

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Diversidade e estruturação genética de *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Atelidae) em um ambiente fragmentado no município de Santa Maria de Jetibá (ES) usando DNA mitocondrial e nuclear**

**Clara Scarpati Alvarenga**

Vitória, ES  
Fevereiro, 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Diversidade e estruturação genética de *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Atelidae) em um ambiente fragmentado no município de Santa Maria de Jetibá (ES) usando DNA mitocondrial e nuclear**

**Clara Scarpati Alvarenga**

**Orientadora: Valéria Fagundes**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.**

**Vitória, ES**  
**Fevereiro, 2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

A473d Alvarenga, Clara Scarpati, 1987-  
Diversidade e estruturação genética de *Brachyteles hypoxanthus*  
(Primates: Atelidae) em um ambiente fragmentado no município de  
Santa Maria de Jetibá (ES) usando DNA mitocondrial e nuclear / Clara  
Scarpati Alvarenga. – 2010.  
45 f. : il.

Orientadora: Valéria Fagundes.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,  
Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Muriqui - Santa Maria de Jetibá (ES). 2. Microssatélites  
(Genética). 3. DNA. 4. Mata Atlântica – Conservação. I. Fagundes,  
Valéria. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Diversidade e estruturação genética de *Brachyteles hypoxantus* (Primates: Atelidae) em um ambiente fragmentado do município de Santa Maria de Jetibá (ES) usando DNA mitocondrial e nuclear"

AUTORA: CLARA SCARPATI ALVARENGA

ORIENTADOR: Profa. Dra. VALÉRIA FAGUNDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA ANIMAL, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, pela comissão examinadora:

Dra. VALÉRIA FAGUNDES  
Orientador

Dra. ANA PAULA CAZERTA FARRO  
Membro Interno

Dr. SÉRGIO LUCENA MENDES  
Membro Interno

Dr. DIOGO MEYER  
Membro externo

DATA DA REALIZAÇÃO: Vitória, 26 de fevereiro de 2010.

Presidente da Comissão Examinadora  
Profa. Dra. VALÉRIA FAGUNDES

## AGRADECIMENTOS

O conteúdo dos agradecimentos não é o mais importante de uma dissertação, mas sem dúvida é um dos mais difíceis e demorados de se escrever. Quando penso em agradecer, penso na contribuição intelectual, financeira, profissional e pessoal de muitas pessoas e instituições, as quais foram imprescindíveis para a conclusão desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, Dra. Valéria Fagundes, pessoa que admiro e respeito muito pela amizade e competência. Muito obrigada pela grande dedicação, paciência e apoio durante todo o mestrado e pela amizade e cumplicidade durante os quase cinco anos que sou sua aluna.

A todos os pesquisadores que realizam coletas e monitoram as populações de muriqui no município de Santa Maria de Jetibá, pelas amostras e informações. Sem vocês, esse estudo não seria possível. Em especial, agradeço ao Dr. Sérgio Mendes, sempre questionando e ajudando a pensar na genética e conservação dos muriquis, e ao pesquisador Rogério Ribeiro, que sempre esteve disponível para esclarecer dúvidas e discutir sobre as populações.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa, e à FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo), FACITEC (Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória) e CEPF (Critical Ecosystem Partnership Fund) pelo apoio financeiro.

Aos Drs. Diogo Meyer e Fabiano Fernandes pela disponibilidade de ensinar, interpretar e discutir os programas e resultados das análises. Agradeço também à mestranda Bárbara Bitarello por me ajudar a interpretar os dados brutos. Vocês participaram da fase mais importante da minha formação e por isso sou muito grata por toda disponibilidade e atenção.

A todos os professores do PPGBAN (Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) pela participação no meu amadurecimento crítico e científico como mestre.

Aos amigos do LGA (Laboratório de Genética Animal): Arturo Martinelli, Bruno Bona, Cristie Bernabé, Eduardo Loyola, Gina Neves, Juçara Gomes, Leonardo Baião, Lorena Dinelli, Lucas Vianna, Ludmilla Coutinho, Marcela Paes, Marianna Machado, Núbia Thomazini, Paulo Chaves, Queila Bravo, Renata Marçal, Robeta Paresque, Rosana Nunes, Sara Dalboni, Sílvia Lopes, Victor Colombi e Yuri Marins,

pelo apoio, discussões inteligentes e aprendizado. Em especial, agradeço à Ms. Juçara Gomes e a doutoranda Sílvia Lopes pela ajuda nas análises de *mismatch* e interpretações; e aos melhores amigos do mundo, Cristie Bernabé e Marianna Machado, pela forte amizade, carinho, apoio e companheirismo sem igual, os quais foram e são essenciais em todos os momentos.

Aos amigos do NGACB (Núcleo de Genética Aplicada a Conservação da Biodiversidade) com quem aprendi, dividi experiências e amadureci intelectualmente. Em especial, agradeço minha colega mestranda Ana Carolina Loss, à Dra. Ana Paula Farro e à Ms. Juliana Justino pelas trocas de experiências, discussões e apoio pessoal e técnico durante todo o mestrado.

Aos amigos do NGHM (Núcleo de Genética Humana e Molecular), em especial ao Dr. Iuri Louro e à Dra. Flávia de Paula pela disponibilidade de equipamentos. Também agradeço à doutoranda Eldamária Wolfgramm; aos mestrandos Lívia Selvatici e Thiago Pereira; e à graduada Beatriz Silva por toda troca de experiências e apoio ao longo do mestrado, que foram extremamente importantes para a obtenção dos dados.

À mestranda Luana Centoducatte, pelo apoio, troca de informações e pela ajuda em confeccionar o mapa do município de Santa Maria de Jetibá.

Aos amigos da turma de mestrado 2008, que estão juntos comigo nessa fase: Ana Carolina Loss, André Neves, Bruno Cancian, Isabel Alencar, Maria Alice Seabra, Mariana Petri, Marianna Machado e Max Santos; torço muito por todos vocês. Agradeço também aos amigos da turma de graduação 2004/1, por sempre estarem presentes e me fazerem lembrar a força e energia da nossa turma.

Ao meu pai Haroldo Alvarenga, minha mãe Dalva Terezinha S. Alvarenga e meu irmão Christiano S. Alvarenga, pelo grande apoio em todos os momentos, pela compreensão e o grande carinho que foram essenciais para todo o desenvolvimento desse trabalho e minha formação.

E ao melhor namorado do mundo, Marcelo Barone, pelo grande apoio que é até difícil de descrever. Marcelo, sou e serei sempre grata por todo carinho e atenção, que sempre me ajudaram a erguer a cabeça nos momentos mais difíceis, e por todo amor e confiança, os quais foram fundamentais para eu sempre seguir em frente.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>07</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>08</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>09</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
<b>Amostragem e genotipagem</b> .....	<b>14</b>
<b>Análise dos Dados</b> .....	<b>16</b>
<u>Diversidade genética e endocruzamento</u> .....	<b>16</b>
<u>Evidências genéticas de gargalo e expansão populacional</u> .....	<b>17</b>
<u>Estruturação genética e barreiras para o fluxo gênico</u> .....	<b>17</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>Diversidade genética e endocruzamento</b> .....	<b>19</b>
<b>Evidências genéticas de gargalo e expansão populacional</b> .....	<b>20</b>
<b>Estruturação genética e barreiras para o fluxo gênico</b> .....	<b>21</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>Diversidade genética</b> .....	<b>26</b>
<b>Diferenciação interpopulacional em Santa Maria de Jetibá?</b> .....	<b>28</b>
<b>Desvios de HWE: gargalo populacional, endocruzamento ou deriva genética?</b> .....	<b>30</b>
<b>Implicações para a conservação</b> .....	<b>34</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de indivíduos analisados por localidade usando DNA mitocondrial (DNAMt) e microssatélite (DNAn) em Santa Maria de Jetibá, ES. **18**
- Tabela 2.** Locos e primers de microssatélites, condições específicas da PCR, número de alelos por loco ( $N_a$ ), tamanho dos alelos, número de indivíduos genotipados ( $N_t$ ) e número de indivíduos homozigotos ( $N_{homo}$ ) e heterozigotos ( $N_{hetero}$ ). **22**
- Tabela 3.** Teste do desvio das frequências alélicas do esperado em HWE, número de indivíduos ( $n$ ), proporção de heterozigotos de cada loco independente ( $H_{pr}$ ) e presença de alelos nulos por loco (valores de P para HWE em negrito). **23**
- Tabela 4.** Diversidade genética intrapopulacional usando microssatélites, número de indivíduos ( $n$ ), número médio de alelos ( $N_a$ ), número de alelos exclusivos ( $N_{ap}$ ), riqueza alélica ( $R_a$ ), heterozigosidade observada ( $H_{obs}$ ) e esperada ( $H_{esp}$ ), diversidade genética ( $D_g$ ) e coeficiente de endocruzamento (Fis). **23**
- Tabela 5.** Frequência de haplótipos de *B. hypoxanthus* por população de SMJ. **24**
- Tabela 6.** Índices de diversidade por população. Número de indivíduos amostrados ( $n$ ), número de haplótipos ( $n_H$ ), número de sítios polimórficos ( $s$ ), diversidade haplotípica ( $h$ ), diversidade nucleotídica ( $n$ ), número médio de diferenças par-a-par ( $\pi$ ), testes de distribuição de frequências pareadas (SSD) e valores dos testes  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu. **24**



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Áreas amostradas em Santa Maria de Jetibá, adaptado de Mendes *et al.*, **19** (2005b).
- Figura 2.** A. Distribuição *mismatch* entre os indivíduos. Valores dos eixos X e Y **25** referem-se aos números de diferenças e a suas freqüências, respectivamente. Colunas e linhas indicam valores observados e esperados (baseados no modelo de expansão populacional), respectivamente. B. Rede de haplótipos baseada na estatística Median Joining usando o programa NETWORK 4.201. Na rede, cada círculo identificado corresponde a um haplótipo, cujo tamanho é proporcional à sua freqüência na população; e círculos pequenos correspondem a haplótipos intermediários não detectados. Entre os haplótipos ocorre pelo menos uma mutação, sendo um número maior indicado por traços.

## RESUMO

*Brachyteles hypoxanthus*, muriqui-do-norte, encontra-se ameaçado pelo pequeno número de indivíduos na natureza, distribuídos em apenas 12 populações isoladas, sendo classificado como “criticamente em perigo” de extinção. Estudos com DNA mitocondrial (DNAmt) revelaram a população de Santa Maria de Jetibá (SMJ) como uma Unidade de Manejo, apesar do habitat menor e altamente fragmentado. Nosso objetivo foi avaliar se as populações de cada fragmento também formam unidades genéticas diferenciadas. Analisamos 43 indivíduos de seis áreas do município utilizando-se cinco locos de microssatélites e 366 pb da região hipervariável I (D-loop, DNAmt). Índices moderados de diversidade genética ( $Dg=0,74$ ) e heterozigosidade ( $H_{obs}=0,60$ ) foram encontrados com DNA. As populações São Sebastião de Belém (SSB) e Córrego do Ouro 1 (CO1) desviaram de HWE e foram significantes no coeficiente de endocruzamento ( $Fis=0,259$  e  $0,206$ ; respectivamente). Foram detectados sete haplótipos (DNAmt), com diversidade haplotípica moderada ( $h=0,7540$ ). O haplótipo H1 foi exclusivo para SSB, enquanto as demais populações compartilharam três haplótipos (H2, H3 e H5). Não foram descartadas as hipóteses de estabilidade populacional. Observou-se fraca estruturação genética para DNA ( $Fst=0,0768$ ), porém forte estruturação para DNAmt ( $\Phi st=0,58013$ ), com SSB distinta das demais populações ( $0,65256 \leq \Phi st \leq 0,94310$ ). Diversidade genética moderada em SMJ foi inesperada para uma espécie criticamente em perigo de extinção e deve-se provavelmente ao longo tempo das gerações, visto que as populações apresentaram fraca estruturação genética entre si (DNA). No entanto, desvios de HWE e a predominância de um haplótipo do DNAmt para SSB podem ser sinais dos efeitos da deriva genética, já que não se descartou a hipótese de equilíbrio demográfico. Tais efeitos são congruentes com a proposta de que a deriva genética tende a ser mais intensa em populações insulares, uma analogia aos fragmentos de mata de SMJ. Visto a baixa diferenciação na frequência de alelos e o compartilhamento de haplótipos, os dados sugerem que as populações de SMJ em particular não devem ser tratadas como unidades diferenciadas. Baseado nisso, simulações da diversidade genética mostram que o aumento da conectividade dos fragmentos florestais em SMJ a médio e longo prazo pode ser uma medida essencial para a recuperação, manutenção e conservação do muriqui-do-norte no município.

## ABSTRACT

*Brachyteles hypoxanthus*, northern muriqui, is threatened by the small number of individuals in the wild, distributed in only 12 isolated populations, being classified as "critically endangered" species. Mitochondrial DNA (mtDNA) studies revealed the population of Santa Maria de Jetibá (SMJ) as a Management Unit, despite of habitat smaller and highly fragmented. Our objective was to assess whether the populations of each fragment also form different units. We analyzed 43 individuals from six areas of the municipality using five microsatellite loci and 366 bp of hypervariable region I (D-loop, mtDNA). Moderate levels of genetic diversity ( $Dg=0,74$ ) and heterozygosity ( $Hobs=0,60$ ) were found with nDNA. Populations São Sebastião de Belém (SSB) and Córrego do Ouro 1 (CO1) deviated from HWE and were significant in the inbreeding coefficient ( $Fis=0,259$  and  $0,206$ ; respectively). Were detected seven haplotypes (mtDNA), with moderate haplotype diversity ( $h=0,7540$ ). The H1 haplotype was unique to SSB, while the other three populations shared haplotypes (H2, H3 and H5). Not were discarded the hypothesis of population stability. There was a weak genetic structure for nDNA ( $Fst=0,0768$ ), but strong structure for mtDNA ( $\Phi st=0,58013$ ), with SSB distinct from other populations ( $0,65256 \leq \Phi st \leq 0,94310$ ). Moderate genetic diversity in SMJ unexpected for a species critically endangered and is probably due to the long generations, since the populations had weak genetic structure between themselves (nDNA). However, deviations from HWE and the predominance of one haplotype of mtDNA for SSB may be signs of the effects of genetic drift, since it does not rule out the hypothesis of demography equilibration. These effects are consistent with the proposal that genetic drift tends to be more intense in island populations, an analogy to forest fragments of SMJ. Seen the low differentiation in allele frequencies and sharing of haplotypes, our data suggest that the population of SMJ in particular should not be treated as different units. Based on this, the genetic diversity simulations show that the increased connectivity of forest fragments in SMJ over the medium and long term can be an essential step in the restoration, maintenance and conservation of northern muriqui in the municipality.

## INTRODUÇÃO

O miqui (gênero *Brachyteles*) é o maior primata não-humano dos Neotrópicos (Rowe, 1996), se alimenta principalmente de folhas e frutos (Martins *et al.*, 2003), vive em grupos sociais e possui sistema reprodutivo promíscuo (Dias & Strier, 2003). Em sua sociedade, os machos são filopátricos e as fêmeas migram para outro grupo social quando estão próximas da primeira idade reprodutiva (Strier & Ziegler, 2000), sendo as principais responsáveis pelo fluxo gênico entre as populações. Duas espécies endêmicas da Mata Atlântica compõem o gênero, *B. arachnoides* (É. Geoffroy, 1806) ou miqui-do-sul; e *B. hypoxanthus* (Kuhl, 1820) ou miqui-do-norte.

Em seu estudo, Aguirre (1971) sugeriu que as populações de miqui sofreram um gargalo populacional em decorrência da fragmentação da Mata Atlântica. Estudos ecológicos e demográficos recentes em *B. hypoxanthus* estimam apenas 855 animais distribuídos em 12 populações (Mendes *et al.*, 2005a), com nenhuma delas com 500 indivíduos, o número mínimo estimado para manter a variabilidade genética (Lande, 1998). O isolamento das 12 populações remanescentes, em sua maioria pequenos fragmentos florestais, somado ao número baixo de indivíduos na natureza, permitiu classificar *B. hypoxanthus* como “criticamente em perigo” de extinção, segundo critérios da IUCN (Mendes *et al.*, 2008). As causas para a redução populacional também foram associadas à degradação da mata e à caça (Mittermeir *et al.*, 1987), agravando seu quadro de ameaça.

Um dos problemas para espécies cujas populações são pequenas e isoladas é a probabilidade aumentada de perda de alelos, associada às variações das frequências dos alelos nas populações, fenômeno conhecido como deriva genética (Frankham *et al.*, 2002; Fagundes, 2005). Por sua vez, a perda da diversidade genética pode reduzir a viabilidade da população em longo prazo (Allendorf & Leary, 1986; Fagundes, 2005), podendo levá-la à extinção. Somado a isso, em populações pequenas e isoladas pode-se aumentar a homogeneidade como produto de endocruzamento e, conseqüentemente, os efeitos genéticos deletérios associados (Primack & Rodrigues, 2001; Fagundes, 2005).

Diante de todos os perigos que as populações reduzidas estão sujeitas, torna-se claro que para a maior efetividade das medidas de conservação e estratégias de manejo de espécies ameaçadas é indispensável o conhecimento da estrutura genética e a distribuição da diversidade genética de uma espécie (Avise, 1989; Smith *et al.*, 1993). Estudos preliminares com miqui-do-norte usando DNA mitocondrial (DNAm) em

oito das 12 populações remanescentes (Chaves, 2005; Alvarenga, 2008; Fagundes *et al.*, 2008) revelaram grande diferenciação entre as populações, grande diversidade haplotípica e evidências de fluxo gênico em um passado recente. As populações da Estação Biológica de Caratinga (EBC) e da Reserva Particular do Patrimônio Natural Mata do Sossego (RPPNMS) mostraram baixa diversidade genética intrapopulacional, em oposição às populações do Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Parque Estadual Serra do Brigadeiro (PESB) e do município de Santa Maria de Jetibá (SMJ), que se revelaram como potenciais reservatórios da diversidade genética da espécie, indicadas como Unidades de Manejos distintas (Alvarenga, 2008).

A população do município de SMJ destacou-se por apresentar o terceiro maior índice de diversidade haplotípica ( $h=0,7540$ ) entre as oito populações analisadas (Alvarenga, 2008), apesar de suas populações ocuparem isoladamente um habitat menor e fragmentado quando comparado com as demais localidades (Mendes *et al.*, 2005a). Este município está localizado na região centro-serrana do estado do Espírito Santo, leste do Brasil (20°02'S; 40°42'W) e possui cerca de 40% de sua superfície recoberta por remanescentes florestais em estágio médio e avançado de sucessão, intensamente fragmentados (de 60 a 350 ha) e restritos a topos de morros, separados por uma matriz de culturas diversas (horticultura, cafeicultura, eucalipto e pastagens; Mendes *et al.*, 2005a). Populações de muriqui em SMJ encontram-se em pelo menos 13 fragmentos, com uma população mínima estimada de 84 animais, variando o número de indivíduos por fragmento de um a 19 (Mendes *et al.*, 2005a; Rogério Ribeiro, comunicação pessoal). Em geral, indivíduos solitários em um fragmento são fêmeas, mas também há fêmeas solitárias em fragmentos com presença de grupos de muriquis (Mendes *et al.*, 2005a). Considerando esse cenário, estes animais vivem, portanto, em uma situação rara, pois sobrevivem em pequenos fragmentos de mata e, além disso, não são caçados, devido à falta dessa tradição na região (Mendes *et al.*, 2005a).

Apesar da fragmentação do habitat ser destaque no município, uma análise histórica da fragmentação florestal entre os anos de 1970 e 2005 revelou que ao longo desse período ocorreu incremento de mata. Dessa forma, atualmente a fragmentação encontra-se em um nível menor de que se encontrava na década de 70, com aproximadamente 2459,80 ha de floresta nativa passando de estágio inicial de regeneração para estágio médio a avançado, em contraposição a um decréscimo de 101,43 ha de mata por desmatamento, passando de estágio médio a avançado para o estágio inicial (Almeida Júnior, 2006).

O aumento de área florestal em SMJ pode ter promovido um contato secundário entre as populações de fragmentos próximos, dada a maior facilidade de locomoção de fêmeas jovens entre fragmentos antes da primeira idade reprodutiva. Um exemplo é o de duas populações próximas, denominadas Rio das Pedras 1 e 2 (RP1 e RP2; Mendes *et al.*, 2005b), que embora consideradas populações separadas, migração de fêmeas entre si já foram observadas em campo. Da mesma forma, em outras duas populações próximas denominadas Córrego do Ouro 1 e 2 (CO1 e CO2; Mendes *et al.*, 2005b), que apesar de independentes, já foram verificadas trocas periódicas recentes de machos da população CO1 (2-4 indivíduos) para a população CO2 e, conseqüentemente, cópulas com fêmeas de CO2 (Rogério Ribeiro, comunicação pessoal).

Apesar do incremento de mata ao longo desse período, a fragmentação ainda representa uma ameaça para as populações de muriqui em SMJ, podendo causar seu isolamento completo e, assim, reduzir seu potencial de sobrevivência em longo prazo. Um exemplo aplica-se à população São Sebastião de Belém (SSB), a mais estudada desde que as populações começaram a ser monitoradas em 2001 (Mendes *et al.*, 2005b), que se encontra isolada das demais, conseqüência provável da maior fragmentação no entorno e da presença de uma rodovia pavimentada, o que provavelmente interfere na migração de fêmeas jovens para as áreas próximas. Um fato que dá suporte a essa hipótese é a observação de fêmeas solitárias de SSB dentro do fragmento onde habita seu grupo natal, provavelmente devido à falta de oportunidade de dispersar para outro grupo social (Mendes *et al.*, 2005b). Tentativa de manejo dessas fêmeas já foi bem sucedida em SMJ, com a translocação de uma fêmea jovem da população SSB para CO1 (Mendes *et al.*, 2005b).

A diversidade genética moderada apresentada pela população de SMJ foi inesperada perante o cenário em que se encontram (Alvarenga, 2008). Essa população foi classificada como uma Unidade de Manejo, porém há questionamentos (1) se o grupo de indivíduos de cada fragmento (aqui chamados de populações) são unidades genéticas distintas; (2) se a fragmentação da mata, a distância geográfica entre os fragmentos florestais ou a presença de uma rodovia pavimentada podem atuar como eficientes barreiras para o fluxo gênico entre as populações e, assim, promover a diferenciação genética entre elas; (3) se há evidências genéticas da ocorrência de gargalo populacional como proposta por Aguirre (1971); e (4) se há evidências genéticas da expansão populacional frente ao crescimento das matas já verificado na região.

Moritz (1994) já afirmara que para caracterizar as unidades genéticas é necessário investigar tanto DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) como nuclear (DNAn), já que a desvantagem de se analisar apenas o DNAm<sub>t</sub> é que este avalia somente as linhagens maternas de uma espécie (Awise & Hamrick, 1996), sendo necessário o uso de um marcador nuclear para avaliar a influência das linhagens paternas, assim como para comparar estimativas de parâmetros demográficos independentes. Dentre eles, os microssatélites destacam-se em estudos em conservação, especialmente em populações que sofreram gargalo populacional e efeitos da endogamia, por não sofrerem efeitos da pressão seletiva (porções não-codificantes) e apresentarem alta taxa de mutação (Goldstein & Schlotterer, 1999).

Nesse sentido, o presente estudo caracterizou as populações de *B. hypoxanthus* em Santa Maria de Jetibá, confrontando dados de DNAm<sub>t</sub> e DNAn, e assim avaliou se as populações constituem unidades genéticas distintas. Para tanto, avaliou-se: (1) a diversidade genética de seis populações isoladas com DNA nuclear e mitocondrial; (2) os índices de endocruzamento e sua relação com os índices de diversidade genética; (3) evidências genéticas de gargalo e expansão populacional recente; (4) existência de estruturação genética entre as populações; (5) e a existência de barreiras para o fluxo gênico no município. Nesse sentido, foi possível discutir a importância e contribuição dos dados genéticos na conservação e manejo da espécie em SMJ.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostragem e genotipagem**

Nossa amostra foi composta de 43 indivíduos provenientes de seis áreas de ocorrência do município (Figura 1, Tabela 1): São Sebastião de Belém (SSB, n=16), Rio das Pedras 1 (RP1, n=4), Rio das Pedras 2 (RP2, n=1), Córrego do Ouro 1 (CO1, n=19), Córrego do Ouro 2 (CO2, n=1) e Rio Claro-Triunfo (RCT, n=2); o que compreende 61,8% do total de indivíduos dessa população para uma espécie “criticamente em perigo” de extinção (Mendes *et al.*, 2008). Pelo menos uma amostra de fezes de cada indivíduo foi obtida durante os trabalhos de campo por equipes responsáveis por estudos comportamentais e ecológicos, sendo os animais identificados previamente por marcas naturais do corpo e pela despigmentação da face. Depois da defecação, as amostras fecais (cerca de 5 g por indivíduo) foram transferidas para um tubo cônico de polipropileno de 50 ml contendo um agente desidratante (sílica-gel). Cerca de 10-20 g

de sílica gel com indicador de umidade e uma fina camada isolante de algodão foram adicionados abaixo e acima da amostra até completar o tubo a fim de se obter um processo rápido de desidratação. As amostras foram cadastradas no Banco de Fezes e DNA de Muriqui do Laboratório de Genética Animal da UFES e estão conservadas a -20° C. O DNA, retirado das amostras fecais, foi extraído utilizando-se o QIAamp DNA Stool Mini Kit® (Qiagen).

*DNA Microssatélite:* Amostras de DNA de 42 indivíduos foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com seis pares de primers previamente descritos para *Lagothrix lagotricha* (Di Fiore & Fleischer, 2004; Tabelas 1 e 2). Reações com 25 µL continham: 1x de solução tampão; 0,8 mM de dNTP; quantidades específicas de MgCl<sub>2</sub> e BSA (Tabela 2); 0,48µM de cada primer; 0,625 U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen, EUA); e 50 ng de DNA molde. O perfil da PCR foi 94°C por 2 minutos; 40 ciclos: de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para cada primer por 30 segundos (Tabela 2) e 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida 10%, corados com nitrato de prata 0,1% e os tamanhos dos fragmentos foram estimados com marcador molecular de 10 pb (Invitrogen, EUA), utilizando-se um gráfico exponencial construído em mono-log no aplicativo Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Para minimizar erros de genotipagem, definimos os alelos segundo o protocolo de “múltiplos tubos” (Taberlet *et al.*, 1996), que prediz que a condição heterozigota é determinada com três reações independentes, e dos homozigotos com sete reações. Para excluir a possibilidade de duplicação de amostras de DNA do mesmo indivíduo, apenas genótipos multilocos únicos foram incluídos na análise, identificados pelo programa IDENTITY 1.0 (Wagner & Sefc, 1999). Foi calculada a probabilidade de identidade (P<sub>ID</sub>), que é a probabilidade que dois indivíduos diferentes dividirem o mesmo genótipo multilocos de um dado número de locos (Paetkau & Strobeck, 1994).

*DNA Mitochondrial:* Foram utilizadas 32 seqüências de 366 pb da região hipervariável I da alça D-loop (ou região controladora) do DNAm (Tabela 1, Anexo I) obtidas por Chaves (2005). Para obtenção das seqüências, um fragmento de 460 pb foi amplificado pela reação de PCR com os primers *Mono1* e *Mono2*, descritos por Fagundes *et al.* (2008). Reações com 50 µl apresentavam: 1x de solução tampão; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 M de dNTP; 10µM de cada primer; 3U de Platinum Taq DNA



Polymerase<sup>®</sup> (Invitrogen, EUA); e 10-40 µg de DNA molde. O perfil da PCR foi 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% para checagem do tamanho, utilizando o marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, EUA). Posteriormente, estes foram purificados com os kits Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen, EUA) e quantificados em gel de agarose 2,0% com Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, EUA) pela comparação direta da intensidade luminosa. Os produtos foram então seqüenciados com o seqüenciador ABI Prism 3700 seguindo-se o protocolo Big Dye Terminator do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

## **Análise dos Dados**

### Diversidade genética e endocruzamento

*DNA Microsatélite:* Somente locos polimórficos foram usados nas análises. Foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação entre pares de locos e o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) com o programa GENEPOP 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995). A proporção de heterozigotos ( $H_{pr}$ ) foi calculada com o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). Para verificar a presença de alelos nulos foi utilizado o programa MICROCHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004), que por meio de testes probabilísticos avalia o excesso na freqüência de homozigotos. Para todas as análises, valores de P foram considerados significativos no nível de 0,05 ( $P \leq 0,05$ ). Para análises de testes múltiplos simultâneos foi aplicada a correção de Bonferroni para minimizar erros estatísticos do tipo I (Rice, 1989), o qual consiste em rejeitar a hipótese nula quando esta na realidade é verdadeira. Para análises intrapopulacionais foi calculado o número médio de alelos ( $N_a$ ); número de alelos exclusivos ( $N_{ap}$ ); média da riqueza alélica (número de alelos independente do tamanho da amostra;  $R_a$ ); heterozigosidade observada ( $H_{obs}$ ) e esperada em HWE ( $H_{esp}$ ); diversidade genética ( $D_g$ ); e coeficiente de endocruzamento (Fis) com os programas ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), CONVERT 1.31 (Glaubitz, 2004) e FSTAT 2.9.3.2.

*DNA Mitochondrial:* Para as análises intrapopulacionais foram calculados o número de haplótipos; número de sítios polimórficos ( $s$ ); diversidade haplotípica ( $h$ );

diversidade nucleotídica ( $n$ ); e o número médio de diferenças par-a-par ( $\pi$ ) com o programa ARLEQUIN 3.11.

#### Evidências genéticas de gargalo e expansão populacional

*DNA Microsatélite*: Para detectar eventos de gargalo populacional passado ou recente foi utilizado o programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996), utilizando-se o modelo misto, assumindo que os locos seguem 70% do modelo de mutação gradual com variação de 30%, e o modelo de mutação de alelos infinitos. Valores de P foram considerados significativos no nível de 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

*DNA Mitochondrial*: Os testes de neutralidade  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997), os quais evidenciam expansão populacional recente quando observados valores negativos significantes, foram calculados no programa ARLEQUIN 3.11. Também calculamos a distribuição de *mismatch* (1000 permutações), a qual investiga a história demográfica das populações e tende a apresentar distribuição unimodal em populações que passaram por uma expansão populacional recente, enquanto que uma distribuição multimodal tende a ser característica de populações em equilíbrio demográfico em longo prazo (Rogers & Harpending, 1992). Valores de P foram considerados significativos no nível de significância de 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

#### Estruturação genética e barreiras para o fluxo gênico

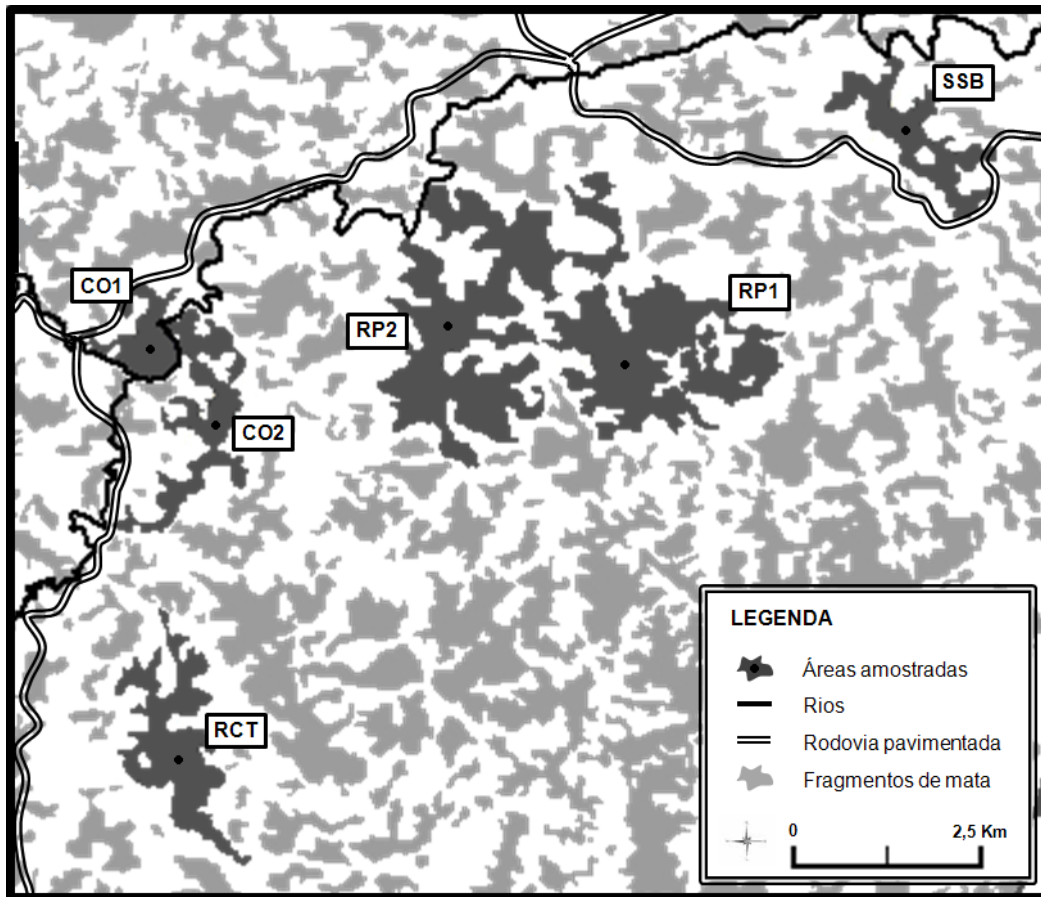
*DNA Microsatélite*: Foram calculados os índices de diferenciação genética global entre as populações ( $F_{st}$ ), entre os indivíduos de uma população ( $F_{is}$ , ou coeficiente de endocruzamento), e entre indivíduos de todas as populações ( $F_{it}$ , ou coeficiente de endocruzamento total) pelo programa GENEPOP 4.0.10. Também foi obtida a diferenciação genética par-a-par ( $F_{st}$ ) entre pares de populações e realizada a análise de variância molecular (AMOVA) com o programa ARLEQUIN 3.11. Para as análises de AMOVA, as amostras das populações CO1 e CO2; e RP1 e RP2 foram unidas como CO e RP, respectivamente, dada a proximidade e o histórico de troca de indivíduos entre elas (Mendes *et al.*, 2005b; Rogério Ribeiro, comunicação pessoal). Foram realizados os testes de diferenciação de populações sem assumir HWE, usando 1000 interações, com o programa FSTAT 2.9.3.2 e o teste exato de diferenciação (com 100.000 permutações e 4.000 passos de desmemorização) com o programa ARLEQUIN 3.11. Valores de P foram considerados significativos no nível de 0,05 ( $P \leq 0,05$ ). Para análises de testes múltiplos simultâneos foi aplicada a correção de Bonferroni.

*DNA Mitochondrial*: Foi construída uma rede de haplótipos segundo NETWORK 4.201 (Fluxus Technology Ltd) e calculados valores de diferenciação genética par-a-par ( $\Phi_{st}$ ) entre pares de populações, o teste exato de diferenciação (com 100.000 permutações e 4.000 passos de desmemorização) e realizada a análise de AMOVA, como descrito acima, pelo programa ARLEQUIN 3.11. O método de distância utilizado foi o de Tamura & Nei (1993), por ser o modelo de substituição mais apropriado disponível pelo programa, de acordo os previamente gerados pelo programa MODELTEST 3.7 (Posada & Crandall, 1998; dados não mostrados). Valores de P foram considerados significativos no nível de significância de 0,05 ( $P \leq 0,05$ ). Também foi realizado o teste de Mantel (10.000 permutações), que verifica se as diferenças genéticas estão correlacionadas com as distâncias geográficas entre as regiões, com o programa ARLEQUIN 3.11. As distâncias entre as populações foram calculadas a partir do mapa fornecido em Mendes *et al.* (2005b).

**Tabela 1.** Número de indivíduos analisados por localidade usando DNA mitocondrial (DNAmt) e microsatélite (DNAn) em Santa Maria de Jetibá, ES.

Populações	Confirmado <sup>1</sup>	Marcador molecular analisado			Total
		DNAmt+DNAn	DNAmt	DNAn	
São Sebastião de Belém (SSB)	16	12	1	3	16
Rio das Pedras 1 (RP1)	12	3	-	1	4
Rio das Pedras 2 (RP2)	14	1	-	-	1
Córrego do Ouro 1(CO1)	19	12	-	7	19
Córrego do Ouro 2 (CO2)	5	1	-	-	1
Rio Claro / Rio Triunfo (RCT)	3	2	-	-	2
Total	68	31	1	11	43

1. segundo Mendes *et al.* (2005b) e Rogério Ribeiro (comunicação pessoal).



**Figura 1.** Áreas amostradas em Santa Maria de Jetibá, adaptado de Mendes *et al.* (2005b).

## RESULTADOS

### Diversidade genética e endocruzamento

*DNA Microsatélite:* Dos seis locos, um mostrou-se homozigoto em 97% dos indivíduos (Tabela 2, Anexo I), não sendo, portanto, utilizado nas análises populacionais. Dos cinco remanescentes, o loco 1118 foi o mais polimórfico, mostrando 11 alelos que variaram em até 28 nucleotídeos, enquanto que os locos 113 e 1110 apresentaram a menor variação, com seis alelos e 10-12 nucleotídeos de variação, respectivamente. A análise dos genótipos dos indivíduos, realizada pelo IDENTITY e utilizando os cinco locos polimórficos visando identificar a duplicidade de amostras de DNA, mostrou que há baixa probabilidade de dois indivíduos possuírem o mesmo genótipo ( $P_{ID}=5,440497 \times 10^{-5}$ ) e, conseqüentemente, alto poder de discriminação dos indivíduos. Os cinco locos mostraram-se independentes um do outro pelo teste de

desequilíbrio de ligação, após a correção estatística de Bonferroni ( $P > 0,0045$ ). A baixa proporção de heterozigotos ( $H_{pr}$ ) nos locos 113, 1110 e 1115 sugeriu a presença de alelos nulos (Tabela 3), enquanto que a proporção de heterozigotos total foi  $H_{pr} = 0,607$ . Nas análises intrapopulacionais (Tabelas 3 e 4), as populações melhor amostradas (SSB e CO1) desviaram do HWE, com pelo menos três locos confirmando o desvio de HWE em uma análise loco-por-loco ( $P < 0,05$ ). O número médio de alelos ( $N_a$ ) total foi 8,0, enquanto individualmente esse número variou entre as populações ( $0,8 \leq N_a \leq 6,0$ ), apresentando uma associação entre maior número de alelos e populações mais amostradas. Por outro lado, a riqueza de alelos não se apresentou correlacionada com o tamanho da população ( $R_a = 1,7$  e  $1,8$ ). Os índices de diversidade genética total ( $D_g = 0,737665$ ) e heterizogiosidade ( $H_{obs} = 0,57054$ ) foram moderados. As duas populações mais amostradas (SSB e CO1) apresentaram valores positivos e significativos do coeficiente de endocruzamento ( $F_{is} = 0,259$  e  $0,206$ ; respectivamente).

*DNA Mitochondrial:* Para as análises intrapopulacionais (Tabelas 5 e 6), a análise dos 366 pb da região hipervariável da alça D-loop do DNAm<sub>t</sub> revelaram 13 sítios polimórficos e sete haplótipos, dos quais, três representam 78,1% da diversidade da população: H1 (43,7%), H5 (21,9%) e H2 (12,5%). H1 foi o único haplótipo na população SSB ( $n = 13$ ), sendo também encontrado em um indivíduo da população CO1, que corresponde à fêmea jovem translocada da sua população de origem (SSB; Mendes *et al.*, 2005b). Assim, pode-se dizer que o haplótipo H1 é originalmente exclusivo da população SSB, enquanto as demais populações compartilham três haplótipos (H2, H3 e H5). A diversidade haplotípica total e das populações RP1, RP2, CO1, CO2 e RCT foi moderada-alta ( $h_{total} = 0,7540$ ;  $0,7273 \leq h \leq 1,0000$ ), enquanto a diversidade nucleotídica total foi baixa para todas as populações ( $n_{total} = 0,010683$ ;  $0,000000 \leq n \leq 0,011516$ ), indicando que os haplótipos são distintos entre si por poucos passos mutacionais ( $\pi_{total} = 3,909804$ ;  $0,000000 \leq \pi \leq 4,214827$ ).

### **Evidências genéticas de gargalo e expansão populacional**

Para o DNA microssatélite, o teste que revela sinais genéticos de gargalo populacional não foi significativo para as populações individuais e para SMJ como um todo ( $P > 0,05$ ), o que não permite descartar a hipótese nula de equilíbrio populacional. Quanto às análises de distribuição *mismatch* do DNAm<sub>t</sub>, todas as populações testadas apresentaram curvas de distribuição multimodal e irregular, diferentes do esperado sob a hipótese de expansão populacional recente, o que indica estabilidade demográfica

(Figura 2a). No entanto, o teste da soma do desvio dos quadrados (SSD, Tabela 6) não foi significativo para as populações testadas, o que não permite rejeitar a hipótese nula de expansão, apesar de a população de CO1 e SMJ como um todo estarem próximas de serem significantes ( $P=0,072$  e  $0,059$ ; respectivamente). Os testes de neutralidade  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu não foram significativos ( $P>0,05$ ), o que não permite rejeitar a hipótese nula de equilíbrio populacional (Tabela 6).

### **Estruturação genética e barreiras para o fluxo gênico**

*DNA Microssatélite:* As populações apresentaram fraca estruturação genética entre si ( $F_{st}=0,0768$ ). Houve pouca distinção entre as populações devido à baixa frequência de alelos exclusivos (28,4%) e à heterozigosidade reduzida dentro de cada população ( $F_{is}=0,2264$ ) e entre todas as populações ( $F_{it}=0,2858$ ). Assim, há alta probabilidade de dois alelos de um indivíduo serem idênticos por descendência, o que sugere alelos pouco diferenciados entre os indivíduos. As análises de AMOVA revelaram que as variações dentro das populações foram as principais responsáveis pela variabilidade genética geral ( $F_{is}=0,14935$ ;  $P<0,05$  e  $F_{it}=0,22600$ ;  $P<0,05$ ). Ao contrário, variações entre as áreas dentro das populações (RP1-2 e CO1-2;  $F_{sc}=0,11920$ ) e entre as populações ( $F_{ct}=-0,03304$ ) não foram significativas ( $P>0,05$ ). Baixa diferenciação genética par-a-par foi significativa somente entre as populações SSB e CO1 ( $F_{st}=0,08221$ ;  $P<0,0033$ ). Nas análises globais, foi observada fraca diferenciação genética entre as populações com o teste de diferenciação de populações sem assumir HWE e o teste exato de diferenciação populacional ( $P<0,05$ ).

*DNA Mitochondrial:* As análises de AMOVA revelaram que as variações genéticas entre as populações foram as principais responsáveis pela variabilidade genética geral ( $\Phi_{st}=0,58013$ ;  $P<0,05$ ), indicando forte estruturação genética entre elas. Ao contrário, variações entre as áreas dentro das populações (RP1-2 e CO1-2;  $\Phi_{sc}=0,14052$ ) e dentro das áreas ( $\Phi_{ct}=0,51149$ ) não foram estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). Os índices de  $\Phi_{st}$  par-a-par foram altos e significativos somente entre indivíduos da população SSB e demais populações com mais de um indivíduo amostrado ( $0,65256 \leq \Phi_{st} \leq 0,94310$ ), revelando forte estruturação genética da população SSB. Considerando o haplótipo H1 original dessa população, pode-se observar a sua maior distinção quando comparada às outras populações também na rede de haplótipos, enquanto que não houve estruturação geográfica na distribuição dos demais haplótipos (Figura 2b). Quanto às distâncias entre as populações, o teste de Mantel não foi

significativo, o que não permite rejeitar a hipótese nula de não associação entre a distância genética e a distância geográfica ( $P>0,05$ ).

**Tabela 2.** Locos e primers de microssatélites, condições específicas da PCR, número de alelos por loco ( $N_a$ ), tamanho dos alelos, número de indivíduos genotipados ( $N_t$ ) e número de indivíduos homozigotos ( $N_{homo}$ ) e heterozigotos ( $N_{hetero}$ ).

Loco/Primer <sup>1</sup>	Condições de PCR			Na	Tamanho dos alelos (em pb)	Nt	N <sub>homo</sub>	N <sub>hetero</sub>
	MgCl <sub>2</sub> (mM)	BSA (g/L)	T <sup>o</sup> 1					
312 F e R	1,5	0,02	61°C	2	170 e 176	41	40	1
113 F e R	1,25	0,02	64°C	6	177, 179, 181, 183, 185 e 187	40	22	18
157 F e R	1,25	0,02	56°C	7	217, 219, 221, 223, 225, 227 e 229	41	10	31
1110 F e R	1,5	0,02	58° C	6	208, 210, 212, 214, 216 e 220	39	22	17
1115 F e R	1,5	0,02	59°C	10	190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206 e 212.	40	23	17
1118 F e R	1,0	0,04	58°C	11	132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 150, 154, 158 e 160	42	9	33

F=forward e R=reverse, descritas por Di Fiore e Fleischer (2004). 1. Temperatura de anelamento.

**Tabela 3.** Teste do desvio das frequências alélicas do esperado em HWE, número de indivíduos (n), proporção de heterozigotos de cada loco independente (*Hpr*) e presença de alelos nulos por loco (valores de P para HWE em negrito).

Loco	P-valor HWE por população						P-valor HWE Total (n=42)	<i>Hpr</i>
	SSB (n=15)	RP1 (n=4)	RP2 (n=1)	CO1 (n=19)	CO2 (n=1)	RCT (n=2)		
113	0,0010*	0,2032,	-	0,0021*	-	-	<b>0,0000*</b>	0,383
157	0,0086*	0,0767	-	0,7640	-	1,0000	0,0219*	0,833
1110	<b>0,0000*</b>	1,0000	-	0,0437*	-	-	<b>0,0000*</b>	0,584
1115	0,1075	1,0000	-	<b>0,0000*</b>	-	1,0000	<b>0,0000*</b>	0,542
1118	0,0515	0,3083	-	0,0170*	-	1,0000	0,0083*	0,693

(\*) Valores significativos de P (P<0,05) para HWE; (-) Valores não calculados.

**Tabela 4.** Diversidade genética intrapopulacional usando microssatélites, número de indivíduos (n), número médio de alelos (*Na*), número de alelos exclusivos (*Nap*), riqueza alélica (*Ra*), heterozigosidade observada (*H<sub>obs</sub>*) e esperada (*H<sub>esp</sub>*), diversidade genética (*Dg*) e coeficiente de endocruzamento (*Fis*).

População	n	<i>Na</i>	<i>Nap</i>	<i>Ra</i> <sup>1</sup>	<i>H<sub>obs</sub></i> (D.P.)	<i>H<sub>esp</sub></i> (D.P.)	<i>Dg</i> (D.P.)	<i>Fis</i> (p-valor)
SSB	15	5,8	6	1,7	0,52000 (± 0,25560)	0,69563 (± 0,08884)	0,695632 (± 0,406073)	0,259 (0,0017)*
RP1	4	3,6	0	1,7	0,50000 (± 0,11785)	0,69333 (± 0,12982)	0,666667 (± 0,476983)	0,318 (0,0217)
RP2	1	0,8	0	-	1,00000 (± 0,00000)	1,00000 (± 0,00000)	0,500000 (± 0,612372)	-
CO1	19	6,0	4	1,8	0,60626 (± 0,20197)	0,75868 (± 0,06319)	0,790896 (± 0,651687)	0,206 (0,0017)*
CO2	1	1,6	0	1,8	1,00000 (± 0,00000)	1,00000 (± 0,00000)	0,800000 (± 0,894427)	-
RCT	2	2,8	2	1,8	0,87500 (± 0,25000)	0,87500 (± 0,25000)	0,700000 (± 0,535240)	0,000 (1,0000)
Total	42	8,0	-	8,0	0,57054 (± 0,18342)	0,77401 (± 0,05991)	0,737665(± 0,432251)	0,265 (0,0100)*

D.P. Desvio Padrão. (\*) Valores significativos de P após correção de Bonferroni (P ≤ 0,0017 para populações individuais e P ≤ 0,01000 para a população total). (-) Valores não calculados. 1. Valor calculado para todas as populações que possuem pelo menos um indivíduo com todos os locos genotipados.



**Tabela 5.** Frequência de haplótipos de *B. hypoxanthus* por população de SMJ.

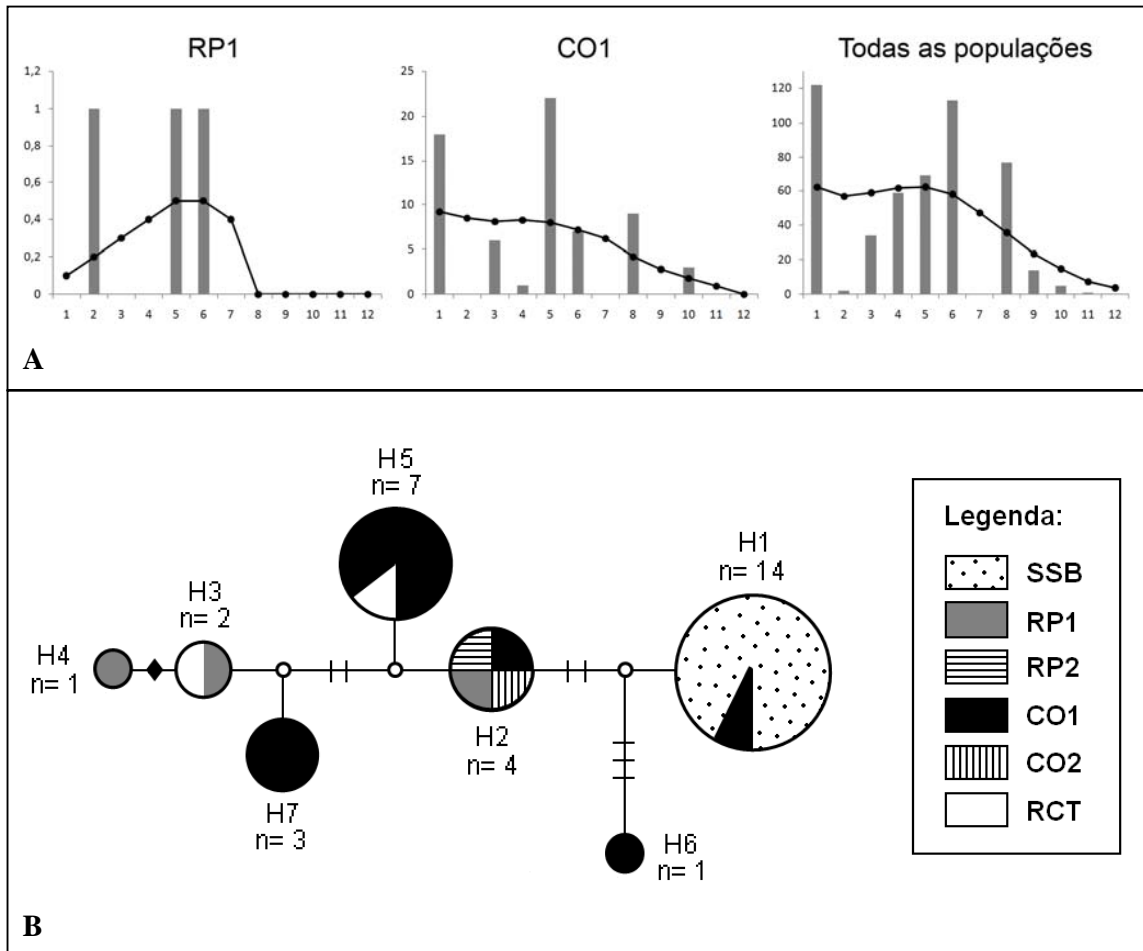
População	n	nH	Frequência relativa							
			H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	
SSB	13	1	1,0							
RP1	3	3		0,33	0,33	0,33				
RP2	1	1		1,0						
CO1	12	5	0,08	0,08			0,50	0,08	0,25	
CO2	1	1		1,0						
RCT	2	2			0,5		0,5			
Total	32	7	0,44	0,13	0,06	0,03	0,22	0,03	0,09	

(n). Número de indivíduos. (nH) Número de haplótipos.

**Tabela 6.** Índices de diversidade por população. Número de indivíduos amostrados (n), número de haplótipos (nH), número de sítios polimórficos (s), diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (n), número médio de diferenças par-a-par ( $\pi$ ), testes de distribuição de frequências pareadas (SSD) e valores dos testes *D* de Tajima e *F<sub>s</sub>* de Fu.

População	n	nH	s	h (D.P.)	n (D.P.)	$\pi$ (D.P.)	SSD (p-valor)	<i>D</i> (p-valor)	<i>F<sub>s</sub></i> (p-valor)
SSB	13	1	0	0,0000 ( $\pm 0,0000$ )	0,000000 ( $\pm 0,000000$ )	0,000000 ( $\pm 0,000000$ )	-	0,00000 (1,0000)	-
RP1	3	3	5	1,0000 ( $\pm 0,2722$ )	0,009697 ( $\pm 0,008361$ )	3,549163 ( $\pm 2,453537$ )	0,164743 (0,367)	0,00000 (0,8160)	-0,07696 (0,2360)
RP2	1	1	0	1,0000 ( $\pm 0,0000$ )	0,000000 ( $\pm 0,000000$ )	0,000000 ( $\pm 0,000000$ )	-	0,00000 (1,0000)	-
CO1	12	5	11	0,7273 ( $\pm 0,1133$ )	0,010254 ( $\pm 0,006260$ )	3,753117 ( $\pm 2,034851$ )	0,106702 (0,072)	-0,21473 (0,4440)	1,13429 (0,7450)
CO2	1	1	0	1,0000 ( $\pm 0,0000$ )	0,000000 ( $\pm 0,000000$ )	0,000000 ( $\pm 0,000000$ )	-	0,00000 (1,0000)	-
RCT	2	2	4	1,0000 ( $\pm 0,5000$ )	0,011516 ( $\pm 0,012809$ )	4,214827 ( $\pm 3,315086$ )	-	0,00000 (1,0000)	1,38629 (0,4560)
Total	32	7	13	0,7540 ( $\pm 0,0581$ )	0,010683 ( $\pm 0,006118$ )	3,909804 ( $\pm 2,013066$ )	0,059490 (0,059)	0,39260 (0,7030)	1,69278 (0,7940)

(\*) Valores significativos ( $P < 0,05$ ); (-) Valores não calculados.



**Figura 2.** A. Distribuição *mismatch* entre os indivíduos. Valores dos eixos X e Y referem-se aos números de diferenças e a suas freqüências, respectivamente. Colunas e linhas indicam valores observados e esperados (baseados no modelo de expansão populacional), respectivamente. B. Rede de haplótipos baseada na estatística Median Joining usando o programa NETWORK 4.201. Na rede, cada círculo identificado corresponde a um haplótipo, cujo tamanho é proporcional à sua freqüência na população; e círculos pequenos correspondem a haplótipos intermediários não detectados. Entre os haplótipos ocorre pelo menos uma mutação, sendo um número maior indicado por traços. Entre os haplótipos H3 e H4 ocorre a única transversão, representada por um losango.

## DISCUSSÃO

### Diversidade genética

Nossos dados revelaram diversidade genética moderada nas populações de *Brachyteles hypoxanthus* de Santa Maria de Jetibá, baseadas em análises com os marcadores do DNA mitocondrial e nuclear. A heterozigosidade observada por microssatélites foi mediana ( $H_{obs}=0,57054$ ) considerando os dados de outros primatas do Novo Mundo ( $0,330 \leq H_{obs} \leq 0,767$ ; Di Fiore & Fleischer, 2005; Amaral *et al.*, 2005; Menescal *et al.*, 2009; Milton *et al.*, 2009). Da mesma forma foi a diversidade haplotípica para DNAmT ( $h_{total}=0,7540$ ) comparada com outras espécies ameaçadas de extinção ( $0,569 \leq h \leq 0,956$ ; Eizirik *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Chiarello *et al.*, 2008). Para os dados de DNAmT, a diversidade haplotípica moderada foi seguida de baixa diversidade nucleotídica, indicando que poucos sítios são polimórficos e poucas são as mutações que diferenciam um haplótipo do outro.

Alvarenga (2008) analisou o DNAmT de oito das 12 populações remanescentes da espécie e observou os maiores valores de diversidade haplotípica para as populações do Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Parque Estadual Serra do Brigadeiro (PESB) e do município de Santa Maria de Jetibá (SMJ), respectivamente. Tal ordem também é mantida quando considerado o tamanho da área florestal das localidades, sendo que SMJ compreende em torno de 2.000 ha total de mata ao somar as áreas de 13 fragmentos isolados onde ocorrem populações de muriqui (Mendes *et al.*, 2005a). Com base nesses dados, uma análise de rarefação revelou que populações de *B. hypoxanthus* que vivem em áreas maiores mantêm significativamente mais haplótipos do que aquelas que são restritas a áreas menores (Paulo Chaves, comunicação pessoal), corroborando com a proposta de Frankham (1996) de que a variação genética tende a ser correlacionada positivamente com o tamanho da área de habitat. Dessa forma, a área de mata do município apresenta-se como um importante reservatório da diversidade genética da espécie.

Apesar da grande área florestada de SMJ, os níveis moderados de diversidade genética encontrados mostram-se surpreendentes frente ao cenário de fragmentação em que se encontram as populações (Mendes *et al.*, 2005a,b). Embora Aguirre (1971) tenha sugerido que as populações de *Brachyteles* sofreram um gargalo populacional desde o ano de 1500 por causa da redução e fragmentação de 93% da Mata Atlântica original (Morellato & Haddad, 2000; Myers *et al.*, 2000; IPEMA, 2005), o longo tempo de vida

da espécie pode ter amenizado os efeitos genéticos desses impactos (~35 anos; Strier, 1993/1994; 10-20 gerações), e dessa forma, não tenha ocorrido tempo suficiente para ter afetado dramaticamente a diversidade genética das populações, com perda significativa de diversidade.

Diversidade genética moderada-alta em ambos marcadores mitocondrial e nuclear já foi encontrada para outras espécies criticamente ameaçadas de extinção, como para o panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*; Zhang *et al.*, 2007) e a ave marinha petrel-magenta (*Pterodroma magentae*; Lawrence *et al.*, 2008). Segundo Zhang *et al.* (2007) as populações de pandas gigantes estão constantemente ameaçadas pela perda de habitat, fragmentação e impactos antrópicos. Devido à dieta específica, isolamento de habitat e a restrição reprodutiva, acreditava-se tratar de uma espécie “morta evolutivamente”, porém os dados genéticos não confirmaram essa suposição, mostrando grande diversidade genética nas populações. O exemplo do panda permite sugerir que a redução populacional e a perda de habitat podem ser recentes suficientes para não afetar drasticamente alguns elementos da diversidade genética, revelando-se como uma espécie ainda com potencial de viabilidade em longo prazo (Zhang *et al.*, 2007). Da mesma forma, Lawrence *et al.* (2008) constataram que as populações de petrel-magenta apresentam alta diversidade genética em ambos marcadores, apesar dessa ser uma das mais raras espécies de aves marinhas do mundo, com uma população de tamanho extremamente pequeno (entre 120 a 150 indivíduos). Uma das hipóteses dos autores é de que a população remanescente de petrel-magenta reteve uma proporção significativa da diversidade genética do passado (Lawrence *et al.*, 2008). Similarmente, *B. hypoxanthus* em SMJ parece apresentar potencial genético para viabilidade em longo prazo, apesar da situação em que se encontram as populações, sendo a maior de suas ameaças o número de indivíduos de cada população, e não a constituição genética de cada uma.

A diversidade nucleotídica nos muriquis de SMJ foi a menor quando comparada com dados de outros primatas ameaçados (Clifford *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2004; Kanthaswamy *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Considerando as gerações longas (Strier, 1993/1994) e o não descarte da hipótese de estabilidade populacional (presente estudo), a baixa diversidade nucleotídica pode consistir em uma característica intrínseca da espécie em SMJ devido à separação aparentemente recente das populações.

### **Diferenciação interpopulacional em Santa Maria de Jetibá?**

Os valores de diferenciação populacional foram contrastantes entre os dois marcadores utilizados. Verificamos fraca estruturação genética entre as populações com os dados de microssatélite, porém forte estruturação genética com dados de DNAmT, revelando a população SSB, que é distante e isolada por uma rodovia, distinta geneticamente das demais.

Para avaliar esses índices, vale salientar as características dos marcadores utilizados. Regiões do DNAmT são marcadores que não estão sujeitos à recombinação e possuem herança matrilinear (Awise & Hamrick, 1996), sendo por isso sensíveis para rastrear descendentes de linhagens maternas dentro e entre populações. Microssatélites são regiões do DNA nuclear e normalmente são transmitidos de modo biparental (Goldstein & Schlotterer, 1999). Essa diferença na transmissão dos alelos pode refletir diferentes aspectos da biologia e história populacional. O DNAmT é mais sensível do que o nuclear para detectar evidências de gargalos populacionais e flutuações randômicas nas frequências de haplótipos, porque o número efetivo populacional com DNAmT é quatro vezes menor do que com DNAn (assumindo proporção de sexos 1:1 e condição diplóide; Birky *et al.*, 1983). Apesar da região hipervariável I do DNAmT estar entre as mais variáveis no reino animal (Sbisà *et al.*, 1997), locos de microssatélites evoluem em taxas ainda maiores e, por causa de sua herança biparental, completam dados que eram perdidos por também fornecer informações sobre a contribuição dos machos para o fluxo gênico. Os microssatélites, portanto, podem ser particularmente informativos para detectar a estrutura entre populações recentemente colonizadas ou geograficamente próximas, devido sua geração mais rápida de novas mutações do que o DNAmT (Schug *et al.*, 1998).

Sendo assim, é mais provável que as populações analisadas apresentem fraca estruturação genética entre si, como observado para os dados de microssatélite. Associado a isso, os haplótipos do DNAmT apresentaram baixa diversidade nucleotídica e poucas diferenças par-a-par, o que apóia a interpretação de baixa estruturação das populações. Da mesma forma como observado para a diversidade genética, não teria ocorrido tempo suficiente para que a redução e isolamento das populações tenham afetado dramaticamente sua estrutura genética e, assim, provocado grandes diferenças entre elas, devido ao longo tempo das gerações (Strier, 1993/1994).

A predominância de um haplótipo (H1) para a população SSB pode ser explicada pelo efeito fundador, com posterior expansão populacional, corroborado pelo

coeficiente de endogamia  $F_{is}=0,259$  ( $P\leq 0,0017$ ) com DNAn. No entanto, dada diversidade genética moderada para ambos os marcadores e a falta de evidências genéticas de gargalo e expansão populacional (discutido adiante), esses fatores podem colocar em dúvida a influência direta do endocruzamento sobre o isolamento de um haplótipo em SSB, observado ainda o longo tempo das gerações. Associado ao fato de que as populações são pequenas e isoladas, pode-se sugerir também a deriva genética como responsável pela exclusividade do haplótipo H1 na população SSB. Dessa forma, é possível também que essa população tivesse originalmente poucas linhagens mitocondriais e que o isolamento populacional das demais, associada à ausência de fluxo gênico (promovido principalmente pelas fêmeas jovens) e a efeitos da deriva genética, levaria a perda dos haplótipos mais raros e a manutenção de um haplótipo (H1) mais freqüente.

Sendo assim, apesar dos efeitos da deriva ainda não se tornarem evidentes para os dados nucleares nessa área, os dados de DNAm<sub>t</sub> já sugerem falta de fluxo gênico entre a população SSB e as demais devido a falta de compartilhamento de haplótipos. O fato de não ter-se descartado a hipótese nula de falta correlação entre a distância genética e geográfica com os dados de DNAm<sub>t</sub> pode, ainda, sugerir que barreiras para o fluxo gênico como a fragmentação, distância entre as populações e rodovias nesse caso parecem não ter sido os principais motivos do isolamento dos indivíduos da população SSB. Ao contrário, pode-se propor o isolamento desses indivíduos por um longo período, já que as demais populações ainda compartilham alelos apesar do habitat desconectado.

Almeida Júnior (2006) já havia detectado que entre os anos de 1970 e 2005 houve maior incremento de mata do que desmatamento, de modo que atualmente a fragmentação encontra-se em um nível menor de que se encontrava na década de 70. Tais dados corroboram nossa hipótese de que as barreiras para o fluxo gênico atuais talvez não sejam os principais motivos de isolamento genético para o DNAm<sub>t</sub> da população SSB, já que as demais populações ainda apresentam diversidade e compartilham haplótipos entre elas apesar de também terem passado por um período em que a fragmentação foi mais intensa do que se encontra atualmente. Por outro lado, a existências de barreiras atuais podem ter auxiliado a manter a condição de isolamento, dado a maior dificuldade de migração de fêmeas jovens entre os fragmentos.

### **Desvios de HWE: gargalo populacional, endocruzamento ou deriva genética?**

O Teorema de Hardy-Weinberg consiste em um modelo nulo, em que uma população de tamanho ideal e com cruzamento aleatório não sofre pressão seletiva, não alterando, conseqüentemente, as frequências de alelos entre as gerações. A condição de Equilíbrio de Hardy-Weinberg é estimada avaliando a composição de alelos na população, de forma que é “esperado” que as frequências de alelos de um dado loco sejam mantidas constantes entre uma geração e outra quando em HWE (Hartl & Clark, 1997). Desvios do “esperado” podem ocorrer quando: (1) há pressão seletiva; (2) há mudanças drásticas no número de indivíduos da população; (3) não há cruzamentos aleatórios; (4) há diferenciação genética entre populações que tenham sido analisadas como uma única (efeito de Wahlund); ou (5) há má amostragem e/ou genotipagem (Hosking *et al.*, 2004). Dessa forma, em estudos de genética de populações o Teorema de Hardy-Weinberg funciona como um indicador de desvios das frequências genotípicas de uma população natural, que poderiam sugerir falha de uma ou mais premissas (Hartl & Clark, 1997).

As duas populações de SMJ mais amostradas (SSB e CO1) não se apresentaram em equilíbrio de HWE em pelo menos três dos cinco locos de microssatélites, quando analisadas individualmente. Ainda, considerando todos os indivíduos, nenhum dos locos analisados apresentaram-se em HWE. Sendo assim, é necessário avaliar as possíveis causas desse desvio e, dessa forma, a falha de alguma premissa:

(1) Populações sob pressão seletiva: o marcador de microssatélite é caracterizado por ser uma região do genoma que não sofre pressão seletiva (Goldstein & Schlotterer, 1999).

(2) Populações que sofreram mudanças drásticas no número de indivíduos: foi observada distribuição *mismatch* multimodal para o DNAm, o que indica estabilidade demográfica, com valores de P próximos de serem significativos para as populações mais amostradas. Da mesma forma, para ambos os marcadores não foi rejeitada a hipótese nula de equilíbrio populacional. Vale lembrar que os testes de gargalo populacional realizado para DNAn e os de *mismatch* e neutralidade do DNAm possuem seu poder estatístico aumentado com o número de loci e número de indivíduos amostrados, respectivamente (Simonsen *et al.*, 1995; Cornuet & Luikart, 1996; Fu, 1997; Luikart *et al.*, 1998). Tal relação pode ser observada pelos valores de P com o aumento do número de indivíduos amostrados na análise de *mismatch* para população

CO1 e para SMJ como um todo ( $P=0,072$  e  $0,059$ ; respectivamente). Sendo assim, para essas análises é sugerido o uso de oito a 10 loci de microssatélites e 30-50 indivíduos para resultados razoáveis de confiança (Simonsen *et al.*, 1995; Luikart *et al.*, 1998).

Diante disso, as conclusões a respeito desses dados devem ser feitas com cautela. No entanto, o exemplo observado para os dados de *mismatch* confere suporte para considerar a hipótese de estabilidade populacional. Adicionalmente, não foram encontrados indícios de partição filogeográfica ou contração/expansão populacional em oito populações de muriqui-do-norte analisadas (Paulo Chaves, comunicação pessoal), as quais incluem SMJ. De acordo com os autores, análises clássicas e Bayesianas mostram que padrão possivelmente seja atribuído pela contribuição conjunta da dispersão mediada por fêmeas, estabilidade demográfica, gerações longas e um tamanho populacional histórico grande.

(3) Populações que apresentam cruzamentos não-aleatórios: a deficiência de heterozigotos ( $0,206 \leq F_{is} \leq 0,259$ ;  $P \leq 0,0017$ ) das populações mais amostradas (SSB e CO1), assim como para a população de SMJ como um todo ( $F_{is}=0,265$ ;  $P \leq 0,01000$ ), sugere que há endocruzamento nessa população.

(4) Populações distintas geneticamente analisadas como únicas (efeito de Wahlund): foi observada fraca estruturação genética entre as populações com os dados de microssatélite e pouca diferenciação de alelos entre os indivíduos, o que sugere que as populações são poucos diferenciadas dentro e entre elas.

(5) Populações mal amostradas e/ou mal genotipadas: o presente estudo possui amostras de 42 dos 68 indivíduos estimados para as seis populações analisadas (Mendes *et al.*, 2005a; Rogério Ribeiro, comunicação pessoal), o que corresponde a 61,8% do total de indivíduos para uma espécie “criticamente em perigo” de extinção (Mendes *et al.*, 2008). Além disso, as populações SSB e CO1 foram 100% amostradas (Tabela 1), enquanto que para as populações RP2 e CO2, as quais apresentaram apenas um indivíduo amostrado cada, a realização desse teste não foi possível e conclusões a respeito delas necessitam de uma maior amostragem. Para a população RCT, apesar de apresentar uma pequena amostragem ( $n=2$ ), esta corresponde a dois terços da quantidade de indivíduos total ( $n=3$ ), conferindo maior suporte ao resultado de que a população está em HWE para os locos possíveis de serem analisados.

Quanto à genotipagem, mutações como substituições, inserções ou deleções no sítio de anelamento do primer podem gerar subestimativa de heterozigotos devido a não amplificação de certos alelos e, assim, sugerir a presença de alelos nulos (Goldstein &



Schlotterer, 1999). Em nosso estudo, alelos nulos foram sugeridos para três dos cinco locos analisados, considerando todas as populações, e para dois dos cinco locos considerando somente as populações SSB e CO1 individualmente. Porém, não foram os mesmos locos que apresentaram alelos nulos em cada análise individual, tornando inconsistente essa interpretação. Além disso, não foi sugerida a presença de alelos nulos para outros locos que também apresentaram desvios de HWE. Visto ainda que realizamos a genotipagem dos indivíduos com o protocolo de “múltiplos tubos” (Taberlet *et al.*, 1996) é sensato concluir que alelos nulos foram raros ou ausentes nos locos das populações analisadas. Além disso, problemas associados com genotipagem de microssatélites quando o DNA é obtido de amostras de fezes e pêlos são comuns (Goldstein & Schlotterer, 1999), pelo fato de cada loco possuir apenas duas cópias por genoma (diferente das múltiplas cópias do DNAm) e problemas estocásticos na amplificação ocorrerem. No entanto, no presente estudo não houve dificuldades de amplificação das amostras e quando ocorreram estas estiveram relacionadas à alta degradação do DNA em todos os locos e não específico de um determinado loco.

Analisadas as possíveis causas para o desvio de HWE, o endocruzamento mostrou-se mais provável, já que este foi positivo e significativo para as duas populações mais amostradas (SSB e CO1) e para a população com um todo. No entanto, indícios genéticos de endocruzamento normalmente estão associados à baixa diversidade genética e evidências genéticas de gargalo (Eldridge, *et al.* 1999; Collevatti, *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2008), o que não foi concretamente observado para essas populações. Sendo assim, a deficiência de heterozigotos observada para as populações pode ser a causa dos desvios de HWE, mas a diversidade genética moderada, a não rejeição da hipótese nula de estabilidade populacional e o longo tempo das gerações colocam em dúvida a pressão real causada pela influência do cruzamento entre indivíduos aparentados nessas populações, podendo esses desvios terem sido fortemente influenciados por outros fatores que apresentem consequências mais rápidas. Associado a esses fatores, não podemos descartar o fato de que as populações analisadas são pequenas e isoladas, o que levanta questões sobre os efeitos da deriva genética (Frankham *et al.*, 2002), os quais são mais rápidos e podem preceder consequências mais severas.

Efeitos da deriva sobre aspectos da diversidade genética já foram observados em outras espécies, como por exemplo, para a rena da Ilha de Esvabarda (*Rangifer tarandus*; Gravlund *et al.*, 1998; Côté *et al.*, 2002). De acordo com os autores, registros

prévios sugerem que essa espécie poderia ter passado por um gargalo populacional recente durante os séculos 19 e 20, quando o tamanho populacional foi reduzido devido à caça (Tyler, 1987; Côté *et al.*, 2002), sendo a espécie rara em 1910 e quase extinta em 1925, ano que se tornou protegida. Os índices de diversidade haplotípica para o DNAm foram cinco a 14 vezes menores na população da Ilha de Esvalbarda quando comparada com populações continentais (Gravlund *et al.*, 1998), assim como a heterozigosidade observada para dados de microssatélites (Côté *et al.*, 2002). No entanto, as análises populacionais não corroboraram a suposição de que a baixa diversidade genética estivesse associada com evidências genéticas de gargalo (Côté *et al.*, 2002). Nesse sentido, os autores se apoiaram na teoria de Frankham (1997) que diz que a diversidade genética tende a ser menor em populações que habitam ilhas do que em populações continentais devido ao maior efeito da deriva genética.

Seguindo essa linha de raciocínio, as populações de muriqui de SMJ apresentaram o terceiro maior índice de diversidade haplotípica ( $h_{total}=0,7540$ ) entre oito populações avaliadas pelo DNAm (Alvarenga, 2008), diferindo pouco do maior índice observado na população do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB;  $h=0,8456$ ). Sendo assim, nossos dados de DNAm não apresentam redução drástica na diversidade genética para a população de SMJ comparado com outras populações e análises com microssatélites deveriam ser realizadas para as demais, afim de torná-las comparáveis pelos dados de DNAn do presente estudo.

Apesar de ser uma espécie continental, em SMJ esta ocorre em habitats pequenos e altamente fragmentados, com populações remanescentes isoladas e em menor número de indivíduos (Mendes *et al.*, 2005a). Sabe-se que os fragmentos de mata em SMJ apresentam área entre 60 e 350 ha (Mendes *et al.*, 2005a), estes pequenos para manter a viabilidade populacional de muriquis a longo prazo (Coutinho, 2007). Além disso, a distância entre os fragmentos analisados no presente estudo varia de 1,33 Km (CO1–CO2) a 12,33 Km (SSB–RCT), sendo esse isolamento provavelmente o principal fator responsável pela dificuldade de dispersão de fêmeas jovens e, assim, pela alta probabilidade de extinção dessas populações em um período de 50 anos (Coutinho, 2007). Apesar das populações CO1-CO2 e RP1-RP2 apresentarem evidências de campo de troca de indivíduos, estas apresentam barreiras físicas de dispersão, tais como rios e estradas, respectivamente, com pontos de passagem restritos entre os fragmentos. Por fim, a população SSB apresenta-se ainda mais isolada das demais devido à presença de uma rodovia pavimentada e o maior desmatamento no entorno. Tais condições

apresentadas pelo município são semelhantes com a de pequenas ilhas, visto que a fragmentação da mata dificultaria ou até impediria a migração de fêmeas jovens (Mendes *et al.*, 2005b) e, portanto, o fluxo gênico entre as populações.

Como já citado, é provável que não tenha ocorrido tempo suficiente para que a redução e fragmentação da mata afetasse dramaticamente a diversidade genética das populações de muriqui e provocado perda significativa de diversidade. No entanto, os desvios de HWE, o déficit de heterozigotos para as populações SSB e CO1 e a falta de evidências genéticas de gargalo e expansão populacional já podem ser os indícios discretos dessa perda como resultado da deriva genética. Assim, a proposta de Frankham (1997) de que os efeitos da deriva tendem a serem maiores em populações insulares também pode ser aplicada aos muriqui de SMJ, que justificariam os primeiros sinais sutis de perda de diversidade.

### **Implicações para a conservação**

Apesar de estarem em um ambiente fragmentado, as populações de SMJ ainda apresentam diversidade genética moderada, com pouca estruturação genética geral, mas com sinais de isolamento de uma população (SSB). Devido ao longo tempo de vida da espécie é provável que não ocorreu tempo suficiente para que a redução e isolamento das populações tenham afetado dramaticamente a diversidade e estrutura genética dos indivíduos e provocado grandes diferenças entre as populações de SMJ. No entanto, nossos dados fornecem prováveis indícios de efeito da deriva genética, principalmente devido as populações estarem reduzidas e isoladas por um longo período.

Assim como cada espécie requer estratégias de manejo particulares, populações de uma espécie podem apresentar diferenças adaptativas ou genéticas significativas (Frankham *et al.*, 2002) que necessitem de planos de manejo próprios. A diversidade e estruturação genética são importantes ferramentas para a conservação e manejo, pois tais informações podem auxiliar na identificação de unidades genéticas distintas, ao fornecerem informações que ajudam a identificar Unidades Evolutivamente Significativas (UES) e Unidades de Manejo (UM; Moritz, 1994).

De acordo com o modelo proposto por Moritz (1994), UESs são designadas pela monofilia recíproca de marcadores mitocondriais e mostram divergência significativa na frequência de alelos de locos nucleares, enquanto UMs são reconhecidas como populações com divergência significativa na frequência de alelos de locos nucleares ou mitocondriais, apesar de não apresentarem monofilia recíproca de marcadores

mitocondriais. Seguindo esse critério, populações com genótipos que são fortemente relacionados com outras populações, mas que não os compartilham, deveriam ser descritos como UM (Liu et al., 2007).

Nossos dados não nos dão suporte para afirmar a existência de partições geográficas definindo populações isoladas dentro de SMJ, as quais deveriam ser vistas como UES. No entanto, estudos prévios com DNAm já definiram a população total de SMJ como um dos potenciais reservatórios do patrimônio genético da espécie e, portanto, uma UM. Visto a baixa diferenciação na frequência de alelos e o compartilhamento de haplótipos entre as populações, nossos dados fornecem suporte às conclusões prévias de que a população total de SMJ deve ser vista como uma unidade genética distinta, mas que suas populações em particular não devem ser tratadas como unidades diferenciadas.

Apesar das populações manterem uma proporção significativa da diversidade genética, o cenário atual de fragmentação permite que as populações estejam mais susceptíveis a sofrerem perdas significativas de diversidade com o passar do tempo (Frankham *et al.*, 2002). Coutinho (2007) avaliou a viabilidade populacional de muriquis nos fragmentos florestais de SMJ e concluiu que nove populações, as quais incluem as populações do presente estudo, apresentaram alta probabilidade de extinção e perda de pelo menos 25% da heterozigosidade em um período de 50 anos, principalmente devido ao isolamento e à dificuldade de dispersão de fêmeas jovens.

Alvarenga (2008) encontrou cinco haplótipos exclusivos para as populações de SMJ entre as oito populações analisadas. Desses cinco, destaca-se o haplótipo H1 como originalmente exclusivo da população SSB, observado no presente estudo, assim como entre as outras sete populações analisadas. A população de SMJ apresenta, portanto, grande diversidade perante o cenário que se encontra, mas com uma população aparentemente isolada das demais geneticamente. Assim, uma porção significativa da diversidade pode estar comprometida, visto que a população de SSB representa cerca de 40% do número de indivíduos analisados para DNAm. Sendo assim, a perda de haplótipos dessas populações, em especial o haplótipo H1 isolado, poderia representar uma perda significativa de diversidade para a espécie.

Dessa forma, pode-se sugerir que a manutenção da diversidade genética deve ser realizada por meio da estabilidade demográfica e proteção do habitat remanescente com medidas de conservação focadas na proteção e restauração do habitat. Visto que não há forte diferenciação entre as populações, uma proposta para a manutenção da diversidade

genética seria o aumento da área florestada com a unificação das populações mais próximas em uma primeira etapa (a médio prazo) e posterior unificação total das populações em uma segunda etapa (a longo prazo). O remanejamento de indivíduos entre áreas pode ser uma boa alternativa para manter a diversidade, visto que já houve um caso bem sucedido realizado no município (Mendes *et al.*, 2005b).

Baseados nessa proposta, testamos um cenário a médio prazo, no qual conectar-se-ia primeiramente as populações do lado esquerdo da rodovia (RP1, RP2, CO1, CO2 e RCT), mantendo a população SSB ainda isolada; e um cenário a longo prazo, conectando todas as populações. No cenário a médio prazo, o número médio de alelos aumentaria de 3,0 para 6,8 (aumento de 126,7%) para a nova população; a riqueza de alelos aumentaria da média de 1,42 para 6,3 (aumento de 343,7%); e o número médio de haplótipos aumentaria de 2,4 para 7 (aumento de 192%). Nesse cenário o grau de diferenciação entre as populações seria menor, com um  $F_{st}$  de 0,0768 reduzido para 0,0525 (redução de 31,6%).

No cenário a longo prazo o número médio de alelos aumentaria para 8,0 (aumento parcial de 17,6% e total de 166,7%) na nova população unificada; a riqueza de alelos aumentaria para 8,0 (aumento parcial de 27% e total de 463,4%); e o número de haplótipos se manteria o mesmo. Dessa forma, o ganho no aumento da variabilidade das populações é bastante significativo, e os esforços para direcionar o aumento das áreas florestadas podem ser valiosos para a espécie. Vale lembrar que o aumento das matas já está em planejamento (Projeto Corredores Ecológicos, [www.corredores.gov.br](http://www.corredores.gov.br)), de forma que esse trabalho confere suporte às iniciativas já realizadas.

## CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram diversidade genética moderada em populações de muriqui-do-norte, uma espécie “criticamente em perigo” de extinção (Mendes *et al.*, 2008), o que foi inesperado por estas ocuparem isoladamente habitats pequenos em um ambiente intensamente fragmentado. Apesar disso, fraca estruturação genética foi observada (DNAn), mas com sinais de isolamento genético para uma das populações (SSB com dados de DNAm), associado à desvios de HWE e valores significativos do coeficiente de endocruzamento para as duas populações mais amostradas (SSB e CO1). Tais indícios de perda de diversidade podem ser sinais dos efeitos da deriva genética, já que não se descartou a hipótese de estabilidade

populacional e devido ao longo tempo de duração das gerações da espécie (Strier, 1993/1994). Tais efeitos são congruentes com a proposta de que a deriva genética tende a ser mais intensa em populações insulares (Frankham, 1997), uma analogia aos fragmentos de mata de SMJ.

Diante desses dados, concluímos que as populações de SMJ em particular não devem ser tratadas como unidades diferenciadas, visto a baixa diferenciação na frequência de alelos e o compartilhamento de haplótipos entre a maioria das populações. Baseado nisso, simulações da diversidade genética mostram que o aumento da conectividade dos fragmentos florestais em SMJ a médio e longo prazo pode ser uma medida essencial para a recuperação, manutenção e conservação do miquiqui-do-norte no município.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Aguirre**, A.C. 1971. O Mono *Brachyteles arachnoides* (E. Geoffroy). Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

**Allendorf**, F.W. & Leary, R.F. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: Soulé, M.E. (ed.). Conservation biology: The Science of Scarcity and Diversity. Sinauer Associates. Sunderland, M.A. 57-76.

**Almeida Júnior**, H.C. 2006. Evolução da fragmentação de mata no município de Santa Maria de Jetibá. Universidade Federal do Espírito Santo. Departamento de Geografia. Monografia de Graduação. Vitória, ES.

**Alvarenga**, C.S. 2008. Variabilidade genética em oito populações de miquiqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus* Kuhl, 1820): uma espécie de primata criticamente em perigo de extinção. Universidade Federal do Espírito Santo. Departamento de Ciências Biológicas. Monografia de Graduação. Vitória, ES.

**Amaral**, J.M.J.; Simões, A.L. & De Jong, D. 2005. Allele frequencies and genetic diversity in two groups of wild tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigrinus*) living in an urban forest fragment. *Genetics and Molecular Research*. 4(4): 832-838.

**Avise**, J.C. 1989. Role of molecular genetics in recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution*. 4: 279-281.

**Avise**, J.C. & Hamrick, L. 1996. Conservation Genetics. Chapman & Hall, London.

**Birky**, C. W.; Maruyama, T. & Fuerst, P. 1983: An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*. 103: 513–527.

**Chaves**, P.B. 2005. Diversidade e Estrutura Genética de *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Atelidae). Universidade Federal do Espírito Santo. Departamento de Ciências Biológicas. Monografia de Graduação. Vitória, ES.

**Chiarello**, A.; Lara-Ruiz, P. & Members of the IUCN SSC Edentate Specialist Group. 2008. *Bradypus torquatus*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 09 de dezembro de 2009.

**Clifford**, S.L.; Anthony, N.M.; Bawe-Johnson, M.; Abernethy, K.A.; Tutin, C.E.G.; White, L.J.T.; Bermejo, M.; Goldsmith, M.L.; Mcfarland, K.; Jeffery, K.J.; W. Brufford, M.W. & Wickings, E.J. 2004. Mitochondrial DNA phylogeography of western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Molecular Ecology*. 13: 1551-1565.

**Cornuet**, J.M. & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 144: 2001-2014.

**Collevatti**, R.G.; Leite, K.C.E.; Miranda, G.H.B & Rodrigues, F.H.G. 2007. Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Myrmecophagidae), from Emas National Park, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 30 (1): 112-120.

**Côté**, S.D.; Dallas, J.F.; Marshall, F.; Irvine, R.J.; Langvatn, R. & Albon, S.D. 2002. Microsatellite DNA evidence for genetic drift and philopatry in Svalbard reindeer. *Molecular Ecology*. 11: 1923-1930.

**Coutinho**, B.R. 2007. Análise de viabilidade populacional do muriqui, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Atelidae), em fragmentos de Mata Atlântica de Santa Maria de Jetibá - Espírito Santo. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal. Dissertação de Mestrado. Vitória, ES.

**Dias**, L.G. & Strier, K.B. 2003. Effects of group size on ranging patterns in *Brachyteles arachnoides hypoxanthus*. *International Journal of Primatology*. 24 (2): 209-221.

**Di Fiore**, A. & Fleischer, R.C. 2004. Microsatellite markers for woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) and their amplification in other New World primates (Primates: Platyrrhini). *Molecular Ecology Notes*. 4: 246-249.

**Di Fiore**, A. & Fleischer, R.C. 2005. Social Behavior, Reproductive Strategies, and Population Genetic Structure of *Lagothrix poeppigii*. *International Journal of Primatology*. 26 (5): 1137-1173.

**Eizirik**, E.; Kim, J.H.; Menotti-Raymond, M.; Crawshaw, P.G.; O'Brien, S.J. & Johnson, W.E. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars *Panthera onca*, Mammalia, Felidae. *Molecular Ecology*. 10: 65-79.

**Eldridge**, M.D.B.; King, J.M.; Loupis, A.K.; Spencer, P.B.S.; Taylor, A.C.; Pope, L.C. & Hall, G.P. 1999. Unprecedented low levels of genetic variation and inbreeding depression in an island population of the Black-Footed Rock-Wallaby. *Conservation Biology*. 13 (3): 531-541.

**Eriksson**, J.; Hohmann, G.; Boesch, C. & Vigilant, L. 2004. Rivers influence the population genetic structure of bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*. 13: 3425–3435.

**Excoffier**, L.; Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.

**Fagundes**, V. 2005. Conservation genetics of the muriqui: past, present and future. *Neotropical Primates. Special Number*. 13 (Suppl): 85-91.

**Fagundes**, V.; Paes, M.F.; Chaves, P. B.; Mendes, S.L.; Strier, K.; Possamai, C.B. & Boubli, J.P. 2008. Genetic structure within the northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*, Atelinae, Primates) inferred by fecal DNA and PCR-RFLP analysis. *Genetics and Molecular Biology*. 1 (0): 1-11.

**Frankham**, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*. 10: 1500-1508.

**Frankham**, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*. 78: 311–327.

**Frankham**, R.; Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Cambridge.

**Fu**, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915–925

**Glaubitz**, J.C. 2004. Convert: a user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*. 4: 309–310.



**Goldstein**, D.B. & C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, 368p.

**Goudet**, J. 1995. FSTAT, version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *Heredity*. 86: 485-486.

**Gravlund**, P.; Meldgaard, M.P.; Pääbo, S. & Arctander, P. 1998. Polyphyletic origin of the small-bodied, high-Arctic subspecies of tundra reindeer (*Rangifer tarandus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10: 151–159.

**Hartl**, D.L. & Clark, A.G. 1997 *Principles of Population Genetics*. 3 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 542 p.

**Hosking**, L.; Lumsden, S.; Lewis, K.; Yeo, A.; McCarthy, L.; Bansal, A.; Riley, J.; Purvis, I. & Xu, C.F. 2004. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *European Journal of Human Genetics*. 12 (5): 395-399.

**IPEMA**, 2005. *Conservação da Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo: Cobertura Florestal e Unidades de Conservação*. Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade-Conservação Internacional do Brasil. Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, Vitória.

**Kanthaswamy**, S.; Kurushima, J.D. & Smith, D.G. 2006. Inferring Pongo conservation units: a perspective based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Primates*. 47: 310–321.

**Lande**, R.R. 1998. Criação e relocação de cutias *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823 (DASYPROCTIDAE, MAMMALIA) em área verde urbana. Dissertação de Mestrado, Curitiba-PR.

**Lawrence**, H.A.; Taylor, G.A.; Millar, C.D. & Lambert, D.M. 2008. High mitochondrial and nuclear genetic diversity in one of the world's most endangered seabirds, the Chatham Island Taiko (*Pterodroma magenta*). *Conservation Genetics*. 9: 1293-1301.

**Liu**, Z.; Ren, B.; Wei, F.; Long, Y.; Hao, Y. & Li, M. 2007. Phylogeography and population structure of the Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*) inferred from mitochondrial control region DNA sequence analysis. *Molecular Ecology*. 16: 3334-3349.

**Luikart**, G.; Allendorf, F.W.; Cornuet, J.M. & Sherwin, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The Journal of Heredity*. 89: 238-247.

**Martins**, W.P.; Gonçalves, P.O. & Garcia, Q.S. 2003. Germinação de sementes de algumas espécies dispersadas por muriquis (*Brachyteles hypoxanthus*) na RPPN Feliciano Miguel Abdala, Caratinga, MG. Anais do II Congresso Brasileiro de Mastozoologia, Belo Horizonte.

**Mendes**, S.L.; Melo, F.R.; Boubli, J.P.; Dias, L.G.; Strier, K.B.; Fagundes, V.; Consenza, V.B. & De Marco Jr., P. 2005a. Directives for the conservation of northern muriqui, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates, Atelidae). *Neotropical Primates. Special Number*. 13 (Suppl): 7-18.

**Mendes**, S.L.; Santos, R.R. & Carmo, L.P. 2005b. Conserving the Northern Muriqui in Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo. *Neotropical Primates. Special Number*. 13 (Suplemento): 31-35.

**Mendes**, S.L., de Oliveira, M.M., Mittermeier, R.A. & Rylands, A.B. 2008. *Brachyteles hypoxanthus*. Em: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2009.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 16 de novembro de 2009.

**Menescal**, L.A.; Gonçalves, E.C.; Silva, A.; Ferrari, S.F. & Schneider, M.P.C. 2009. Genetic diversity of Red-Bellied Titis (*Callicebus moloch*) from Eastern Amazonia Based on Microsatellites Markers. *Biochemistry and genetics*. 47: 235-240.

**Milton**, K.; Lozier, J.D. & Lacey, E.A. 2009. Genetic structure of an isolated population of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. *Conservation Genetics*. 10: 347-358.

**Mittermeier**, R.A.; Valle, C.M.C.; Alves, M.C.; Santos, I.B.; Pinto, C.A.M.; Strier, K.B.; Young, A.L.; Veado, E.M.; Constable, I.D.; Paccagnella, S.G. & Lemos de Sá, R.M. 1987. Current distribution of the muriqui in the Atlantic Forest region of Eastern Brazil. *Primate Conservation*. 8: 143-149.

**Morellato**, L.P.C. & Haddad, C.F.B. 2000. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*. 32 (4): 786-792.

**Morgan**, M.J.; Hunter, D.; Pietsch, R. & Osborne, W. 2008. Assessment of genetic diversity in the critically endangered Australian corroboree frogs, *Pseudophryne corroboree* and *Pseudophryne pengilleyi*, identifies four evolutionarily significant units for conservation. *Molecular Ecology*. 17: 3448-3463.

**Moritz**, C. 1994. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Tree*. 9 (10): 373-375.

**Myers**, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403: 853-858.

**van Oosterhout**, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P. & Shipley, P. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4: 535–538.

**Paetkau**, D. & Strobeck, C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*. 3: 489–495.

**Posada**, D. & Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14 (9): 817-818.

**Primack**, R.B. & Rodrigues, E., 2001. Biologia da Conservação. Londrina. Planta.

**Raymond**, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86:248-249

**Rice**, W.R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.

**Rogers**, A.R. & Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 552-559.

**Rowe**, N. 1996. The Pictorial Guide to the Living Primates. East Hampton: Pogonias Press, 236p.

**Sbisà**, E.; Tanzarillo, F.; Reyes, A.; Pesole, G. & Saccone, C. 1997 Mammalian mitochondrial D-loop region structural analyses: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*. 205: 125-140.  
DNA. *Genetics*. 152: 1079-1089.

**Schug**, M.D.; Hutter, C.M.; Wetterstrand, K.A.; Gaudette, M.S; Mackay, T.F.C. & Aquadro, C.F. 1998. The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology Evolution*. 15: 1751–1760.

**Simonsen**, K.L.; Churchill, G.A. & Aquadro, C.F. 1995. Properties of statistical test of neutrality for DNA polymorphism data. *Genetics*. 141: 413-429.

**Smith**, T.B.; Bruford, M.W. & Wayne, R.K. 1993. The preservation of process: the missing element of conservation programs. *Biodiversity Letters*. 1: 164-167.

**Strier**, K.B. 1993/1994. Viability analysis of an isolated population of muriquis monkeys (*Brachyteles arachnoides*): Implications for primate conservation and demography. *Primate Conservation*. 14-15: 43-52.

**Strier**, K.B. & Ziegler, T.E. 2000. Lack of pubertal influences on female dispersal in muriqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*). *Animal Behaviour*. 59: 849-860.

**Taberlet, P.;** Griffin, S.; Goossens, B.; Questiau, S.; Manceau, V.; Escaravage, N.; Waits, L.P. & Bouvet, J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*. 24 (16): 3189-3194.

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

**Tamura, K. & Nei, M.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology Evolution*. 10: 512-526.

**Tyler, N.J.C.** 1987. Natural Limitation of the Abundance of the High Arctic Svalbard Reindeer. PhD Thesis, University of Cambridge, Cambridge.

**Wagner, H.W. & Sefc, K.M.** 1999. Identity 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.

**Zhang, B.;** Ming, L.; Zhang, Z.; Goossens, B.; Zhu, L.; Zhang, S.; Hu, J.; Bruford, M.W. & Wei, F. 2007. Genetics Viability and Population History of the Giant Panda, Putting an End to the “Evolutionary Dead End”? *Molecular Biology and Evolution*. 24 (8): 1801-1810.

**ANEXO.** Espécimes utilizados no presente estudo (número MUR) e seus respectivos genótipos e haplótipos.

Área	Indivíduo		Genótipos por loco microsatélite												Haplótipo mtDNA
	MUR	Sexo	113	157	312	1110	1115	1118							D-loop
SSB	1	?	179	185	225	227	170	170	214	214	194	194	144	160	-
	2	F	179	185	223	223	170	170	216	216	194	206	140	142	h20
	3	?	183	183	227	227	170	170	208	208	194	194	144	160	-
	5	F	179	185	223	227	170	170	212	214	194	194	138	154	h20
	6	F	179	181	219	219	170	170	220	220	194	198	138	140	h20
	23	M	179	185	223	227	170	170	212	212	206	206	142	142	h20
	61	F	185	185	225	229	170	170	214	216	194	202	138	154	h20
	62	M	185	185	225	229	170	170	214	214	194	194	142	154	h20
	65	F	183	183	223	227	170	170	212	212	198	200	142	154	-
	66	M	179	185	223	227	170	170	212	212	194	204	138	142	h20
	67	M	185	185	221	225	170	170	212	212	192	198	142	154	h20
	119	F	177	183	227	227	170	170	212	212	194	194	142	154	h20
	131	M	185	185	227	227	170	170	212	212	194	194	142	154	h20
	135	F	183	183	225	227	170	170	214	216	194	194	142	154	h20
	141	F	183	183	225	229	170	170	212	212	194	194	142	142	h20
	240	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	h20
RP1	228	?	187	187	221	227	170	170	212	216	194	200	134	138	h3
	230	M	0	0	225	225	170	170	0	0	194	194	138	138	h22
	233	F	185	185	225	225	170	170	212	214	194	194	140	140	-
	238	?	179	185	219	229	170	170	216	216	194	206	136	138	h21
RP2	236	?	183	183	221	229	0	0	0	0	196	200	138	138	h3
CO1	64	M	181	181	219	223	170	170	212	214	194	194	142	158	-
	132	F	183	187	219	221	170	170	216	216	202	202	134	142	-
	133	F	185	187	219	221	170	170	210	214	0	0	136	144	-
	134	M	185	187	221	225	170	170	214	214	206	206	144	150	h19
	137	M	183	183	221	225	170	170	212	214	206	206	144	144	-
	139	M	185	187	221	227	170	170	212	214	194	194	142	158	h23
	217	F	185	187	217	219	170	170	210	214	194	198	138	144	h19
	219	M	183	185	223	227	170	170	214	214	202	206	144	144	h19
	220	M	183	183	219	221	170	170	210	214	194	194	142	158	h1
	221	M	183	183	223	225	170	170	210	214	196	212	142	158	-
	222	F	183	183	219	225	170	170	210	210	198	198	134	142	h1
	224	F	181	185	219	221	170	170	214	214	200	200	134	142	h3
	229	M	183	183	221	223	170	170	210	214	198	198	142	158	h19
	231	F	183	183	219	219	170	170	214	216	192	194	142	158	h1
	232	F	181	183	219	225	170	170	214	216	194	198	136	158	h19
	234	F	183	183	219	219	170	170	216	216	200	200	144	158	-
235	M	183	183	223	223	170	170	216	216	192	194	138	144	h19	
237	F	0	0	0	0	170	170	0	0	0	0	142	142	-	
60	F	179	185	223	227	170	170	212	212	194	194	142	142	h20	
CO2	68	F	181	185	217	219	170	170	214	216	202	202	134	142	h3
RCT	110	F	185	185	217	219	170	176	212	212	198	202	136	142	h19
	111	F	185	185	221	227	170	170	212	214	190	194	132	144	h21

**MUR:** código de cada indivíduo. **F.** Fêmea. **M.** Macho. **(?)** Indivíduo não identificado. **(0).** Não genotipado. **SSB:** São Sebastião de Belém, **RP1:** Rio das Pedras 1, **RP2:** Rio das Pedras 2, **CO1:** Córrego do Ouro 1, **CO2:** Córrego do Ouro 2. **RCT:** Rio Claro-Triunfo.