1), but the 2 sampled specimens share 2 SNPs with reference *C. aurita* sequence. *C. aurita* museum samples also showed two other SNPs that were not found in marmosets or in the human reference analysed. *C. penicillata* had only one SNP of difference related to *C. jacchus* (one in 106 bp fragment), whose result is a weak presumption to separate species. To avoid contamination and to enhance fragment quality, different extraction strategies must be contemplated when dealing with museum samples.

5. Conclusions

The five pairs of primers succeed to sequence short fragments of COI out of different body sources gathered from a museum collection of marmosets. It performed good molecular data, although better for younger samples. Only two pairs (F1 and F2) worked for the oldest samples (MN5572-1941/ MN2821-1931). These primers may help in the identification of marmosets involved in forensics by guaranteeing comparisons with museum-recognized species.

Conflict of interest

None.

Role of funding

Financial support was granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and DNA program–State University and Justice Court of Rio de Janeiro, Brazil.

139 **Acknowledgement**

140 We would like to thank César Amador for his intellectual support
141 and João Oliveira (MM-LFP) for approving the access to the
142 specimens.

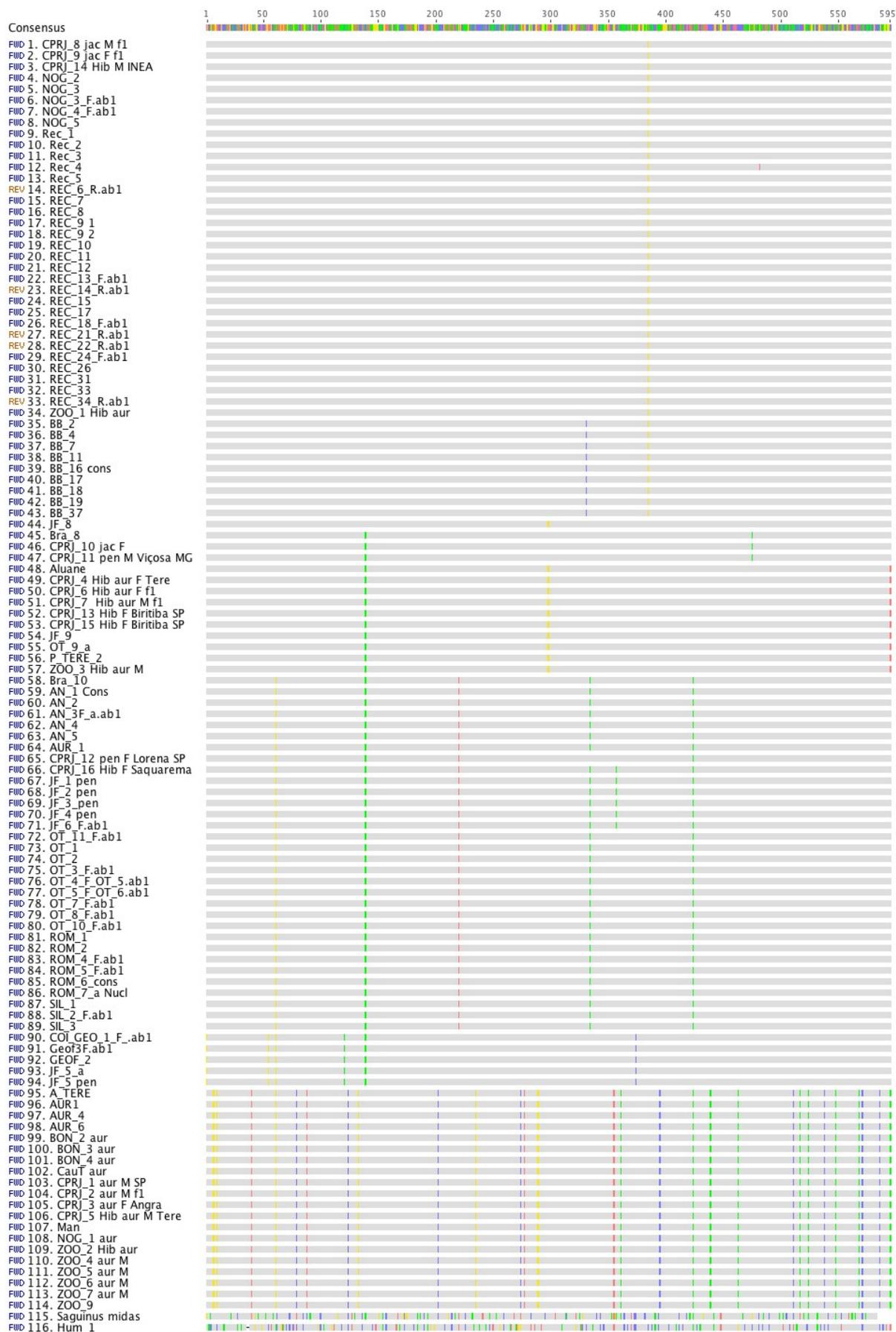
143 **References**

- 144 [1] P. Myer, R.A. Mitronevic, C.J. Mitronevic, et al., Biodiversity hotspots for
145 conservation priorities, *Nature* 406 (2003) 650–655.
- [2] R.S. Cavalho, D.A. Silva, S. Lolo, et al., Molecular identification of a highly
nuclear marker (*mtDNA*) incorporated in a group of marine

- 146 mammals in the Serra das Oitavas National Park, Rio de Janeiro–Brazil,
147 *Forensic Sci. Int. Genet. (Suppl.)* (2014).
- [3] K.N. Johnson, L. Wilson-Wilde, A. Lincoln, Current and future directions of DNA
148 in wildlife forensic science, *Forensic Sci. Int. Genet.* 10 (2014) 1–11.
- [4] Ann Buckley, Dirk Steinhilber, Ines de Hoz-Benito, DNA barcoding of marine
149 cetaceans, *Anim. Res. Mar. Sci.* 8 (2011) 471–486.
- [5] Nadia de Moraes-Barros, João Steguel Morganti, A simple protocol for the
150 extraction and sequencing of mtDNA from study skin of museum
151 collections, *Genet. Mol. Biol.* 30 (4) (2007) 1180–1185.
- [6] Cordula Beyer, Volker Parnow, mtDNA-mtDNA: adapting the amplification and
152 sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples,
153 *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (2009) 149–153.

UNCORRECTED PROOF

APÊNDICE E - Alinhamento das sequencias de COI (595bp)



APÊNDICE F - Tabela das médias de R, G e B relacionadas à origem de linhagem genética (continua)

COI	SRY	Fenotipo	Individuo	Genero	FOTO	Média_R	Média_G	Media_B
Aur	Aur	Aur	CPRJ_3001 Caut	m	IMG_9756	23,5	19,25	16,75
Aur	Aur	Aur	CPRJ_3_2161	m	IMG_9685	16,5	15,5	17
n	n	Hib	CPRJ_2521	f	IMG_9780	43,5	32,5	23
Kuhlii	Aur	Hib	CPRJ_7_2555 F2 Daniel	m	IMG_9708	46,25	33,5	23,25
Aur	Aur	Aur	Zoo_6 3129 =Zoo7 gen	m	IMG_0453	25,25	23,75	23,5
Kuhlii	Aur	Hib	CPRJ_4_2519 - Cap Daniel	f	IMG_9732	54,75	39,25	24,75
Aur	Aur	Aur	Zoo_8 3651 = Zoo9 gen_novo	m	IMG_0498	32,25	27,5	25
Aur	Aur	Aur	Bon_03 (P05)		IMG_8301	57,75	41	25,75
Aur	Aur	Aur	Zoo_5 2555 = Zoo5 gen	m	IMG_0431	27	25,75	26,25
Aur	Nao feito	Aur	2_aur_tere	f	IMG_9879_Tere	41,75	34,5	26,75
n		Jac	Rec_19	m	IMG_0019	36	30,8	26,8
Pen	Aur	Hib	OT_6		IMG_8227	64,5	46,75	27,5
Aur	Aur	Aur	Zoo_4 3370 =Zoo4 gen	m	IMG_0410	28	27	28
Jac	Aur	Hib	CPRJ_8_2164 - Biritiba	m	IMG_9804	42,5	34,5	28
Aur	Aur	Aur	Nog_1	m	IMG_7755_Nog	53	40	30,25
Aur	0	Aur	Bon_01 (P01)	f	IMG_8293	66,5	47,75	30,25
Aur	n	Hib	Zoo_7 3565 = Zoo8 gen	m	IMG_0473	50,5	40,3	30,5
Jac	n	Jac	Rec_9		IMG_9639	51,5	41	32,75
Aur	n	Hib	Zoo_2 2528 = Zoo2 gen	m	IMG_0357	51,25	42,25	33,25
Pen	Aur	Hib	OT_3	m	IMG_8187	75	55,75	33,25
Kuhlii	Aur	Hib	OT_9		IMG_8217	66,75	50	33,5
Pen	n	Hib	CPRJ_16_2159 - Biritiba	f	IMG_9825	53,25	42,75	34,75
Pen	Aur	Hib	OT_8		IMG_8223	61	48,25	34,75
n		Jac	Rec_20	f	IMG_0039	48,3	42	35,5
Pen	Aur	Hib	OT_7		IMG_8219	62,75	50,25	36
Jac	n	Jac	Rec_8		IMG_9615	45,25	40,5	36,25
Jac	n	Jac	Rec_7		IMG_9595	56,5	46	36,75
Pen	JP	Pen	JF_4		IMG_6838_JF4	65	50	37,25
Pen	0	Pen	JF_2		IMG_6826_JF2	61,25	49,25	38,25
Jac		Jac	Rec_14	m	IMG_9741	56,8	47	38,3
Jac	n	Hib	Zoo_3 3435 = Zoo1 gen	f	IMG_0387	68,5	54,25	38,75
Jac	Aur	Hib	Nog_4		IMG_7798_Nog	55,75	47,5	39
Jac	Jac	Jac	Rec_5		IMG_9552	60	49,75	39,25
Jac	Aur	Hib	Nog_5		IMG_7798_Nog	59,5	50,5	39,25
Jac		Jac	Rec_17	m	IMG_9992	50,8	44,5	39,5
n		Jac	Rec_16	f	IMG_9741	57,3	49	40,3
	n	Pen	Dino	m	IMG_0093_Bra	79,75	61,25	41,5
Jac		Jac	Rec_13	f	IMG_9721	59,8	51	43,3
Kuhlii	Aur	Hib	Zoo_1 2346 = Zoo3 gen	m	IMG_0335	65,75	54,25	43,75
	n	Pen	Amora	f	IMG_0023_Bra	70	57,25	43,75
Jac		Jac	Rec_22	f	IMG_0080	61,5	53	43,8
Jac	Jac	Jac	Rec_1		IMG_9466	52	48,75	44
	n	Pen	Pamonha	f	IMG_9934_Bra	79,25	61,75	44

Pen	Aur	Hib	OT_4		IMG_8195	66	55,75	44,25
Jac	Jac	Jac	Rec_3		IMG_9508	64,25	54,75	44,75
Jac		Jac	Rec_12	m	IMG_9701	60,3	52,8	45,5
Jac		Jac	Rec_21	m	IMG_0060	71	59	45,5
Jac	n	Jac	Rec_6		IMG_9574	57,5	51,75	46
Geof	JP	Pen	JF_5		IMG_6849_JF5	75	61,25	46,25
Pen	n	Pen	Gonero	m	IMG_0113_Bra	71,25	59,75	47
Pen	JP	Pen	JF_1		IMG_6821_JF4	71,75	57,5	47,25
	n	Pen	Sertanejo	m	IMG_9911_Bra	72	58,5	47,5
Pen	0	Pen	JF_3		IMG_6834_JF3	75,75	61,5	47,5
Jac		Jac	Rec_18	f	IMG_9998	62,8	55,5	48
Hapl?	n	Pen	Greguel	m	IMG_0063_Bra	68,5	58,5	48,5
Pen	0	Hib	OT_10	f	IMG_8227	72,5	60,25	48,75
Pen	0	Pen	JF_6		IMG_6858_JF6	80,5	66,25	49,25
Jac	Aur	Hib	Nog_3		IMG_7785_Nog	66,5	58,5	49,5
Jac	JP	Jac	Nog_2	f	IMG_7772_Nog	65,5	57	50,25
Jac		Jac	Rec_24	f	IMG_0100	72,3	62,3	51,3
	n	Pen	Grelina	f	IMG_9956_Bra	87	70,75	51,75
Jac	Jac	Jac	Rec_11		IMG_9680	67,75	60	52,25
Jac	Jac	Jac	Rec_4		IMG_9529	67,75	60,25	52,5
	n	Pen	Valente	m	IMG_0043_Bra	79,25	67	53,25
	n	Pen	Novela	f	IMG_9979_Bra	80,5	68	54,75
Pen		Pen	Rom_04		IMG_8510	80,5	66,75	55
Pen	0	Pen	Rom_01		IMG_8498	88,25	71,25	55
	n	Pen	Miumia	f	IMG_9999_Bra	78,25	68,25	55,5
Pen	0	Pen	Rom_06		IMG_8553	82,5	69,75	55,75
Pen	0	Pen	Rom_07		IMG_8564	89,75	73,75	56,5
Pen	Nao feito	Pen	1_pen_tere		IMG_9856_Tere	86,75	72,5	58
Pen	JP	Pen	JF_0		IMG_8272	88,25	73	58,75
Pen	0	Pen	JF_2		IMG_8279	85,5	73,5	59,5
Jac	Jac	Jac	Rec_2		IMG_9486	85,25	75,75	64,75
Pen	JP	Pen	Dino		IMG_8257	108	87,75	67,5
Pen	JP	Pen	Amora		IMG_8261	95,5	83,25	70,75

APÊNDICE G – Relação entre a referência dada aos indivíduos coletados no CPRJ e seu número de tomo nesta instituição.

Referência	N. do CPRJ anotado no FTA
CPRJ 1	2362
CPRJ 2	2591
CPRJ 3	2161
CPRJ_4	2519
CPRJ_5	2520
CPRJ_6	2556
CPRJ_7	2555
CPRJ_8	2164
CPRJ_9	2449
CPRJ_10	2568
CPRJ_11	2370
CPRJ_12	2502
CPRJ_13	2379
CPRJ_14	2524
CPRJ_15	2618
CPRJ_16	2159