Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Genética das populações do sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor* - Callitrichidae) em fragmentos florestais e floresta contínua: implicações para conservação

WANCLEY GARCIA SANTOS

MANAUS – AM
2005

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Genética das populações do sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor* - Callitrichidae) em fragmentos florestais e floresta contínua: implicações para conservação

WANCLEY GARCIA SANTOS

Orientadora: Dra. Izeni Pires Farias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio UFAM/INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS área de concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS – AM
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Wancley Garcia

Estimativa da variabilidade genética das populações do sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor* – Callitrichidae) em fragmentos de floresta e floresta contínua da cidade de Manaus: implicações para conservação – 2005.

Xviii, 50 f.:il.

Dissertação de mestrado – INPA/UFAM, 2005.

1. *Saguinus bicolor* 2. Microssatélites 3. Genética da conservação
4. Primatas 5. Sauim-de-coleira 6. DNA nuclear 7. Callitrichidae
CDD 19. ed. xxx.xxxxxx

Sinopse:

Dentre todas as espécies de calitriquídeos amazônicos, *Saguinus bicolor* é considerado a espécie mais ameaçada de extinção. Estimativas da variabilidade genética foram obtidas de populações de sauins de quatro localidades da cidade de Manaus utilizando marcadores microssatélites para 9 *loci*. Os resultados mostraram uma diversidade genética moderada para as populações de sauins embora as mesmas se encontrem cada vez mais isoladas em fragmentos florestais. Significante redução no tamanho efetivo populacional foi observada em alguns dos fragmentos. Estes resultados juntamente com informações sobre a historia natural e comportamento pode fornecer subsídios para um plano de manejo e conservação desta espécie.

Palavras-chave: *Saguinus bicolor*, calitriquídeos, microssatélite, variabilidade genética, DNA nuclear.

Dedico este trabalho à minha amada esposa Samara e à minha filha Eduarda.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida. Agradeço à Dra. Izeni pelo incentivo, paciência, profissionalismo e compreensão na realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de turma (André, Renata, Carla, Márcia, Ivanildo e William) e a todos do GCBEv pelo apoio e discussões sobre os mais variados assuntos da biologia.

À Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pela estrutura e apoio acadêmico que tive o privilégio de usufruir.

Aos integrantes do Projeto Sauim-de-Coleira (Grace, Marisângela, Fabiano, Dila, Gero, Érika) pelo seu trabalho e colaboração no fornecimento das amostras. Meus sinceros agradecimentos ao coordenador deste projeto, professor Marcelo Gordo por sua competência, trabalho e amizade que foram imprescindíveis para que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço também a todos os colegas do LEGAL: Cleiton, Waleska, Toffoli, Yane, William, Neves, Themis, Cláudia, Mário, Ed, Rafaela, Adam, Manuella, Nayanne, Andréa, Cláudia, Alexandre e Áureo pela convivência e paciência.

Ao Dr. Tomas Hrbek por sua inestimável ajuda na interpretação das análises estatísticas.

Agradeço aos meus amigos Adriano, Ingrid, Caio César, Mahatma, André, Marcelo e Tomás pelo companheirismo, incentivo e diversão.

Agradeço profundamente aos meus pais (Vivaldo e Maria) e irmãos (Anderson, Andreza, Viviane e Junior) que, mesmo na distância, não deixaram

de me apoiar e que incentivaram e têm incentivado minha jornada que se iniciou ainda na graduação.

Agradeço à minha amada esposa Samara por sua perseverança nos momentos de dificuldade, pela paciência enquanto estive ausente, pelo amor em todos os momentos e principalmente por ter me dado o tesouro mais precioso do mundo: minha filha Eduarda.

RESUMO

Nos fragmentos florestais da área urbana de Manaus, ainda podemos encontrar o endêmico macaco sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*), considerado o mais ameaçado de todos os calitriquídeos da Amazônia estando listado no apêndice I do CITES e sendo classificado pela IUCN como uma espécie "criticamente em perigo de extinção". Devido a grande ameaça causada pelo crescimento urbano de Manaus é importante o estudo da avaliação da variabilidade genética dos sauins, onde se espera que tais resultados possam subsidiar planos de conservação para esta espécie. O presente trabalho reporta o estudo da genética das populações remanescentes de sauins nos fragmentos florestais de Manaus: UFAM (existente há ±15), SESI (existente há ±12 anos), Cidade Nova (existente há ±5-6), e a população da área da Reserva Adolfo Ducke. Historicamente todos esses fragmentos eram conectados e acredita-se que a população do SESI foi exterminada durante a fragmentação sendo posteriormente repovoada por alguns indivíduos provenientes do fragmento da UFAM. Desta forma, é importante conhecer e conservar a diversidade genética das populações de Sauim destes fragmentos porque sua perda pode levar a um aumento do risco de extinção diminuindo o potencial para adaptações futuras. Foram analisados nove marcadores moleculares de microssatélites com o objetivo de se determinar os níveis de variabilidade genética de quatro populações de *S. bicolor*. Amostras de pêlo e pele de 95 indivíduos foram coletadas para a extração de DNA. As genotipagens foram realizadas no seqüenciador de DNA MegaBace utilizando-se o programa *Genetic Profiler*. O número total de alelos detectados por *locus* polimórfico para todas as amostras de sauim-de-coleira variou de 3 a 22 alelos. O número médio de alelos por *locus* por população variou de 3,4 a 6,7. A heterozigosidade média observada para todos os *loci* em cada população variou de 0,59 a 0,68. Análises utilizando o parâmetro M (Programa *"M value"*) que testar para uma recente redução no tamanho populacional (efeito "bottleneck") indicaram que duas das quatro populações dos fragmentos apresentam significante "bottleneck" genético: UFAM e SESI. O fragmento da Cidade Nova apesar de não ser significante após a correção para comparações múltiplas, foi próximo do nível de significância (*P*= 0,046). A Reserva Adolfo

Ducke esta conectada com uma floresta contínua e não foi significativamente afetada pela fragmentação. A significante redução populacional foi diretamente relacionada com o tempo em que estas populações sofreram fragmentação de habitat. Os níveis de diversidade genética dos grupos de sauins dos fragmentos florestais foram considerados moderados para esta espécie que nos últimos anos tem sofrido uma recente redução do tamanho populacional como efeito da fragmentação. Tais resultados são encorajadores para a realização de programas de conservação e manejo (reintrodução e translocação) deste primata nos fragmentos de florestas da cidade de Manaus.

ABSTRACT

In the urban forest fragments of Manaus one finds the endemic pied-faced tamarin (*Saguinus bicolor*) which is considered the most endangered callitrichid primate of the Amazon; it is listed in the appendix I of CITES and is classified by IUCN as “critically endangered and in danger of extinction”. The present study reports the result of a genetic survey of the pied-faced tamarin from four forest fragments of Manaus: UFAM (in existence since ±15 years), SESI (in existence since ±12 years), Cidade Nova (in existence since 5-6 years), and a population of the Reserva Adolfo Ducke which borders Manaus on two of its sides. Historically these fragments were connected, and it is also believed that the SESI population was exterminated during the fragmentation process, and at a later date the SESI region was recolonized most probably by individuals from UFAM. Because of its precarious situation caused by the rapid growth of Manaus, a study to evaluate patterns of distribution of genetic diversity of this species is important for conservation planning. Conservation of genetic diversity is important for the pied-faced tamarin as for other species since the loss of genetic diversity may increase risk of extinction and diminish potential of future adaptations. Genetic profile was assessed by nine microsatellite markers in DNA samples obtained from hair and skin biopsy samples of 95 individuals. Genotypes were resolved on the MegaBase automatic sequencer, and binned in the program Genetic Profiler. Total number of polymorphic alleles detected per locus in all samples analyzed varied from 3 to 22 alleles. An average number of alleles per locus per population varied from 3.4 to 6.7. Average populational heterozygosity estimated from all loci ranged from 0.59 to 0.68. Analyses employing the parameter M (obtained from the program *“M value”*) which tests for recent reduction in effective population size – a bottleneck test – indicated that the UFAM and SESI populations experienced a significant reduction in effective population size. Cidade Nova, the most recently fragmented region, showed a non-significant reduction after Bonferroni correction for multiple comparisons, however, it was close to the cut-off value (P = 0.046). The Reserva Adolfo Ducke biological station is connected on two sides to a continuous forest, and it appeared not to be significantly affected by

fragmentation. Significant reductions in effective population sizes were directly related with the length of time the forest fragments were isolated. Levels of genetic diversity observed in the pied-faced tamarin groups inhabiting these forest fragments were considered moderate in comparison to other primates. These results are encouraging for the conservation and management, including reintroductions and translocations, of this primate species inhabiting the urban forest fragments of Manaus.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....III
DEDICATÓRIA.....IV
EPÍGRAFE.....V
AGRADECIMENTOS.....VI
RESUMO.....VII
ABSTRACT.....IX
LISTA DE TABELAS.....XIII
LISTA DE FIGURAS.....XIV
ANEXO.....46

1. Introdução.....01

1.1 - Biologia do sauim-de-coleira (Saguinus bicolor).....02
1.2 - Marcadores Moleculares no Estudo de Primatas.....04
1.2.1 - Marcadores Microssatélites no Estudo de Primatas.....06
1.3 - Fragmentação do habitat de Saguinus bicolor.....11

2. Objetivos.....13
2.1 - Geral.....13
2.2 - Específicos.....13

3. Material e Métodos.....14

3.1 - Obtenção das Amostras.....14
3.2 - Extração de DNA.....15
3.3 - Amplificação in vitro do DNA.....16
3.4 - Análises das Genotipagens.....19
3.5 - Análises Estatísticas Populacionais.....19
3.6 - Teste de Recente Redução no Tamanho Populacional.....21

4. Resultados.....24

4.1 - Caracterização dos microssatélites.....24

4.2 - Polimorfismo e Freqüências Alélicas.....25
4.3 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação.....26
4.4 - Analise de Variância Molecular (AMOVA) e Diferenciação Populacional.....28
4.5 - Analise para Redução de Tamanho Populacional – BOTTLENECK e MValue.....29

5. Discussão.....30

5.1 - Mudanças na Freqüência Alélica e Índices de Diversidade Genética.....30
5.2 - Fluxo Gênico e Estrutura de População.....32
5.3 - Fragmentação do Habitat e Efeito “Gargalo de Garrafa” (Bottleneck).....33
5.4 - Implicações para a conservação.....36

6. Referências Bibliográficas.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Microssatélites utilizados na genotipagem de *S. bicolor.* As seqüências iniciais dos *primers* correspondem à seqüência do *primer* M13.....18

Tabela 02. Características de 09 *loci* microssatélites de *S. bicolor*.....25

Tabela 03. Heterozigosidade Observada e Esperada por *locus* por população. N: Número de alelos; H_o: Heterozigosidade Observada; H_e: Heterozigosidade Esperada.....26

Tabela 04. Características dos *loc*i microssatélites das populações de sauins.....27

Tabela 05. Análise de Variância Molecular entre as populações de saiuns.....28

Tabela 06. Valores de *Nm* (abaixo) e F_{ST} (acima). Os valores com * indicam que foram significativos após a correção de Bonferroni (P<0,008).....28

Tabela 07. Comparações dos testes para redução do tamanho populacional. Nota: Os valores de *"M value"* representam a taxa do número de alelos pela amplitude no tamanho dos alelos, e as probabilidades são baseadas sobre simulações paramétricas. As probabilidades obtidas pelo programa Bottleneck são baseadas no excesso de heterozigosidade derivadas do Teste de Wilconxon para o equilíbrio de mutação ao acaso. Tais probabilidades são calculadas sobre os modelos de IAM, SMM e TPM de evolução molecular dos microssatélites. Nível de significância após a correção de Bonferroni *P*=0,01 identificados por um *.....29

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*).....04

Figura 02. Locais de coleta do presente estudo.....14

Figura 03. Esquema gráfico do protocolo econômico de marcação de fragmentos de PCR com fluorescência. Adaptado de Schuelke (2000).....17

Figura 04. Análise de uma amostra de *S. bicolor* no Programa Fragment Profiler.....19

1. Introdução

Muitas populações naturais são ameaçadas não somente por uma dramática redução na área total de habitat disponível, mas também pelo aumento da fragmentação do habitat (Martin & von Segesser 1996; Wahlberg *et al.* 1996). Esta fragmentação associada a uma contínua exploração provoca uma série de transformações nos processos e funções ecológicas da floresta remanescente, como a redução da diversidade de muitos grupos taxonômicos e a diminuição do número de indivíduos da maioria das populações colocando em risco a sua existência ou levando-as à extinção (Shafer, 1990).

O Brasil possui uma das maiores diversidades de espécies do planeta, sendo o detentor da maior riqueza de primatas do mundo, com 92 espécies reconhecidas que representam cerca de um terço da diversidade existente no planeta. No entanto, a acelerada destruição e fragmentação das florestas tropicais brasileiras colocam em risco toda esta riqueza biológica (Redford, 1997). Várias espécies brasileiras estão nesta situação, entre elas, inúmeras espécies de primatas. Destas, vinte e seis (que corresponde a 34%) estão ameaçadas de extinção (Rylands *et al.,* 1995).

Assim como outras grandes cidades do Brasil e do mundo, Manaus vem crescendo desordenadamente provocando grandes desmatamentos e fragmentação das florestas, que antes eram contínuas. Este crescimento desordenado da cidade e a fragmentação florestal provocam a diminuição da biodiversidade, redução, isolamento ou, até mesmo, extinção local de populações de animais e plantas. No interior dos fragmentos florestais da área urbana de Manaus, ainda podemos encontrar o macaco sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*), considerado o mais ameaçado de todos os calitriquídeos da

Amazônia (Mittermeier *et al.,* 1989) estando listado no apêndice I do CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), e sendo classificado pela *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN-Red List) como uma espécie "criticamente em perigo de extinção". O sauim-de-coleira também se encontra na lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção.

Nos últimos anos, a distribuição de *Saguinus bicolor* vem sendo drasticamente reduzida, e se restringe cada vez mais ao pólo de desenvolvimento da cidade de Manaus (Ayres *et al.,* 1980, 1982; Subirá, 1998). Apesar de ocorrer em áreas verdes da cidade, esta espécie é pouco conhecida onde estudos sobre área de vida, ecologia e comportamento restringem-se aos realizados por Egler (1986, 1991a, 1991b, 1992, 1993) e Vidal (2004).

1.1 – Biologia do sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*)

Os primatas do Novo Mundo foram alvo de vários estudos nos últimos anos e estão classificados em cinco famílias: Aotidae, *Atelidae*, *Pitheciidae, Cebidae* e *Callitrichidae* (Rylands *et al*., 2000). Nesta encontra-se o macaco sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*), pertencente ao gênero *Saguinus*, considerado o membro basal da família que também inclui os gêneros *Callithrix, Leontopithecus* e *Cebuella* (Almeida, 1995; Barroso *et al.,* 1997; Schneider *et al.,* 1993, 1996).

De acordo com a clássica revisão de Hershkovitz (1977), o gênero *Saguinus* está dividido em três seções baseadas na pelagem facial: face nua, face colorida e face com pêlo (fig. 01). Mais recentemente, Rylands *et al*. (1993) reconheceram 12 espécies, incluindo *Saguinus tripartitus* (Thorington Jr.

1988) e *Saguinus geoffroyi* (Mittermeier & Coimbra-Filho, 1982), sugerindo também, um novo agrupamento entre *Saguinus midas* e *Saguinus bicolor* (Natori & Hanihara, 1990; Ferrrari, 1993; Meireles *et al*., 1997). Existe um consenso que *Callithrix*, *Saguinus* e *Leontopithecus* pertencem ao mesmo clado, mas as relações evolucionárias entre estes gêneros ainda são controversas (Rosenberger, 1981; Ford, 1986; Schneider *et al.,* 1996; Pastorini *et al.,* 1998).

Os calitriquídeos possuem algumas características comportamentais e morfológicas marcantes. Além do tamanho corporal reduzido, possuem unhas em forma de garras em todos os dedos com exceção do hálux (dedão do pé) e não possuem o terceiro molar maxilar e mandibular.

Geralmente produzem dois filhotes por gestação, são capazes de se reproduzir duas vezes ao ano e todos os membros do grupo social ajudam na criação dos filhotes (Hershkovitz 1977; Garber 1993). Na verdade, estratégias de criação cooperativa são comuns a todas as espécies de calitriquídeos, sendo caracterizadas por pequenos grupos territoriais de aproximadamente 4 a 15 indivíduos, onde a reprodução é monopolizada por um ou um pequeno número de indivíduos dominantes de cada sexo (French, 1997; Tardif, 1997).

Figura 01. Sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*).

1.2 – Marcadores Moleculares no Estudo de Primatas

Nas últimas décadas, cada vez mais o uso da biologia molecular em populações de diversos grupos de vertebrados e invertebrados vêm sendo empregado para a resolução de incertezas taxonômicas e sistemáticas. Dados moleculares adaptados para análises cladísticas de macacos do Novo Mundo foram obtidos primeiramente no início da década de 1990. Sua contribuição para o entendimento da sistemática em nível supraespecífico e a filogenia dos primatas do Novo Mundo têm sido marcante (Rylands *et al*., 2000).

Estudos utilizando marcadores genéticos, como o DNA mitocondrial (DNAmt), foram realizados em primatas calitriquídeos com o objetivo de testar hipóteses filogeográficas das espécies, estimar tempo de divergência evolucionária e estudar a sistemática dos grupos (Croop *et al.,* 1999, Jacobs *et al.,* 1995, Tagliaro *et al*., 1997, Vallinoto *et al*., 2000, Tagliaro *et al*., 2005).

Utilizando sequências de DNA mitocondrial, Ferris *et al*. (1981) observaram o contraste entre a baixa diversidade genética e ausência de subdivisão em humanos com a alta diversidade e subdivisão geográfica em chimpanzés. Este trabalho, juntamente com análises de sequências nucleares e de regiões não recombinantes do cromossomo Y, confirmou uma grande diversidade em chimpanzés (*Pan troglodytes*) e bonobos (*Pan paniscus*) sugerindo que estas espécies possuem tamanho populacional efetivo maior do que os humanos (Gagneux 2002).

Entretanto, até agora, apenas um trabalho foi realizado utilizando o DNAmt para estimar o nível de variabilidade e estrutura genética das populações em uma espécie de primata do Novo Mundo. Faulkes *et al*. (2003) sequenciaram a região controle do DNA mitocondrial de duas populações de *Callithrix jacchus* para estudar a estrutura das populações e o comportamento social dos grupos. Os autores encontraram uma significante diferenciação genética entre os grupos e os resultados também sugerem não haver diferenciação sexual no comportamento dos grupos indicando que ocorre dispersão por ambos os sexos.

Infelizmente, nossos resultados prévios utilizando genes mitocondriais para as populações de *Saguinus bicolor* não foram satisfatórios. A região controle mitocondrial apresentou interessantes resultados do ponto de vista evolutivo do DNAmt, mas tais resultados impossibilitaram a utilização deste marcador para análise genético-populacional nesta espécie, uma vez que em somente uma única população foram encontrados dois grupos altamente divergentes quanto à linhagem mitocondrial (Hrbek *et al*., 2003). Tais resultados sugerem a presença de uma cópia nuclear da sequência em

questão, polimorfismo ancestral ou a presença de heteroplasmia nas linhagens mitocondriais. Nossos estudos estão em andamento e irão esclarecer quais as melhores alternativas para explicar o padrão observado.

Outro gene testado por nosso grupo foi o gene mitocondrial citocromo oxidase II. Entretanto, este gene também apresentou problemas uma vez que foi detectada uma cópia no genoma nuclear, já anteriormente sugerida por Vallinoto *et al*. (2001) utilizando diferentes pares de primers. Em decorrência desses fatores recorreremos a outro marcador molecular para estudar as populações de sauins.

1.2.1 – Marcadores Microssatélites no Estudo de Primatas

Além do DNAmt, outros diferentes marcadores têm sido amplamente utilizados na análise genética de populações naturais. Estes incluem os marcadores de Número Variável de Repetições em Seqüência (VNTRs), e caracterizam-se por serem constituídos por um número idêntico de seqüências repetidas. Podem ser divididos em duas categorias baseadas no tamanho das repetições: os *minissatélites* que possuem de 15 a 70 pares de base; e os *microssatélites* que são pequenas seqüências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em seqüência, altamente variáveis no número de repetições e que flanqueiam seqüências conservadas (Avise, 1994).

Os microssatélites foram encontrados em todos os genomas procarióticos e eucarióticos analisados até hoje. Eles estão presentes em regiões codificantes e não codificantes sendo geralmente caracterizados por um alto grau de polimorfismo. A origem deste polimorfismo ainda é discutida embora pareça ser mais provável devido a eventos de “deslizes” durante a

replicação do DNA (Schlötterer & Tautz, 1992). Embora o mecanismo de evolução microssatélite ainda permaneça desconhecido, estes marcadores têm sido empregados em vários campos pouco depois de suas primeiras descrições (Litt & Luty, 1989; Tautz 1989; Weber & May, 1989) por causa de sua alta variabilidade o que os tornam marcadores genéticos muito poderosos. Os microssatélites provaram ser uma ferramenta extremamente valiosa para o mapeamento genômico em muitos organismos (Schuler *et al*., 1996; Knapik *et al*., 1998), mas suas aplicações estendem-se sobre diferentes áreas indo desde estudos de DNA forense à genética de populações e conservação e manejo de recursos biológicos (Jarne & Lagoda, 1996). Algumas características os tornam ideais para diversos estudos populacionais: i) existe uma abundância de tais marcadores no genoma de muitos organismos; ii) são altamente polimórficos, com níveis de heterozigosidade freqüentemente alcançando 90%, uma qualidade que é ideal para estudos genéticos, ecológicos e populacionais (Goldstein & Pollock, 1997); iii) usando a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é possível determinar o genótipo de um indivíduo em um simples *locus* gênico; iv) diferentes bandas podem ser interpretadas em termos de *locus* e alelos; v) alelos são codominantes; vi) diferenças no tamanho de alelos podem ser determinadas com precisão de 1pb, permitindo uma comparação segura entre diferentes géis.

A utilização destes marcadores moleculares para estudo de populações em primatas tem sido marcante para os primatas do Velho Mundo, ajudando no entendimento dos grupos sociais e na determinação dos níveis de variabilidade genético-populacionais. Kappeler *et al*. (2002) utilizaram marcadores moleculares microssatélites para analisar a variabilidade genética,

estrutura de populações e parentesco em uma espécie de primata solitário (*Mirza coquereli*) do Velho Mundo. Este foi o primeiro trabalho realizado com um primata filogeneticamente primitivo fornecendo suporte para a teoria de evolução social de primatas. Os resultados demonstraram que em primatas não gregários também existe uma complexa estrutura de parentesco. Além disso, esta espécie possui uma forte tendência a filopatria pelas fêmeas e dispersão pelos machos.

Os sifakas (gênero *Propithecus*) são lêmures endêmicos da ilha de Madagascar. As 03 espécies que constituem este gênero (*Propithecus verreauxi, P. diadema* e *P. tattersalli*) são bastante vulneráveis à extinção devido à sua área geográfica relativamente pequena. Para o entendimento da taxonomia destes primatas altamente ameaçados foram descritos sete microssatélites polimórficos para análises genético-populacionais (Mayor *et al*., 2002). Para especificar como os padrões de acasalamento e dispersão determinam o parentesco e a diversidade genética entre animais da mesma população de *sifakas* (*Propithecus verreauxi verreauxi*), Lawler *et al*. (2003) utilizaram marcadores microssatélites que mostraram um alto grau de heterozigosidade na prole. Estes dados, juntamente com dados comportamentais, revelaram como as táticas de acasalamento e dispersão influenciam a estrutura populacional nesta espécie.

Reinartz *et al*. (2000) verificaram o grau de polimorfismo de bonobos (*Pan paniscus*) e qual a extensão da sua variação genética em relação aos chimpanzés (*Pan troglodytes*). Análises de vários *loci* polimórficos demonstraram que os bonobos não compreendem uma espécie geneticamente depauperada. Em nível nuclear, esta espécie exibe níveis de diversidade

genética comparável à diversidade de comunidades e possivelmente subespécies de chimpanzés.

Seqüências de DNA mitocondrial e marcadores nucleares microssatélites também foram utilizados para verificar a existência de barreiras ainda não documentadas para o fluxo gênico entre populações de chimpanzés (Gagneux *et al*., 2001). Estes estudos identificaram que pelo menos uma população é geneticamente distinta suficientemente para ser classificada como uma nova subespécie.

Os marcadores microssatélites também têm sido utilizados para examinar a variabilidade genética de subpopulações isoladas em fragmentos de florestas para obtenção de dados sobre a fragmentação do habitat. No estudo de populações de *Macaca sylvanus* estes marcadores mostraram que a dispersão é limitada mesmo entre alguns grupos sociais dentro de um único fragmento (Segesser *et al*., 1999).

Até agora, somente um trabalho foi realizado utilizando marcadores moleculares microssatélites em primatas do Novo Mundo. Em estudos com o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), quatro populações recentemente isoladas por fragmentação do habitat foram analisadas quanto à sua diversidade e diferenciação genética (Grativol *et al*., 2001). Os resultados utilizando quatro *loci* microssatélites sugerem que a perda na diversidade alélica foi mais rápida do que a perda na heterozigosidade. Esta perda na diversidade pode causar sérios problemas para espécies ameaçadas como o endocruzamento. O efeito da perda da heterozigosidade sobre o risco de extinção é mais profundo em populações pequenas e isoladas. Até mesmo em um nível intermediário de isolamento o risco de extinção aumenta

dramaticamente com o decréscimo da heterozigosidade nas menores populações. Isso acontece porque o isolamento de pequenas subpopulações entre si gera barreiras de fluxo gênico onde a migração é excluída. Desse modo, o aumento na taxa de perda de alelos e o decréscimo na média individual da heterozigosidade em relação à população como um todo, são fatores esperados a ocorrer, eventualmente, em pequenas subpopulações isoladas, devido à combinação de deriva genética e acumulação de endocruzamento (Saccheri *et al*., 1998). Tal perda alélica é prejudicial para espécies ameaçadas de extinção, porque o resultado será um confinamento sobre o potencial adaptativo (Frankham & Ralls, 1998). Embora os fatores ambientais e demográficos sejam os preferidos como determinantes de risco de extinção, a contribuição dos estudos sobre endocruzamento não deve ser subestimada, principalmente em espécies com estrutura populacional bastante fragmentada.

A conservação da diversidade genética é fundamental para as mudanças evolutivas dentro das populações, as quais permitem as populações evoluírem em resposta às mudanças ambientais (Frankel & Soulé, 1981). A variabilidade genética é um dos importantes parâmetros da biodiversidade que a IUCN tem recomendado para a conservação (McNeely *et al*., 1990). Desta forma é importante conhecer e conservar a diversidade genética porque sua perda pode levar a um aumento do risco de extinção diminuindo o potencial para adaptações futuras (Ellstrand & Elam, 1993).

Devido às altas taxas de substituições nucleotídicas, os microssatélites poderão nos dar um melhor diagnóstico dos níveis de variabilidade genética

das populações de *Saguinus bicolor* da região de Manaus, o que é extremamente importante para uma espécie ameaçada de extinção.

1.3 – Fragmentação do habitat de *Saguinus bicolor*

Saguinus bicolor é o primata amazônico mais ameaçado e menos estudado, apesar de ocorrer em áreas verdes dentro da cidade de Manaus. Trabalhos sobre área de vida, ecologia e comportamento restringem-se aos realizados por Egler (1986, 1991a, 1991b, 1992, 1993) e Vidal (2004). Os demais artigos existentes sobre a espécie referem-se principalmente à distribuição geográfica, sugerindo que *S. bicolor* está altamente ameaçado de extinção, por ter sua distribuição restrita à região de Manaus e que vem sendo reduzida nos últimos anos, se concentrando cada vez mais no pólo de desenvolvimento da cidade (Ayres *et al.*, 1980a, 1982b; Subirá, 1998).

Um aspecto relevante é o fato da imagem desta espécie estar fortemente atrelada às áreas verdes da cidade de Manaus, reforçada pelas campanhas de educação ambiental veiculadas em 1992 e 1999. Por esse motivo, as atividades que venham estimular a conservação desta espécie estarão promovendo, também, a conservação das áreas verdes existentes na cidade e nos arredores de Manaus, aumentando a qualidade de vida na capital Amazonense, cujo crescimento vem sendo acelerado e desordenado. Espécies que possuem distribuição geográfica restrita como *Saguinus bicolor,* precisam de cuidados urgentes e da implementação de unidades de conservação.

Desta forma, é importante conhecer e conservar a diversidade genética das populações de sauins destes fragmentos porque sua perda pode levar a um aumento do risco de extinção diminuindo o potencial para adaptações

futuras. O presente trabalho reporta o estudo da genética das populações remanescentes de sauins nos fragmentos florestais de Manaus os quais foram: fragmento da UFAM (existente há ±15 anos), fragmento do SESI (existente há ±12 anos), e fragmento da Cidade Nova (existente há ±5-6 anos). Historicamente todos esses fragmentos eram conectados e acredita-se que a população do SESI foi exterminada durante a fragmentação sendo posteriormente repovoada por alguns indivíduos provenientes do fragmento da UFAM (Marcelo Gordo, comunicação pessoal). Indivíduos provenientes da população da área da Reserva Adolfo Ducke foram também amostrados funcionando como um grupo controle sobre o efeito da fragmentação urbana.

Apesar da grande ameaça causada pelo crescimento urbano da cidade de Manaus é importante o estudo de várias áreas da biologia deste animal, donde os resultados virão subsidiar planos de conservação para esta espécie. Portanto, estudos genéticos dos grupos de sauins são imprescindíveis para a sua conservação. Considerando as condições ecológicas desta espécie e as informações obtidas de estudos em outras espécies, formulamos as seguintes hipóteses de trabalho:

Ho: As populações de sauim-de-coleira nos fragmentos de floresta da cidade de Manaus não apresentam pouca variabilidade genética, e não são geneticamente diferenciadas não apresentando nenhum indício que efeito da fragmentação (recente redução no tamanho da população);

H_1: As populações de sauim-de-coleira nos fragmentos de floresta da cidade de Manaus apresentam pouca variabilidade genética, e não são geneticamente diferenciadas;

H_2: As populações de sauim-de-coleira nos fragmentos de floresta da

cidade de Manaus apresentam pouca variabilidade genética, são geneticamente diferenciadas e apresentam significante efeito de uma recente redução do tamanho causada pela fragmentação urbana;

2. Objetivos

2.1 – Geral

- Fornecer informações genéticas das populações de *S. Bicolor* que poderão ser utilizadas na elaboração de futuras estratégias de manejo e conservação da espécie.

2.2 – Específicos

- Estimar os níveis de variabilidade genética das populações de sauins-de-coleira dentro do perímetro urbano de Manaus e dentro dos fragmentos florestais remanescentes, através da utilização de marcadores nucleares repetitivos - microssatélites;
- Avaliar a variabilidade genética intra e interpopulacional de *S. Bicolor*;
- Verificar a existência de estrutura populacional como um efeito da fragmentação da floresta;
- Verificar se as populações dos fragmentos apresentam indícios dos efeitos de uma recente redução no tamanho populacional.

3. Material e Métodos

3.1 – Obtenção das amostras

Amostras de pêlo e pele foram coletadas durante a marcação individual, ou de grupos de *S. Bicolor* no campo obtidas em colaboração com o *Projeto Sauim-de-Coleira*, coordenado pelo pesquisador Marcelo Gordo. Foram utilizadas amostras de populações das seguintes localidades: fragmento do Campus da Universidade Federal do Amazonas/UFAM (N= 59), fragmento do bairro Cidade Nova (N=12), fragmento do SESI (Serviço Social da Indústria) (N=11) e Reserva Florestal Adolfo Ducke (N= 13) (fig. 02). Também foram utilizadas amostras de animais mortos por atropelamento (ou outras causas) no campus da UFAM, depositados no Laboratório de Ecologia I da Universidade Federal do Amazonas. Essas amostras foram mantidas em álcool e congeladas até a extração. Considerando tratar-se de uma espécie criticamente ameaçada, nenhum indivíduo foi sacrificado. Para a coleta das amostras e marcação, os animais foram anestesiados por um técnico qualificado.

Figura 02. Locais de coleta do presente estudo.

3.2 – Extração de DNA

O processo de extração de DNA foi realizado segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al*. (1989). As amostras de pêlo ou pele foram colocadas em microtubos tipo eppendorf a fim de serem digeridas em uma solução contendo:

- 500 ml de tampão STE;
- 15 µL de Proteinase K 1% ;
- 75 uL de SDS 10%.

Os tubos foram acondicionados em estufa a 37ºC até que o tecido estivesse totalmente dissolvido. Após a digestão, foram adicionados 600 µL de fenol hidratado aos tubos com tecido, agitado levemente por 5 minutos e centrifugado a 3000g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com uma micropipeta e adicionado a um tubo limpo a fim de repetir o mesmo processo.

Após a lavagem com fenol, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 500 µL da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), agitado levemente por 5 minutos e centrifugado a 3000 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi retirado com uma micropipeta e adicionado a um tubo limpo a fim de repetir o mesmo processo. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 500 µL da solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitado levemente por 5 minutos e centrifugado a 3000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com uma micropipeta e adicionado a um tubo limpo a fim de repetir o mesmo processo.

Após as sucessivas lavagens, o sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo juntamente com 1mL de etanol 100% e mantido a -20ºC por 12 horas. Posteriormente o tubo foi centrifugado a 14000 g por 30 minutos e lavado com etanol 70%. Após a secagem do DNA, o mesmo foi ressuspenso em 200 µL de água deionizada.

O DNA total das amostras de pêlo foi extraído utilizando o kit de extração de DNA QIAGEN de acordo com o protocolo do fabricante. Para a quantificação do DNA extraído, aplicou-se o mesmo em gel de agarose 0.8%, corado com brometo de etídio. Após a migração do DNA, o gel foi colocado em um transiluminador de UV e fotografado. Para a amplificação, o DNA foi diluído entre 10-100ng/µL.

3.3 – Amplificação *in vitro* do DNA

O DNA nuclear de cada indivíduo foi amplificado usando a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de genotipagem segundo o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000), onde se adiciona uma cauda M13(-21) a um dos *primers* (tab. 01), e marca-se somente este *primer* com a fluorescência desejada (FAM). A quantidade de *primer forward* deve ser menos da metade do *primer reverse*. As condições de termociclagem foram programadas de modo que nos primeiros ciclos o *primer forward* com sua seqüência M13(-21) fosse incorporado no produto da PCR. Quando o *primer forward* fosse totalmente usado ao final dos primeiros ciclos, a temperatura de anelamento seria reduzida para facilitar o anelamento do *primer* universal M13(-21). Dessa maneira, o *primer* universal marcado com a fluorescência

M13(-21) agiria como o *primer forward* incorporando a fluorescência no produto de PCR (fig. 03).

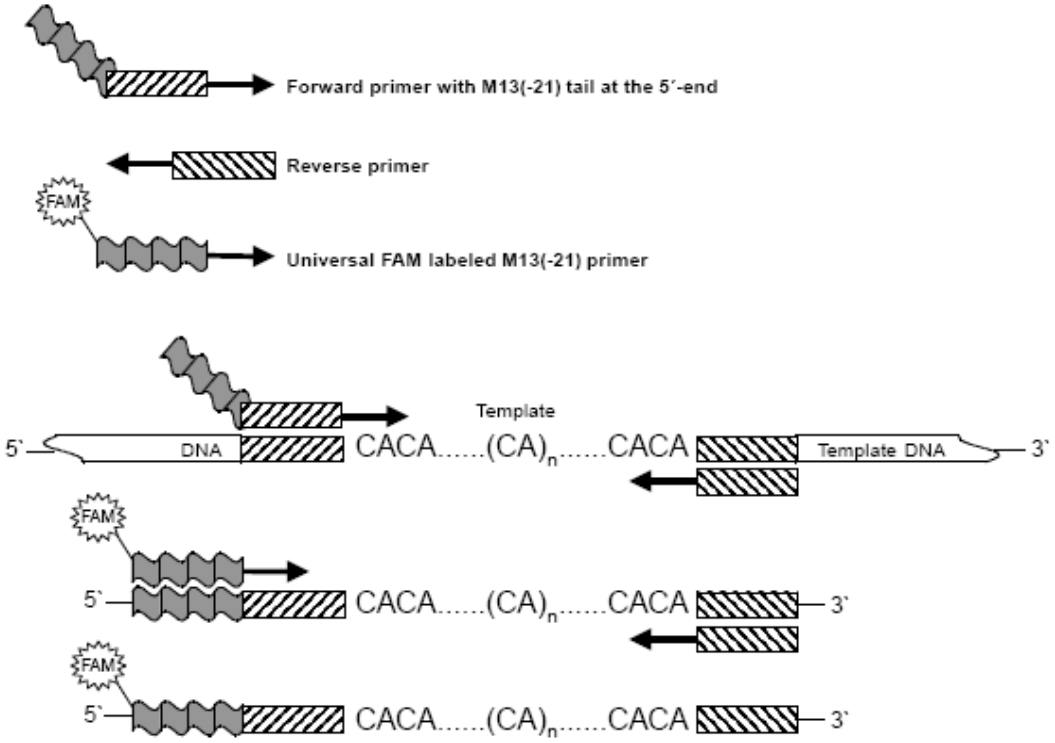

Figura 03. Esquema gráfico do protocolo econômico de marcação de fragmentos de PCR com fluorescência. Adaptado de Schuelke (2000).

Os *primers* (nove pares) utilizados para amplificar as regiões microssatélites dos indivíduos amostrados foram os mesmos desenvolvidos por Böhle & Zischler (2002) em *Saguinus mistax*. Isso se deve ao fato destes *primers* terem sido bastante polimórficos em outras espécies de calitriquídeos inclusive *S. bicolor*. Todas as amplificações via PCR foram ajustadas para um volume total de 10 µL contendo:

- 4,4 µL de Água MilliQ;
- 0,8 µL de $MgCl_2$ (25µL);
- 0,7 µL de dNTP (2,5 µL);
- 1 µL de Tris-HCL (?);

- 0,5 µL do *primer* forward M13 (2 pmol/µL);
- 0,5 µL do *primer* M13 (2 pmol/µL);
- 1 µL do *primer reverse* (2 pmol/µL)*;*
- 0,1 µL de Taq polimerase (5 unidades/ µL);
- 1,0 µL de DNA (~50 ng).

As placas contendo as reações foram colocadas em um termociclador (Thermo Hybaid) com as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 94 ºC por 2 minutos seguida por 25 ciclos a 94 ºC por 10 minutos, 55 ºC por 10 minutos e 72 ºC por 30 minutos. Em seguida 10 ciclos a 94 ºC por 10 minutos, 50 ºC por 10 minutos e 72 ºC por 30 minutos com uma extensão final a 72 ºC por 30 minutos. Em seguida, o produto da PCR foi diluído (20X) e adicionado a um mix contendo o marcador de tamanho conhecido ET-400 (Amershan Bioscience) e Tween 20 (0,1%). Posteriormente, o mix para genotipagem foi analisado em seqüenciador automático MegaBACE1000, com utilização de software específico para genotipagem (MegaBACE *Fragment Profiler*).

Tabela 01. Microssatélites utilizados na genotipagem de *S. bicolor.* As seqüências iniciais dos *primers* correspondem à seqüência do *primer* M13.

Micro	***Locus***	**Repetição**	**Seqüência do *primer***
Mic1	SB2	$(CA)_{18}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtATCCATCTCTCTGTGCTC R:CAATTTGTTCCATGTTGATG
Mic2	SB7	$(CA)_{23}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtTAAGTGTCATAGAAGGAGAT R:GGAGATATTCACCCTGTATT
Mic3	SB8	$(CA)_{22}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtAGAAACAAGCAGGAAATAAA R:ATTACTTCAAACTAAAAAGC
Mic4	SB19	$(AG)_{11}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtGTGGTAGGAACAAGTAAAG R:GTCAGGTGGGCTGTATG
Mic5	SB24	$(AG)_{11}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtATCTGCCTATCACTTCTTTC R:CATTTGCTCTGCTCATTCA
Mic6	SB30	$(CA)_9$–AT-$(CA)_{11}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtTAAAGTTAAGATTGGATTTCAC R:GCAGAAAAACCTAACAATACA
Mic7	SB31	(CA)11	F:5'-tgaaaaacgacggccagtTACCCGTACAGGATGCCAT R:GGTGCTAACGCTTTTGGTT
Mic8	SB37	$(CA)_{14}$-$(AG)_{17}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtCACGAGAACACAAAGACAAA R:GAAAAACCTACCACCACTCT

Mic9	SB38	$(CA)_{19}$	F:5'-tgaaaaacgacggccagtGCCTCAATGGGTTTTAACC R:AGAACGAGTCTGTATCTTGA

3.4 – Análise das Genotipagens

As genotipagens das amostras foram analisadas utilizando o programa MegaBACE *Fragment Profiler*, para que fossem identificados os genótipos de cada *locus* para os indivíduos amostrados (fig. 04). Em seguida, uma matriz foi construída com as informações dos genótipos dos indivíduos de *S. bicolor* para que fossem feitas as análises estatísticas para as populações amostradas. O banco de dados obtido das análises das genotipagens foi organizado construindo-se uma matriz de dados composta pelo número de repetição para cada alelo de cada microssatélite por indivíduo e por cada população (Anexo 01).

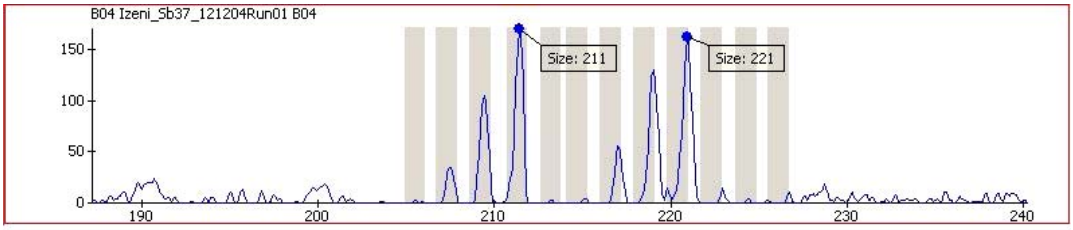

Figura 04: Análise de uma amostra de *S. bicolor* no Programa Fragment Profiler.

3.5 – Análises Estatísticas Populacionais

Estimativas de subdivisão da população foram obtidas para os sistemas estudados através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al*., 1992) aplicando-se o F_{ST} de Wright (1969), o qual descreve a quantidade de diferenciação e fluxo gênico entre as populações (Neigel, 2002). A Análise de Variância Molecular é baseada sobre análises de variação de

freqüência gênica, mas levando em conta o número de mutações entre os alelos. Após a definição dos grupos de populações, o usuário define uma estrutura genética que será testada. Uma análise hierárquica de variação divide a variação total em componentes covariantes devido a diferenças intraindividuais, interindividuais e/ou diferenças inter-populacionais. No presente trabalho, optou-se em analisar os dados usando-se o F_{ST} de Wright (Wright, 1969) ao invés do R_{ST} de Slatkins (Slatkin, 1995), uma vez que a variância das diferenciações do R_{ST} tende a ser muito maior do que a variância do F_{ST} quando menos de 20 *loci* são analisados (Gaggiotti *et al*., 1999), como é o caso do presente estudo.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) é uma condição genética ideal caracterizada pela união aleatória de alelos de um locus neutro de uma população infinitamente grande. Testes de EHW podem resultar numa melhor visão de seleção, exocruzamento, endocruzamento, alelos nulos (que causa excesso de homozigotos devido a alelos não detectados) e efeito de Wahlund (excesso de homozigotos devido à união de populações geneticamente subdivididas). Para populações que não estão sobre o EHW, a estrutura populacional total pode ser subestimada, se os alelos que são genotipados estiverem sobre seleção estabilizadora, ou superestimada se estes alelos estiverem sobre seleção diversificante. O método da Cadeia de Markov foi usado para fornecer uma estimativa imparcial da probabilidade do EHW dos alelos microssatélites em cada população. Desta forma, variações no tamanho dos *loci* microssatélites foram determinadas através da freqüência de heterozigotos (observada e esperada) e testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e divergência na freqüência alélica e

genotípica entre as populações, análises estas implementadas no programa ARLEQUIN (Schneider *et al*., 2000).

Todos os parâmetros de estimativa da variabilidade genética e as medidas estatísticas de genética populacional também foram feitos através das análises das freqüências e distribuição dos alelos de cada *locus* microssatélite com o programa ARLEQUIN (Schneider *et al.,* 2000). As análises dos resultados permitiram o estabelecimento da variabilidade e distância genética intraespecífica dos indivíduos das diferentes localidades, permitindo a determinação do grau de diferenciação genética entre eles e dos níveis de variabilidade genética nas populações. A correlação entre a distância genética e geográfica foi realizada pelo teste de Mantel (1967), também implementada no programa ARLEQUIN. A significância dos resultados foi avaliada por testes de permutação (3000 replicações) e todos os níveis de significância para os testes envolvendo comparações múltiplas foram ajustados seguindo a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

3.6 – Teste de Recente Redução no Tamanho Populacional

Populações que tenham experimentado uma recente redução no tamanho efetivo populacional exibem uma redução do número de alelos e da heterozigosidade. O número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade esperada (Yu *et al.,* 1999). Desse modo, a heterozigosidade esperada (Yu *et al.,*1999) torna-se maior do que a heterozigosidade esperada em uma população em equilíbrio (H_{EQ}) porque a mesma é calculada a partir do número de alelos. Tanto a heterozigosidade esperada (Yu *et al.,* 1999) quanto a

heterozigosidade esperada em uma população em equilíbrio (H_{EQ}) refere-se a heterozigosidade no sentido de diversidade gênica descrito por Nei (1987).

Para verificar se houve redução no tamanho populacional efetivo dos grupos de sauins utilizamos dois Programas, o Programa BOTTLENECK (Piry *et al.,* 1999) e o Programa *"M value"* (Garza & Williamson, 2001). Ambos os programas identificam populações que tenham sofrido uma recente redução no tamanho efetivo populacional (N_e) ou efeito "gargalo de garrafa" (*Bottleneck*) via a presença de um excesso de heterozigosidade (testado no Programa BOTTLENECK) ou via redução no número de alelos (testado no Programa *"M value"*). Considerando que o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade o teste do *"M value"* é considerado mais sensível a reduções no tamanho populacional que tenham ocorrido mais recentemente.

A rigor, o excesso de heterozigosidade (ou deficiência) tem sido demonstrado apenas para *loci* que evoluem sobre o modelo dos alelos infinitos (IAM; Kimura & Crow, 1964) por Maruyama e Fuerst (1985). Se o *locus* evolui sobre o modelo mutacional gradual (*stepwise mutation model* - SMM; Ohta & Kimura 1973), podem surgir situações onde este excesso de heterozigosidade não seja observado (Cornuet & Luikart, 1996). No entanto, poucos *loci* seguem o modelo de mutação gradual estrito e quanto mais rápido os loci afastam-se ligeiramente do modelo de mutação gradual através do modelo dos alelos infinitos eles mostrarão um excesso de heterozigosidade como uma conseqüência de um "*bottleneck*" (gargalo de garrafa) genético. Quando utilizados para testes de redução populacional, o programa BOTTLENECK usa tanto o modelo de mutação gradual quanto o modelo dos alelos infinitos independentemente porque eles representam dois modelos extremos de

mutação ao longo de vários modelos possíveis (Chakrabort & Jin, 1992). Entretanto, para a maioria dos microssatélites, o modelo de duas fases (*Two-Phase Mutation Model* - TPM) seria aparentemente mais apropriado, uma vez que incorpora o modelo de mutação gradual (SMM), mas permite uma variação maior na magnitude das mutações, assumindo que certa fração das mutações ocorre através de múltiplas unidades de repetição (Di Rienzo *et al*., 1994). Na presente análise testamos para a redução no tamanho populacional utilizando todos os três modelos mutacionais no Programa BOTTLENECK. As probabilidades obtidas pelo programa BOTTLENECK baseadas no excesso de heterozigosidade foram derivadas do Teste de Wilconxon (Wilcoxon sign-rank test) (Luikart *et al*., 1997). O teste Wilcoxon fornece um poder relativamente alto para análises que utilizam poucos *loci*.

As análises realizadas no Programa *"M value"* (Garza & Williamson, 2001) basearam-se no simples cálculo da taxa do número total de alelos *k*, e na variação no tamanho dos alelos *r*, onde $r = S_{max} - S_{min} + 1$ (S_{max} é o tamanho do maior alelo; S_{min} é o tamanho do menor alelo na amostra). A perda de qualquer alelo contribuirá para a redução em *k*, enquanto que a perda do maior ou menor alelo contribuirá para a redução de *r*; desta forma, espera-se que *k* seja reduzido mais rapidamente do que *r* em uma população em vias de diminuição no tamanho populacional. Assim, espera-se que a taxa $M=k/r$ seja menor em populações que sofreram recente redução no tamanho populacional. Garza e Williamson (Garza & Williamson, 2001) observaram que taxas de *M* menores ou iguais a 0,70 ocorrem em populações que sofreram uma redução no tamanho populacional. O fato de *M* declinar em populações que sofreram redução populacional independe de modelos mutacionais dos microssatélites

(Garza & Williamson, 2001). As análises para a determinação do Valor de *M* para todas as populações amostradas foram realizadas no Programa *"M value"* (Garza & Williamson, 2001).

Desvios significantes, resultantes de redução populacional, por exemplo, são importantes de serem detectados porque o equilíbrio populacional é uma condição importante para várias análises de dados genéticos de populações. A redução no tamanho populacional é importante para a biologia da conservação (principalmente de espécies ameaçadas) porque isso pode aumentar o risco de extinção populacional.

4. Resultados

4.1 – Caracterização dos microssatélites

Os resultados obtidos das análises, considerando as quatro populações em separado e como um todo, foram significantemente semelhantes. Nove *loci* polimórficos para *Saguinus mystax*, desenvolvidos por Bohle & Zischler (2002), foram usados para as análises populacionais de um total de 95 indivíduos de sauins oriundos de três fragmentos florestais e da Reserva Ducke. Um *locus* (SB19) foi considerado monomórfico para a população da Cidade Nova após a análise de polimorfismo. Desta forma, nove *loci* polimórficos, variando de 3 a 22 alelos, foram usados para a análise populacional e um total de 95 indivíduos foram genotipados para estes *loci*.

4.2 – Polimorfismo e Freqüências Alélicas

A genotipagem de um total de 95 amostras de quatro localidades revelou que os nove *locus* microssatélites são polimórficos para *S. bicolor*. O *locus* SB19 foi monomórfico para a população da Cidade Nova. Na maioria dos casos, os oito *loci* restantes mostraram considerável grau de polimorfismo. O número total de alelos detectados por *locus* polimórfico para todas as amostras de sauins variou de 3 (SB2 e SB19) a 22 alelos (SB24) (tab. 01). O número médio de alelos por lócus por população (diversidade alélica observada) variou de 3,4 (população do SESI) a 6,7 (população da UFAM) (tab. 02).

Tabela 02. Características de 09 *loci* microssatélites de *S. bicolor.*

Locus	**Tipo de repetição**	**Fragmento em pares de bases**	**Nº. de alelos**	H_O	H_E
SB2	(CA)17	214 - 220	3	0,761	0,615
SB7	(CA)23	129-141	8	0,405	0,663
SB8	(GT)22	113-229	17	0,735	0,852
SB19	(AG)11	197-201	3	0,064	0,127
SB24	(GT)23	113-163	22	0,726	0,812
SB30	(TG)23	113-127	6	0,729	0,642
SB31	(GT)10	172-190	5	0,593	0,519
SB37	(TG)17-A-(GA)13	187-207	11	0,586	0,736
SB38	(GT)19	137-149	9	0,811	0,748

Tabela 03. Heterozigosidade Observada e Esperada por *locus* por população. N: Número de alelos; H_O: Heterozigosidade Observada; H_e: Heterozigosidade Esperada.

		SB2	SB7	SB8	SB19	SB24	SB30	SB31	SB37	SB38
UFAM										
	Alelos	3	8	12	2	18	5	4	9	8
	H_O	0,648	0,432	0,783	0,027	0,729	0,567	0,729	0,594	0,837
	H_E	0,592	0,783	0,894	0,053	0,887	0,576	0,534	0,757	0,804
	P	0,47	<0,001	<0,001	1	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	0,011
RDUCKE										
	N	3	6	7	2	7	3	3	7	5
	H_O	0,846	0,384	0,846	0,076	0,692	0,615	0,615	0,461	0,846
	H_E	0,649	0,876	0,803	0,150	0,855	0,636	0,544	0,735	0,590
	P	0,034	<0,001	0,011	1	<0,001	0,144	0,117	0,021	0,323
CNOVA										
	N	3	2	7	1	10	6	3	7	8
	H_O	0,916	0,166	0,583	mono	0,666	0,916	0,666	0,833	0,750
	H_E	0,681	0,471	0,847	mono	0,869	0,789	0,612	0,793	0,851
	P	0,011	0,007	<0,001	-	<0,001	0,002	0,010	0,004	0,006
SESI										
	N	2	2	9	2	3	3	2	3	5
	H_O	0,636	0,636	0,727	0,090	0,818	0,818	0,363	0,454	1,000
	H_E	0,541	0,523	0,865	0,177	0,636	0,567	0,385	0,658	0,748
	P	0,016	0,017	<0,001	<0,001	0,011	0,009	<0,001	0,009	0,007
Todas										
	N	3	8	17	3	22	6	5	11	9
	H_O	0,715	0,368	0,757	0,031	0,715	0,621	0,631	0,621	0,842
	H_E	0,619	0,741	0,885	0,041	0,890	0,614	0,495	0,734	0,821
	P	0,23	<0,001	<0,001	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

4.3 – Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e Desequilíbrio de Ligação

A heterozigosidade média observada sobre todos os *loci* para cada população variou de 0,59 (população da Reserva Ducke) a 0,68 (população da

Cidade Nova). Com exceção da Reserva Ducke, as populações apresentaram vários *loci* em desequilíbrio populacional antes e após a Correção de Bonferroni (P=0,005 e P=0,001, respectivamente). Os índices de diversidade gênica variaram de 0,544 ± 0,30 (SESI) a 0,647 ± 0,34 (UFAM). A diferença entre os pares variou de 4,896 ± 2,48 (SESI) a 5,831 ± 2,81 (UFAM). A população da UFAM apresentou maior diversidade (0,647 ± 0,34) dentre todas as populações analisadas. A população do SESI foi a que apresentou menor diversidade genética (0,544 ± 0,30).

Tabela 04. Características dos *loci* microssatélites das populações de saguins.

População	**N**	**Diversidade Gênica**	**Diferenças entre os pares**	**Nº de Alelos**	**HWE Ho - He**	***Locus* Monomórfico**
UFAM	59	0,647 ± 0,34	5,831 ± 2,81	6,7	0,59 – 0,65	Sb19
R. Ducke	13	0,616 ± 0,34	5,547 ± 2,75	4,7	0,59 – 0,64	Sb19
C. Nova	12	0,638 ± 0,35	5,750 ± 2,85	5,2	0,68 – 0,73	Sb19
SESI	11	0,544 ± 0,30	4,896 ± 2,48	3,4	0,61 – 0,56	Sb19
Todas	95	0,647 ± 0,34	5,825 ± 2,79	9,3	0,58 – 0,64	-

Os testes conduzidos para as análises de desequilíbrio de ligação (associação não ao acaso dos alelos entre os *loci* de microssatélites) realizados no programa ARLEQUIN evidenciaram resultados significantes entre todos os pares de comparações, onde a população da UFAM apresentou desequilíbrio genético em 28% das comparações; Reserva Ducke, 25%; Cidade Nova, 2,7% e SESI, 16%. Todas após a Correção de Bonferroni (P< 0,001).

4.4 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) e Diferenciação Populacional

Os índices de variação inter e intra-populacional (va e vb, respectivamente) mostraram que 5,86% da variância total ocorrem entre as populações e 94,14% ocorre dentro das populações (tab. 04). Os resultados de AMOVA evidenciaram que existe estrutura de população (F_{ST} =0,05855, P<0,001)

Tabela 05. Análise de Variância Molecular para as populações de saiuns.

Tipo de Variação	Componentes de Variação	
	V	%
Entre populações	0,17507 va	5,86
Dentro das populações	2.81492 vb	94.14
Fst	0,05855	P<0,001

Os valores de F_{ST} foram significantes para quase todas as comparações de populações (tab. 05) contrastando com os altos valores de *Nm* (número de migrantes por geração) observado entre as populações.

Tabela 06. Valores de *Nm* (abaixo) e F_{ST} (acima). Os valores com * indicam que foram significativos após a correção de Bonferroni (P<0,008).

	UFAM	RDUCKE	CNOVA	SESI
UFAM	•	0.02876	0.04698	0.08526*
RDUCKE	17.38548	•	0.07732*	0.09648*
CNOVA	10.64376	6.46696	•	0.11470*
SESI	5.86415	5.18241	4.35910	•

Os resultados obtidos pelo Teste de Mantel não indicaram nenhuma correlação entre a distância genética e a distância geográfica das populações (Coeficiente de correlação= 0,6339; *P*=0,16).

4.5 – Análises para Redução de Tamanho Populacional – BOTTLENECK e *"M value"*

Os resultados obtidos para as análises que testam para uma recente redução no tamanho efetivo populacional (efeito "bottleneck") podem ser visualizados na tabela 5. Os testes não detectaram nenhum excesso (ou deficiência) da Heterozigosidade para os testes realizados pelo Programa BOTTLENECK. Entretanto, as análises utilizando o parâmetro *M* (Programa *"M value"*) indicaram que duas das quatro populações dos fragmentos apresentaram significante "bottleneck" genético: UFAM e SESI. O fragmento da Cidade Nova apesar de não ser significante após a correção para comparações múltiplas (foi próximo ao nível de significância (*P*= 0,046). A população da Reserva Adolfo Ducke não foi significativamente afetada pela fragmentação. As populações de sauim-de-coleira, quando agrupadas e consideradas como uma única população, também evidenciaram efeitos de "bottleneck" genético antes da correção de Bonferroni (*P*<0,05).

Tabela 07. Comparações dos testes para redução do tamanho populacional. Nota: Os valores de *"M value"* representam a taxa do número de alelos pela amplitude no tamanho dos alelos, e as probabilidades são baseadas sobre simulações paramétricas. As probabilidades obtidas pelo programa Bottleneck são baseadas no excesso de heterozigosidade derivadas do Teste de Wilconxon para o equilíbrio de mutação ao acaso. Tais probabilidades são calculadas sobre os modelos de IAM, SMM e TPM de evolução molecular dos microssatélites. Nível de significância após a correção de Bonferroni *P*=0,01 identificados por um *.

População	IAM (Wilcoxon)	SMM (Wilcoxon)	TPM (Wilcoxon)	*"M value"* (Valor de *P*)
UFAM	0,20313	0,02734	0,04883	0,723 (0,016)*
RDUCKE	0,42578	0,30078	0,30078	0,707 (0,055)
CNOVA	0,31250	0,25000	0,31250	0,707 (0,046)
SESI	0,35938	0,49609	0,35938	0,578 (>0,001)*
Todas	0,25000	0,01953	0,12891	0,775 (0,039)

5. Discussão

5.1 – Mudanças na Freqüência Alélica e Índices de Diversidade Genética

Os resultados das análises aqui apresentadas indicaram que os níveis de diversidade genética dos grupos de sauins dos fragmentos florestais foram considerados bons para esta espécie com níveis de heterozigosidade observada (H_O) variando de 0,59 (Reserva Ducke) a 0,68 (Cidade Nova), além de um número considerável de alelos encontrados para cada microssatélite por população (3,4 a 6,7). Tais resultados estão dentro da média encontrada em outras espécies de calitriquídeos os quais naturalmente mostram uma baixa variabilidade genética. Um estudo semelhante ao presente trabalho foi realizado utilizando-se marcadores microssatélites para populações remanescentes de mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) e mostraram uma H_O semelhante ao observado em *S. bicolor*, a qual foi de 0,34 a 0,65 (Grativol *et al*., 2001). Os autores deste estudo sugerem que tais valores podem estar relacionados ao fato destas espécies de primatas produzirem gêmeos fraternos. Além disso, outros estudos sugerem troca de células sanguíneas entre os gêmeos dizigóticos resultando em um quimerismo hematopoiético (Pope, 1996; Benirschke *et al*., 1962) que pode também contribuir para os níveis de variabilidade genética observados nestas espécies. A evidência de três alelos em gêmeos fraternos é uma comprovação desse quimerismo, entretanto essa característica não foi observada nos nove *loci* de microssatélites analisados em *S. bicolor*.

A população de Sauins do fragmento da UFAM apresentou um grande número de alelos em comparação as outras localidades provavelmente devido ao tamanho amostral (59 indivíduos) que foi maior do que as outras populações

analisadas. No entanto, esta diferença detectada poderia ser artefato de amostragem em comparação com as outras populações. Para testarmos esta diferença um novo banco de dados foi organizado para a população da UFAM, onde os indivíduos coletados na década de 90 (coletas realizadas entre os anos de 1993 a 1999 sendo a maioria proveniente de indivíduos mortos por atropelamento) foram excluídos das análises (16 indivíduos excluídos). Após a exclusão a população da UFAM totalizou 43 indivíduos para as análises que incluíram os indivíduos amostrados durante o ano de 2000 a 2004 (indivíduos atualmente marcados para coleta de dados ecológicos). Os resultados gerais (resultados não mostrados) utilizando este novo banco de dados evidenciaram que além da população da Cidade Nova a população da UFAM também se tornou monomórfica para o loco SB19, evidenciando que ocorreu uma perda alélica durante este período. Desta forma, a presença de um grande número de alelos obtidos na população da UFAM (banco de dados original), indicam que muitos deles podem ter sido provenientes de indivíduos que foram eliminados por atropelamentos, eletrocutamentos, caça (principalmente na Zona Leste da cidade), mordidos por cães, etc. Apesar disto, nossos resultados indicam que a diversidade genética das populações ainda não foi drasticamente reduzida, principalmente se comparada com a diversidade de outro macaco (*Leontopithecus rosalia*) criticamente ameaçado (Grativol *et al*., 2001).

5.2 – Fluxo Gênico e Estrutura de População

Os resultados de *Nm* evidenciaram um alto número de migrantes por geração entre as populações. Isso mostra que apesar da fragmentação os níveis de fluxo gênico foram altos antes dos eventos de fragmentação, uma vez que estes altos níveis ainda são observados nas populações atuais. Isso quer dizer que do ponto de vista genético eles ainda compartilham muitos alelos. Essa característica é importante para o manejo de populações ameaçadas. Entretanto, os valores de *Nm* foram contrastantes em relação aos valores de F_{ST} obtidos. Sabe-se que os valores de F_{ST} são inversamente proporcionais aos valores de *Nm*, ou seja, quanto maior o número de migrantes, os valores de F_{ST} serão menores indicando intenso fluxo gênico entre populações e ausência de estruturação populacional. Ao passo que, quando observado pequeno número de migrantes conclui-se estar ocorrendo pouco fluxo gênico. Os significantes valores das comparações de F_{ST} e a forte estrutura sugerida pelos resultados de AMOVA sugerem que as populações encontram-se geneticamente diferenciadas. Estes dados contraditórios podem ser provenientes de um artefato causado pelo desequilíbrio gênico observado nos valores do EHW e desequilíbrio de ligação, como efeito resultante da fragmentação das populações. Alguns trabalhos têm mostrado que subdivisões populacionais (estrutura de população) podem ser um artefato causado pelo efeito do “bottleneck” genético, uma vez que este causa mudanças nas taxas da variabilidade genética neutra aumentando a diferenciação entre as populações (Tajima, 1989). De uma maneira simplificada podemos dizer que as análises de F_{ST} são baseadas nas relações entre os alelos observados nas populações. Qualquer fator que leve ao excesso de alelos raros ou

desaparecimento de alelos pode levar a um artefato evidenciando diferenciação entre as populações, quando na verdade são eventos estocáticos atuando em populações que estão passando por uma redução no tamanho efetivo da população, tais como deriva genética.

5.3 – Fragmentação do Habitat e Efeito "Gargalo de Garrafa" (*Bottleneck*)

Os resultados utilizando-se as análises do programa BOTTLENECK não evidenciaram resultados significantes para a redução recente no tamanho populacional. Entretanto, as análises do programa *"M value"*, que é mais sensível a perdas populacionais mais recentes, evidenciaram significantes resultados. Os resultados das análises do programa *"M value"* que testam para uma recente redução no tamanho populacional evidenciaram que as populações de Sauim-de-coleira da região urbana de Manaus sofreram com os efeitos da fragmentação de seu habitat evidenciando "bottleneck" genético em algumas das populações remanescentes. A variação alélica foi perdida mais rapidamente do que a heterozigosidade devido aos efeitos da fragmentação. Resultados similares foram observados no mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) Grativol *et al,* (1998). Estes resultados são importantes já que em nossos estudos com sauins pudemos verificar que existe um desequilíbrio genético nas populações amostradas. Entretanto, a fragmentação recente do seu habitat faz com que a perda de diversidade alélica não seja significante ainda a ponto de causar uma erosão genética, uma vez que os níveis de diversidade gênica foram moderados.

De acordo com nossas análises as populações dos sauins-de-coleira estão sofrendo um desequilíbrio genético (“bottleneck” genético) o que pode ter sido conseqüência da recente fragmentação do habitat desta espécie.

Os efeitos da erosão genética sobre a viabilidade de pequenas populações que sofreram fragmentação do habitat são conhecidos em teoria. No entanto, os primeiros e mais críticos estágios do processo não têm sido documentados pela rapidez de suas alterações e dificuldade de monitoramento. Com a utilização de marcadores moleculares (microssatélites) é possível monitorar a erosão genética em populações recentemente fragmentadas. Com este objetivo Srikawan *et al*., (1996) estudaram alterações na viabilidade em populações de três pequenos mamíferos isolados em fragmentos florestais na Tailândia, após a criação de uma Usina Hidrelétrica. O levantamento dos animais marcados e recapturados entre cinco e oito anos após a fragmentação e as comparações com áreas não perturbadas mostrou que a fragmentação do habitat levou a um início de erosão genética nas populações remanescentes de três espécies: *Maxomys surifer*, *Chiropodomys gliroides* e *Tupaia glis*. As respostas genéticas e demográficas à fragmentação foram particulares a cada espécie, refletindo as diferenças na historia de vida e comportamento. Na espécie *C. gliroides*, a erosão genética precedeu o declínio demográfico.

Banks *et al*. (2005) observaram os impactos da fragmentação do habitat, devido à introdução de uma espécie vegetal, sobre a estrutura de parentesco e o sistema de acasalamento de um marsupial australiano (*Antechinus agilis*). Os resultados mostraram que não houve aumento dos acasalamentos aparentados das fêmeas das regiões fragmentadas

comparadas com as regiões não fragmentadas. Além disso, simulações populacionais indicam que apenas a dispersão (e não o acasalamento com indivíduos aparentados) contribui para o endocruzamento em cada habitat. Este resultado é muito importante para espécies ameaçadas de extinção e com análises futuras de demografia e paternidade para populações de sauins poderemos observar o comportamento social das espécies.

No presente estudo, a significante recente redução no tamanho populacional em alguns fragmentos foi relacionada com o tempo em que estas populações sofreram fragmentação de habitat. O fragmento da UFAM que existente há ±15 anos e o fragmento do SESI que existente há ±12 anos, evidenciaram significante “bottleneck” genético. O fragmento da Cidade Nova que existente há ±5-6 anos apresentou “bottleneck” genético significativo, mas somente antes da correção de Bonferroni; este fragmento é historicamente o mais recente, entretanto mesmo assim o fato de estar próximo de ser significante já torna-se um indício de que medidas de manejo e conservação devem ser consideradas. Historicamente todos esses fragmentos eram conectados e acredita-se que a população do SESI foi exterminada durante a fragmentação sendo posteriormente repovoada por alguns indivíduos provenientes do fragmento da UFAM tendo atualmente poucos grupos de sauins (Marcelo Gordo, comunicação pessoal). A Reserva Adolfo Ducke, por está conectada com uma floresta contínua, não foi significativamente afetada pela fragmentação, não evidenciando indícios de “bottleneck” genético.

5.4 – Implicações para a conservação

Sem dúvida o manejo de populações fragmentadas de animais e plantas têm se tornado um importante elemento da conservação biológica. Muitas das espécies reconhecidas atualmente como ameaçadas de extinção estão restritas a fragmentos de habitat e a tendência global através da exploração não-sustentável de recursos naturais significa que mais espécies estão sendo afetadas pela perda, degradação e fragmentação do habitat.

Alguns autores apontam para os diferentes usos da informação genética no estudo de populações fragmentadas (Hedrick & Miller, 1992; Frankham, 1995; Moritz, 1999; Burgman & Posingham, 2000). Primeiramente, pode ser usado pra identificar unidades de manejo por sua caracterização genética. Em segundo lugar, marcadores genéticos podem fornecer informações sobre a dinâmica de processos demográficos crípticos, como mostrado por Hedrick (2000) em seu trabalho com salmões e Clark (2000) no trabalho de estimativa de tamanho populacional de mariposas. Em terceiro lugar, está em determinar se os processos genéticos, inicialmente erosão genética e endocruzamento, na verdade exercem um papel significante na redução da viabilidade de pequenas populações fragmentadas sobre a influencia de ameaças externas.

Enquanto a erosão genética pode representar uma ameaça em longo prazo a muitas espécies sujeita a perda e fragmentação de habitat, o papel do endocruzamento e os efeitos associados de depressão por endocruzamento no aumento do risco da extinção em curto-prazo, de populações rapidamente fragmentadas, se torna evidente. O deslocamento em direção ao acasalamento entre parentes em pequenas populações de pica-paus identificados por Daniels

et al. (2000) e seus efeitos prejudiciais sobre a persistência populacional são apoiados por vários outros trabalhos (Frankham, 1995b; Dietz *et al*., 2000) incluindo pelo menos um trabalho com invertebrados realizado recentemente (Saccheri *et al*., 1998). A extensão da depressão por endocruzamento em populações selvagens tem sido amplamente discutida (Frankham, 1995). No entanto, uma análise recente de Crnokrak & Roff (1999) revelou que depressão por endocruzamento foi maior em populações selvagens do que em populações reproduzidas em cativeiro sendo que os níveis eram altos o suficiente para serem biologicamente importantes sob condições naturais. Estudos sobre os efeitos do endocruzamento (o qual é fortemente influenciado por estratégias de reprodução, comportamento social e redução da adaptabilidade) integrados a modelos de processos demográficos tornam-se poderosas ferramentas analíticas.

Até agora poucos estudos sobre a demografia das populações de sauins foram realizados (Egler, 1986, 1991a, 1991b, 1992, 1993; Vidal, 2004) e o presente trabalho é o primeiro a realizar análises genéticas das populações nos fragmentos de floresta. Os resultados por nós obtidos mostram que a genética também pode fornecer importantes informações sobre a biologia de sauins-de-coleira, já que os níveis de diversidade genética das populações dos fragmentos amostrados foram considerados moderados para esta espécie que nos últimos anos tem sofrido uma recente redução do tamanho populacional como efeito da fragmentação. Tais resultados evidenciando que as populações ainda compartilham muitos alelos são encorajadores para a realização de programas de conservação e manejo deste primata nos fragmentos de florestas da cidade de Manaus.

Programas de reintrodução e translocação de animais devem ser elaborados para se evitar futuras depressões genéticas nas populações que estão evidentemente em “bottleneck” genético. Além de evitar que outras populações comecem a sofrer os efeitos da fragmentação do habitat.

6. Referências Bibliográficas

Almeida, R.A.C. 1995. *Estudo das relações intergenéricas na subfamília Callitrichinae usando o intron 11 do gene do fator de von Willebrand*. Master’s thesis, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* Chapman & Hall, New York.

Ayres, J.M.; Mittermeier, R.A.; Constable, I.D. 1980. A distribuição geográfica e situação atual dos sagüis de cara nua (*Saguinus bicolor*). FBCN-Rio de Janeiro, 16:62-68.

Ayres, J.M.; Mittermeier, R.A.; Constable, I.D. 1982. Brazilian Tamarins on the way to extinction ?. *Oryx*, 16 (4): 329-333.

Banks, S.C.; Lindenmayer, D.B.; Ward, S.J; Taylor, A.C. 2005. The effects of habitat fragmentation via forestry plantation establishment on spatial genotypic structure in the small marsupial carnivore, *Antechinus agilis. Molecular Ecology,* 14:1667-1680.

Barroso, C.M.L.; Schneider, H.; Schneider, M.P.C.; Sampaio, I.; Harada, M.L.; Czelusniak, J.; Goodman, M. 1997. Update on the phylogenetic systematics of the New World monkeys: further DNA evidence for placing the pygmy marmoset (Cebuella) within the genus Callithrix. *International Journal of Primatology*, 18: 651-674.

Benirschke, K.; Anderson, J.M. Brownhill, L.E. 1962. Marrow chimerism in marmosets. *Science,* 138:513-515.

Bohle, U.H.; Zischler, H. 2002. Polymorphic microsatellite *loci* for the mustached tamarin (*Saguinus mystax*) and their cross-species amplification in other New World monkeys. *Molecular Ecology Notes*, 2: 1-3.

Burgman, M.; Possingham, H. 2000. Population viability analysis for consrvation: the good, the bad and the undescribe. Pp. 97-112. *In*: Young, A.G.; Clarke, G.M. (Eds). *Genetics, demography and viability of fragmented populations.* Cambridge University Press.

Clarke, G.M. 2000. Inferring demography from genetics: a case study of the endangered golden sun moth, *Synemon plana*. Pp. 213-225. *In*: Young, A.G.; Clarke, G.M. (Eds). *Genetics, demography and viability of fragmented populations.* Cambridge University Press.

Crnokrak, P.; Roff, D.A. 1999. Inbreeding depression in the wild. *Heredity,* 83:260-270.

Cropp, S.J; Larson, A.; Cheverud, J.M. 1999. Historical biogeography of tamarins, genus *Saguinus*: The molecular phylogenetic evidence. *American Journal Physical Anthropol*ogy, 108: 65-89.

Daniels, S.J.; Priddy, J.A.; Walters, J.R. 2000. Pp. 129-147. In: Young, A.G.; Clarke, G.M. (Eds), Genetics, demography and viability of fragmented populations, Cambridge University Press.

DeWoody, J.A.; DeWoody, Y.D.; Fiumera, A.; Avise, J.C. 2000. On the number of reproductives contributing to a half-sib progeny array. *Genetical Research*, 75: 95-105.

Dietz, J.M.; Baker, A.J.; Ballou, J.D. 2000. Demographic evidence of inbreeding depression in wild golden lion tamarins. Pp. 203-211. *In*: Young, A.G.; Clarke, G.M. (Eds). *Genetics, demography and viability of fragmented populations.* Cambridge University Press.

Egler, S.G. 1986. *Estudos bionônicos de Saguinus bicolor (Spix, 1823) (Callitrichidae: Primates), em mata tropical alterada, Manaus, AM*. Master´s Thesis, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Egler, S.G. 1991a. Double-toothed kites following tamarins. *Wilson Bulletin*, 103:510-512.

Egler, S.G. 1991b. Hábitos alimentares de *Saguinus bicolor bicolor* na região de Manaus, AM. (Callitrichidae, Primates). Em: A. B. Rylands & A. T. Bernardes (eds), *A primatologia no Brasil 3*, pp. 213-214. Sociedade Brasileira de Primatologia e Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.

Egler, S.G. 1992. Feeding ecology of *Saguinus bicolor bicolor* (Primates: Callitrichidae) in a forest relict in Manaus, Brazilian Amazonia. *Folia*

Primatol., 59: 61-76.

Egler, S.G. 1993. First field study of pied tamarin, *Saguinus bicolor bicolor*. In: *Neotropical Primates*, 1 (2): 13-14.

Ellstrand, N.C., D.R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics,* 24: 217-242.

Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplogroups: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics,* 131:479-491.

Faulkes, C.G.; Arruda, M.F.; Monteiro Da Cruz, M.A.O. 2003. Matrilineal genetic structure within and among populations of the cooperatively breeding common marmoset, *Callithrix jacchus. Molecular Ecology,* 2003 12:4.

Ferrari, S.F. 1993. The adaptative radiation of Amazonian callitrichids (Primates, Platyrrhini). *Evolution Biology*, 81-103.

Ferris, S.D.; Brown, W.M. Davidson, W.S.; Wilson, A.C. Extensive polymorphism in the mitochondrial DNA of apes. *Proceedings National Academy of Sciences,* 78, 1835-1844.

Ford, SM. 1986. Systematics of the New World monkeys. In: Comparative Primate Biology, Volume I: *Systematics, Evolution and Anatomy.* pp 73-135 Alan R. Liss, New York.

Frankel, O.H.; Soulé, M.E. 1981*. Conservation and evolution*, p. 327. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics,* 29:305-327.

Frankham, R. 1995b. Imbreeding and extinction: a threshold effect. Conservation biology, 9:792-799.

Frankham, R.; K. Ralls. 1998. Inbreeding leads to extinction. *Nature*. 392:441-442.

French, J.A. 1997. Proximate regulation of singular breeding in Callitrichid primates. *In* N. G. Solomon, & J. A. French (Eds.). *Cooperative Breeding in Mammals.* (pp. 34-75). Cambridge: Cambridge University Press.

Gaggiotti, O.E.; Lange, O.; Rassmann, K.; Gliddons, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using

microsatellite data. *Molecualr Ecology,* 8:1513-1520.

Gagneux, P.;Gonder, M.K.; Goldberg, T.L.; Morin, P.A. 2001. Gene flow in wild chimpanzee populations: what genetic data tell us about chimpanzee movement over space and time. *Philosofical Transactions of Royal Society of London*, 356, 889-897.

Gagneux, P. 2002. The genus *Pan*: populations genetics of an endangered outgroup. *Trends in Genetics*, Vol. 18 Nº 7.

Garber, P.A. 1993. Feeding ecology and Behavior of the genus Saguinus. *In*: Rylands AB, (Eds). *Marmosets and Tamarins, Systematics, Behavior and Ecology*. Oxford University Press, p. 273-295.

Garza, J.C.; Williansom, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data microsatellite loci. *Molecular Ecology, 14:1939-1954.*

Goldstein, D.B.; Roemer, G.W.; Smith, D.A.; Reich, D.E.; Bergman, A.; Wayne, R.K. 1999. The Use of Microsatellite Variation to Infer Population Structure and Demographic History in a Natural Model System. *Genetics,* 151: 797-801.

Goldstein, D. B. & Pollock, D. D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered*., 88:335-342.

Grativol, A.D.; Ballou, J.D.; Fleischer, R.C. 2001. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). *Conservation Genetics*, 2: 1-9.

Hedrick, P.W. & Miller, P.S. 1992. Conservation genetics: techniques and Fundamentals. *Ecological Applications*, 20:30-46.

Hershkovitz, P. 1977. *Living New World Monkeys, Part 1, (Platyrrhini), with an Introduction to Primates*. Chicago University Press, Chicago.

Hrbek, T.; Santos, W.G.; Gordo, M.; Farias, I.P. 2003. Análise da variabilidade genética do macaco sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) através do sequenciamento da região controle mitocondrial: implicações para conservação. Resumos *do 49º Congresso Nacional de Genética*, pg. 21, Águas de Lindóia, SP.

Jacobs, S.C.; Larson, A.; Cheverud, J. 1995. Phylogenetic relationships and orthogenetic evolution of coat color among tamarins (genus *Saguinus*). *Systematic Biology, 44*: 515-532.

Jarne, P.; Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology and evolution*, 11, 424-429.

Kappeler, P.M.; Wimmer, B.; Zinner, D.P.; Tautz, D. 2002. The hidden matrilineal group structure of a solitary lemur: Implications for primate social evolution. *Proceedings of the Royal Societ of London*. B(2002) 269, 1755-1763.

Lawler, R.R.; Richard, A.F.; Riley, M.A. 2003. Genetic population structure of the white sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) at Beza Mahafaly Special Reserve, southwest Madagascar (1992-2001). *Molecular Ecology*, 12, 2307-2317.

Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics.* Gene

McNeely, J.A.; Kenton, R. Miller; Walter V. Reid; Russell A. Mittermeier; Timothy B. Werner. 1990. *Conserving the World's Biological Diversity*. Washington, D.C.: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund-US, and the World Bank.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research,* 27:209-220.

Martin, R.D.; Segesser, F. 1996. Fragmentation of natural populations, genetics and conservation biology. *Almoraima*, 15: 311-326.

Mayor, M.I.; Sommer, J.A.; Huebinger, R.M.; Barber, R.C.; Louis, Jr.E.E. 2002. Characterization of seven microsatellite marker *loci* in a genus of Malagasy lemurs (Propithecus). *Molecular Ecology Notes*, 2: 385-388.

Meireles, C., Sampaio, I., Schneider, H., Ferrari, S., Coimbra-Filho, A.; Pissinati, A.; Schneider, M.P.C. 1997. A comparative study of eleven protein systems in tamarins, genus *Saguinus* (Platyrrhini, Callitrichinae). *Brazilian Journal of Genetics*, *20*: 13-19.

Mittermeier, R.A.; Kinzey, W.G. & MAST, R.B. 1989. Neotropical Primate Conservation. *Journal of Human Evolution,* 18:597-610.

Mittermeier, R.A. & Coimbra-Filho, A.F. 1982. Systematics: Species and

subspecies. In: *Ecology and Behavior of Neotropical Primates* (Coimbra-Filho, A.F. and Mittermeier, R.A., eds.). Vol. 1. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 29-109.

Moritiz, C. 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*, 130:217-228.

Natori, M.; Hanihara, T. 1990. Variations in dental measurements between *Saguinus* species and their systematic relationships. *Folia Primatologica, 58*: 84-92.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.

Neigel, J.E. 2002. Is FST obsolete? *Conservation Genetics,* 3:167-173.

Pastorini, J.; Forstner, M.R.J.; Martin, R.D.; Melnick, D.J. 1998. A Reexamination of the phylogenetic position of *Callimico* (Primates) incorporating new mitochondrial DNA sequence data. *J Mol Evol,* 47: 32-41.

Piry, S.; Luikart, G; Cornuet, J-M. 1999. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.

Pope, T.R. 1996. Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetic loss in endangered primates. IN: Conservation genetics: case histories from nature. Pp. 119-159. Avise, J.C. & Hamick, J.L. (eds.) New York: Chapman & Hall.

Queller, D.C.; Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258 – 275.

Redford, K.H. 1997. A floresta vazia. Em: *Manejo e conservação da Vida Silvestre no Brasil*. C. Valladares-Padua, R. E. Bodmer, e L. Cullen Jr. (eds.), pp. 1-22. MCT-CNPq, Sociedade Civil Mamirauá.

Reinartz, G.E.; Karron, J.D.; Phillips, R.B.; Weber, J.L. 2000. Patterns of microsatellite polymorphism in the range-restricted bonobo (*Pan paniscus*): considerations for interspecific comparison with chimpanzees (*P. troglodytes*). *Molecular Ecology*, 9:315-328.

Rice, W.R. 1989. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43:223-225.

Rosenberger, A.L. 1981. Systematics: the higher taxa. *In*: Ecology and behavior of neotropical Primates, Vol. 1. pp 9-27 *Academia Brasileira de Ciencias*,

Rio de Janeiro.

Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.F.; Mittermeier, R.A. 1993. Systematics, Geographic Distribution, and Some Notes on the Conservation Status of the Callitrichidae. In *Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology*. Oxford University Press.

Rylands, A.B.; Mittermeier, R.A.; Luna, E.R. 1995. A species List for the New World Primates (Platyrrhini): Distribution by Country, Endemism, and Conservation Status According to the Mace-Land System. *Neotropical Primates* Vol. 3, Supplement.

Rylands, A.B.; Schneider, H.; Langguth, A.; Mittermeier, R.A.; Groves, C.P.; Rodríguez-Luna, E. 2000. An assessment of the diversity of New World Primates. *Neotropical Primates*, 8:61-93.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition. Cold. Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, N Y.

Saccheri, I.; Kuussaari, M.; Kankare, M., Vikman, P.; Fortelius W.; Hanski, I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392: 491-494.

Shafer, C.L. 1990. *Nature Reserves: Island Theory and Conservation Pratice*. Smithsonian Institution Press, Washington.

Schlötterer, C & Tautz, D. 1992. Slippage synthesis ofsimple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20: 21-215.

Schneider, H.; Schneider, M.P.C.; Sampaio, M.I.C.; Harada, M.L.; Stanhope, M.; Czelusniak, J.; Goodman, M. 1993. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates*). Mol. Phylogenet. Evol*., 3: 225-242.

Schneider, H.; Sampaio, I.; Harada, M.L.; Barroso, C.M.L.; Schneider, M.P.C.; Czelusniak, J.; Goodman, M. 1996. Molecular phylogeny of the New World monkeys (Platyrrhini, Primates) based on two unlinked nuclear genes. *Am. J. Phys. Anthropol*., 85: 153-179.

Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. 2000. Arlequin Version 2.000: A software for population genetic data analysis. Laboratório de genética e biometria. Universidade de Geneva, Suiça. Adquirido de: http:// anthropologie. Unige.ch/arlequin.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.

Segesser, F.Von; Menard, N.; Gaci, B; martin, R.D. 1999. Genetic differentiation within Barbary macaques (*Macaca sylvanus*): evidence from microsatellites. *Molecular Ecology*, 8: 433-442.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139:457-462.

Srikawan, S.; Field, D.; Woodruff, D.S. 1996. Genotyping free-ranging rodents with heterologous PCR primer pairs for for hypervariable nuclear microsatellite loci. Journal of the Science Society of Thailand. 22:267-274.

Subirá, R.J. 1998. *Avaliação da situação atual das populações selvagens do Sauim-de-coleira Saguinus b. bicolor (Spix, 1823)*. Master´s Thesis, Fundação Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Tagliaro, C.H.; Schneider M.P.C.; Schneider, H; Sampaio, I.C.; Stanhope, M.J. 1997. Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of mtDNA control region. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 674–684.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics,* 123:585-595.

Tardif, S.D.; Jaquish, C.E. 1997. Number of ovulations in the Marmoset monkey (Callithrix jacchus): Relation to body weight, age and repeatability. *American Journal of Primatology*, 42: 323-329.

Thorington Jr., R.W. 1988. Taxonomic status of *Saguinus tripartitus* (Milne-Edwards, 1878*). American Journal of Primatology*, 15: 367-371.

Vallinoto, M.; Sena, L.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Schneider, M.P.C. 2000. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of Saguinus (Callitrichinae, Primates): transfer estimation*. Genetics and Molecular Biology*., 23, 1: 35-42.

Vidal, M.D. 2004. Influência de componentes da estrutura da floresta no uso do habitat, tamanho de grupos e densidade do sauim-de-coleira (Saguinus bicolor- Callitrichidae) em floresta de terra-firme na Amazônia Central. Tese de Mestrado, PPG-BTRN/INPA-UFAM, Manaus, Am., 83 pag.

Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics,* 15: 323-354.

Wright, S. 1969. The theory of gene frequencies. In: Evolution and the genetics population, vol 2. Chicago, IL:University fo Chicago Press.

Yu, Y.; Nie, L.; He, Z.Q.; Wen, J,K,; Jian, C.S.; Zhang, Y.P. 1999. Mitochondrial DNA variation in cattle of South China: Origin and introgression. *Animal Genetics*, **30**, 245-250.

ANEXO

Anexo 01. Número de repetição para cada alelo de cada microssatélite por indivíduo e por população.

	SB02	**SB07**	**SB08**	**SB19**	**SB24**	**SB30**	**SB31**	**SB37**	**SB38**
01_ufam	18	26	24	13	23	27	12	36	21
01_ufam	20	26	25	13	31	27	20	37	22
02_ufam	18	23	23	13	17	27	12	36	23
02_ufam	18	25	26	13	25	27	20	37	25
03_ufam	20	24	25	13	10	23	12	37	24
03_ufam	21	28	26	13	30	27	20	37	25
04_ufam	18	29	19	12	23	26	12	37	22
04_ufam	20	29	20	13	23	27	12	38	25
05_ufam	20	25	23	13	13	27	12	36	22
05_ufam	21	25	24	13	26	27	20	37	22
06_ufam	18	23	24	13	27	27	12	35	24
06_ufam	20	23	24	13	28	27	12	37	27
27_ufam	18	23	24	13	22	27	12	36	21
27_ufam	20	28	26	13	35	27	19	37	21
28_ufam	18	23	10	13	30	26	12	36	23
28_ufam	20	23	10	13	33	27	20	37	24
10_ufam	18	23	10	13	30	26	12	36	24
10_ufam	20	23	19	13	33	27	21	36	25
11_ufam	18	23	8	13	31	26	12	36	23
11_ufam	20	26	8	13	33	27	20	36	25
12_ufam	18	24	23	13	31	26	12	34	21
12_ufam	21	25	24	13	35	27	20	34	22
13_ufam	18	25	20	13	22	23	12	37	21
13_ufam	18	27	21	13	29	27	19	37	23
14_ufam	18	25	25	13	26	27	12	37	22
14_ufam	18	25	26	13	27	27	20	37	25
15_ufam	18	24	24	13	28	27	12	34	21
15_ufam	21	25	26	13	35	27	20	34	22
16_ufam	18	23	19	13	23	27	12	37	21
16_ufam	20	23	19	13	25	27	20	37	25
17_ufam	18	25	23	13	20	27	12	36	22
17_ufam	18	25	24	13	22	27	20	36	22
18_ufam	21	26	23	13	23	23	12	35	22

18_ufam	21	26	26	13	23	27	20	37	25
19_ufam	18	23	11	13	24	23	12	36	24
19_ufam	21	25	11	13	25	30	12	36	25
20_ufam	18	27	24	13	22	27	12	36	22
20_ufam	18	28	26	13	31	27	12	45	22
21_ufam	18	25	24	13	18	26	12	35	22
21_ufam	20	25	26	13	25	27	12	35	25
22_ufam	18	25	10	13	25	27	19	37	22
22_ufam	20	25	10	13	31	27	20	37	24
23_ufam	18	23	21	13	23	27	12	35	22
23_ufam	18	27	23	13	31	27	20	36	25
24_ufam	18	26	23	13	25	25	12	35	22
24_ufam	20	26	26	13	31	26	20	37	24
25_ufam	18	23	25	13	23	23	12	35	21
25_ufam	18	23	26	13	27	27	20	37	24
26_ufam	18	26	22	13	23	23	12	37	22
26_ufam	20	26	23	13	23	27	20	37	25
32_ufam	20	24	22	13	23	23	12	35	22
32_ufam	21	25	23	13	25	27	19	43	25
33_ufam	21	23	20	13	25	23	12	36	25
33_ufam	21	23	21	13	25	30	21	37	31
34_ufam	20	23	23	13	23	27	12	42	21
34_ufam	21	24	24	13	30	27	20	43	22
35_ufam	18	23	26	13	25	27	12	36	21
35_ufam	20	23	27	13	25	30	12	37	24
36_ufam	18	23	11	13	25	23	12	36	21
36_ufam	20	23	11	13	27	27	12	37	24
37_ufam	18	23	23	13	25	23	12	36	24
37_ufam	18	23	24	13	27	30	12	37	24
38_ufam	18	23	20	13	25	26	12	36	21
38_ufam	20	23	21	13	25	27	19	37	24
39_ufam	18	23	23	13	25	27	12	36	21
39_ufam	20	23	24	13	27	27	20	37	21
40_ufam	18	23	8	13	27	23	12	37	20
40_ufam	21	23	8	13	27	27	20	37	21
41_ufam	18	23	20	13	25	27	12	37	22
41_ufam	20	23	21	13	27	30	20	37	24
106_ufam	18	25	25	13	23	23	12	35	21
106_ufam	18	27	26	13	23	27	19	35	24
110_ufam	18	28	23	13	22	27	12	37	21
110_ufam	21	28	26	13	22	27	20	44	24
74_ufam	18	25	25	13	24	27	12	35	25
74_ufam	18	26	26	13	24	27	20	37	28
75_ufam	18	25	24	13	30	27	12	35	23
75_ufam	20	25	25	13	33	27	12	37	24
76_ufam	18	25	20	13	22	27	12	35	22
76_ufam	20	26	21	13	25	27	12	36	25
77_ufam	20	26	24	13	22	27	12	36	25
77_ufam	20	26	25	13	31	27	20	37	28
78_ufam	20	25	23	13	25	27	12	36	22
78_ufam	20	25	24	13	30	27	20	37	28
79_ufam	18	26	11	13	25	27	19	35	24
79_ufam	20	26	11	13	25	27	20	37	25
80_ufam	18	26	24	13	27	27	12	36	24

80_ufam	21	26	25	13	29	27	20	37	25
81_ufam	20	25	24	13	14	27	12	35	25
81_ufam	21	25	25	13	14	27	21	37	28
90_ufam	18	23	10	13	25	27	12	37	21
90_ufam	18	23	17	13	27	27	20	37	24
92_ufam	18	23	25	13	25	23	12	37	21
92_ufam	21	25	25	13	28	27	12	37	24
94_ufam	18	23	25	13	18	23	12	36	25
94_ufam	18	25	26	13	25	27	12	36	31
96_ufam	18	29	23	13	17	23	12	36	23
96_ufam	21	30	26	13	25	27	19	36	31
108_ufam	18	25	22	13	25	27	12	37	22
108_ufam	18	25	25	13	25	27	12	38	25
109_ufam	18	23	19	13	31	26	12	37	22
109_ufam	21	25	20	13	31	27	12	38	23
07_ufam	18	29	11	13	31	26	12	36	24
07_ufam	21	30	11	13	31	27	12	37	27
08_ufam	18	25	23	13	25	30	12	37	22
08_ufam	18	25	24	13	25	30	20	37	24
29_ufam	18	23	9	13	23	26	12	38	20
29_ufam	21	25	9	13	33	27	20	45	21
30_ufam	18	23	24	13	23	26	12	37	21
30_ufam	21	23	25	13	27	27	12	45	21
31_ufam	18	25	23	13	19	23	12	35	24
31_ufam	18	25	26	13	25	30	12	36	24
82_ufam	18	25	22	13	24	23	12	35	24
82_ufam	21	25	25	13	32	23	12	36	24
84_ufam	18	25	19	13	17	30	12	35	21
84_ufam	18	25	19	13	25	30	12	36	21
86_ufam	18	25	24	13	23	23	12	36	23
86_ufam	21	25	25	13	27	27	20	37	24
88_ufam	18	24	23	13	5	23	12	36	22
88_ufam	21	24	24	13	5	23	20	37	24
118_rduck	18	24	23	13	25	27	12	37	22
118_rduck	20	24	24	13	25	27	12	37	27
119_rduck	18	24	23	13	25	23	12	38	22
119_rduck	20	24	26	13	31	27	20	39	27
120_rduck	20	24	24	13	25	26	12	36	22
120_rduck	20	24	25	13	25	27	12	37	27
121_rduck	18	23	13	13	25	26	12	35	22
121_rduck	21	23	14	13	27	27	20	36	22
122_rduck	18	26	23	13	25	27	12	36	22
122_rduck	20	29	25	13	25	27	12	36	28
128_rduck	18	25	23	13	31	27	12	37	22
128_rduck	21	25	25	13	34	27	12	37	27
129_rduck	18	25	23	13	34	27	12	37	22
129_rduck	21	25	24	13	31	27	20	37	27
130_rduck	18	23	24	13	17	23	12	34	22
130_rduck	21	23	25	13	17	26	20	34	22
131_rduck	18	26	24	13	17	26	12	37	22
131_rduck	21	28	25	13	28	27	20	41	27
132_rduck	18	25	24	13	17	26	12	37	22
132_rduck	21	25	25	13	28	27	20	41	27
133_rduck	18	25	24	13	25	26	12	34	22

133_rduck	20	26	24	13	28	27	20	37	27
134_rduck	18	26	11	13	17	26	19	37	21
134_rduck	18	28	11	13	28	27	20	37	22
135_rduck	18	26	23	12	18	23	12	37	22
135_rduck	21	29	25	13	31	23	12	37	24
68_cnova	18	25	24	13	29	26	12	37	20
68_cnova	21	25	26	13	32	27	12	43	22
70_cnova	20	25	24	13	30	23	12	37	21
70_cnova	21	25	26	13	33	27	20	37	22
09_cnova	18	23	24	13	25	23	12	36	21
09_cnova	21	23	26	13	28	30	20	44	24
98_cnova	18	25	11	13	25	26	12	35	21
98_cnova	20	25	11	13	25	27	20	37	24
99_cnova	20	23	23	13	25	26	13	36	20
99_cnova	21	25	26	13	25	28	20	37	20
100_cnova	18	23	23	13	30	26	12	37	24
100_cnova	20	25	26	13	33	27	20	38	24
101_cnova	20	25	10	13	24	25	12	35	22
101_cnova	21	25	18	13	24	26	20	38	24
102_cnova	20	25	8	13	25	26	12	35	23
102_cnova	21	25	8	13	26	27	12	38	24
105_cnova	18	25	11	13	25	23	12	39	24
105_cnova	20	25	11	13	31	27	12	44	27
72_cnova	18	25	11	13	30	23	12	37	22
72_cnova	21	25	11	13	32	23	12	43	22
112_cnova	20	23	23	13	23	23	12	37	23
112_cnova	20	23	26	13	25	30	20	38	28
117_cnova	20	25	11	13	24	26	13	37	21
117_cnova	21	25	11	13	24	27	20	37	25
57_sesi	21	24	24	13	17	23	12	38	21
57_sesi	21	25	26	13	24	27	12	44	22
58_sesi	18	24	25	13	24	27	12	38	21
58_sesi	21	24	26	13	31	27	12	38	22
59_sesi	18	24	24	13	17	23	12	37	21
59_sesi	18	25	26	13	24	27	12	44	22
60_sesi	18	25	19	13	24	23	12	37	24
60_sesi	21	25	20	13	31	27	12	37	25
61_sesi	18	24	24	13	17	26	12	38	22
61_sesi	18	25	26	13	24	27	12	44	25
62_sesi	18	25	26	11	17	23	12	38	22
62_sesi	21	25	27	13	17	27	20	44	25
63_sesi	18	24	11	13	24	26	12	37	22
63_sesi	18	24	11	13	31	27	20	37	25
64_sesi	18	24	24	13	17	23	12	38	20
64_sesi	21	25	26	13	24	27	20	38	21
65_sesi	18	24	24	13	17	27	12	37	22
65_sesi	21	25	26	13	24	27	12	37	25
66_sesi	18	24	10	13	17	23	12	37	21
66_sesi	21	25	10	13	17	27	20	38	25
67_sesi	18	24	9	13	17	23	12	37	21
67_sesi	21	25	9	13	24	27	12	37	22