

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE UMA POPULAÇÃO
DO GÊNERO *Callithrix* DO SUDESTE DO BRASIL”**

BRUNA MENDONÇA SANTOS

BOTUCATU, SP

Novembro, 2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DE UMA POPULAÇÃO
DO GÊNERO *Callithrix* DO SUDESTE DO BRASIL”**

BRUNA MENDONÇA SANTOS

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Animais Selvagens, área de Clínica-Cirúrgica, Saúde e Meio Ambiente, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, campus de Botucatu, como parte dos critérios para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Ass. Lígia Souza Lima Silveira da Mota

BOTUCATU, SP

Novembro, 2021

S237c Santos, Bruna Mendonça
Caracterização genética e morfológica de uma população do gênero *Callithrix* do Sudeste do Brasil. / Bruna Mendonça Santos. -- Botucatu, 2021
47 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientadora: Lígia Souza Lima Silveira da Mota

1. Primatas. 2. Híbridos. 3. Hibridação antropogênica. 4. Biologia molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os jovens cientistas brasileiros que têm desenvolvido seu trabalho com muito esforço e persistência, mesmo em meio ao crescente corte de verbas que busca diminuir a qualidade de nossa educação e pesquisas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Universo, por todas as possibilidades ofertadas a mim e pelo caminho que tem me guiado, o qual se mostrou tão complexo e belo.

Agradeço à minha família e amigos pelo apoio nesta jornada cheia de curvas, pelos ouvidos atentos e braços abertos quanto às minhas queixas, titubeações e pequenas vitórias.

Agradeço também a minha orientadora, Dra. Lígia Mota, por ter me acolhido em uma área onde eu não tinha conhecimento algum, e me ensinou por meio de palavras e exemplos, desde técnicas laboratoriais e escrita acadêmica, até a persistência que uma cientista e educadora devem ter.

Sou muito grata por ter integrado o Laboratório de Genética Animal (LGA) e ter conhecido pessoas incríveis que sempre me ajudaram em todas as etapas do meu projeto, se mostrando solícitas. A vida acadêmica tem seus percalços, mas estes são muito mais fáceis de enfrentar ao lado de companheiros gentis e resilientes, que te fazem sentir confortável e bem-vinda todo o tempo.

Agradeço à UNESP e ao JBMB por terem aceito a mim e ao meu projeto, bem como fornecido suporte para realização do mesmo.

Agradeço aos funcionários de ambas as instituições e todos que colaboraram financeiramente para que esta dissertação fosse concluída.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, de tal forma que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática.

Paulo Freire

SANTOS, B. M. Caracterização genética e morfológica de uma população do gênero *Callithrix* do Sudeste do Brasil. Botucatu, 2021. 47p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) são espécies endêmicas do Nordeste e do Centro-Oeste e parte do Nordeste, respectivamente, no Brasil. Atualmente ambas espécies estão distribuídas em diferentes regiões do país. A introdução de animais exóticos é a segunda maior causa de perda de biodiversidade no mundo e pode impulsionar a hibridação. Em Bauru, São Paulo (SP), há registro de ambas espécies, bem como animais apresentando padrões intermediários entre estas. Assim, este trabalho visou identificar indivíduos do gênero *Callithrix* presentes no Jardim Botânico Municipal de Bauru (JBMB) quanto à classificação pura ou híbrida, por meio de marcadores morfológicos e moleculares. Foram amostrados 10 indivíduos, sendo 4 de espécies puras para controle e 6 de vida livre, os quais foram fotografados, medidos morfometricamente e dos quais foram amplificados fragmentos dos genes mitocondriais COI e a região D-loop. Como resultado, todos os animais mostraram padrões intermediários entre ambas as espécies, as sequências obtidas para D-loop mostraram uma alta diversidade haplotípica (h), baixa diversidade nucleotídica (π) e valores de F_s de F_u e D de Tajima não significantes, logo é possível inferir que os animais estudados continuam recebendo fluxo gênico e que a população se iniciou a partir de um efeito fundador. Dados morfológicos e moleculares indicam que os indivíduos amostrados são híbridos. A partir dos dados gerados por esta pesquisa, é possível inserir o manejo destes animais na Unidade de Conservação (UC), com o intuito principal de evitar o crescimento da população e consequências decorrentes.

SANTOS, B. M. Caracterização genética e morfológica de uma população do gênero *Callithrix* do Sudeste do Brasil. Botucatu, 2021. 47p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The Common marmoset (*Callithrix jacchus*) and Black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*) are endemic species in the Northeast, East Central and part of the Northeast, respectively in Brazil. Currently, both species are distributed in different regions of the country. The introduction of exotic animals is the second biggest cause of biodiversity loss in the world and can lead to hybridization. In Bauru, São Paulo (SP), there is a record of both species, as well as animals showing intermediate patterns between them. Thus, this work aimed to identify individuals of the genus *Callithrix* present in The Municipal Botanical Garden of Bauru (MBGB) as pure or hybrids, through morphological and molecular markers. Ten individuals were sampled, 4 of which were pure species for control and 6 free-living, which were photographed, morphometrically measured and from which the fragments of the mitochondrial genes COI and D-loop region were amplified. As results, all animals showed intermediate patterns between both species. After analyzing the sequences obtained for D-loop and obtaining a high haplotypic diversity (h), low nucleotide diversity (π), Tajima D and Fu's F_s statistic, it is possible to infer that the animals in the area continue receiving gene flow and the population began from a founder effect. Morphological and molecular data indicate that the individuals sampled are hybrids. From the data generated by this research, it is possible to include the management of these animals in the Conservation Unit (UC), with the main purpose of avoiding population growth and its outcomes.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figure 1:** The delimitation of Municipal Botanical Garden of Bauru and sample capture area highlighted in a red circle15
- Figure 2 (C1 to C8):** *Callithrix* sp. samples showing intermediate characteristics between *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*21
- Figure 3:** Individuals C2 and C6 showing pattern differences on their bodies and tails.....22
- Figure 4:** Haplotype (H) network for *Callithrix* sp. based on a 795 base pair (bp) sequence of the mitochondrial DNA control region (D-loop). Circle size is proportional to haplotype frequency. The haplotypes correspond to H1 (C1 and C3), H2 (C4), H3 (C7), H4 (C8), H5 (CH195), H6 (CJ156) and H7 (M99, M108 and M177) respectively.....23

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Espécimes característicos das espécies sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) e sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), respectivamente.....33
- Figura 2** - Distribuição espacial das espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*.....34

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II

- Table 1:** Biometrical data from the MBGB individuals 20
- Table 2:** Variable sites found in 7 haplotypes (H) of *Callithrix* sp. The first 6 sequences belong to hybrids (from MBGB and Cempas), the others belong to 1 *Callithrix jacchus* (from CEMPAS) and 3 *Callithrix penicillata* (from Sagui Legal) respectively.....30

ABREVIATURAS E SIGLAS

APA – Área de Proteção Ambiental

COI - Citocromo C oxidase subunidade I

cm - centímetros

D-loop – região controle do DNA mitocondrial

g - gramas

h – diversidade haplotípica

HHV-1 - Herpes simplex -1

HVR1/HVR2 - Hypervariable region 1; hypervariable region 2.

IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.

JBMB ou MBGB – Jardim Botânico Municipal de Bauru; Municipal Botanical Garden of Bauru

MMA – Ministérios do Meio Ambiente

mtDNA – DNA mitocondrial

nDNA – DNA nucleico

PNH ou NHP – primata(s) não-humano(s); non human primates

RVS – Refúgio de Vida Silvestre

SNUG – Sistema Nacional de Unidades de Conservação (National System of Conservation Units)

UC – Unidade de Conservação

π – diversidade nucleotídica

\approx - aproximadamente

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	06
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	06
2. OBJETIVOS	08
2.1. Gerais	08
2.2. Específicos	08
CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTIFICO	10
Abstract	11
Introduction	12
Methods	15
Results	19
Discussion	24
References	27
CAPÍTULO III – REVISÃO DE LITERATURA	31
1. PRIMATAS	31
2. GÊNERO <i>CALLITHRIX</i>	32
2.1. <i>Callithrix</i> sp. como exóticos e invasores	32
3. HIBRIDAÇÃO	35
4. BIOLOGIA MOLECULAR	36
4.1. Marcadores mitocondriais	37
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	38

CAPÍTULO I

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os saguis são primatas pertencentes ao gênero *Callithrix* (Erxleben, 1777) e estão restritos ao território brasileiro (NAKAMURA, 2009). *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) e *Callithrix penicillata* (Étienne Geoffroy, 1812) são animais de pequeno porte e podem ser encontrados em matas ciliares, florestas de galeria, florestas semidecíduas, cerrado e em contato com áreas urbanas, adequando-se aos locais com atividade antrópica (AHLBORN, ROTHE, 1999; MIRANDA, FARIA, 2001; NAKAMURA, 2009). Atualmente, de acordo com a IUCN (International Union for Conservation of Nature - União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais), possuem *status* pouco preocupante (LC – Least Concern), apesar das populações estarem em declínio.

Indivíduos pertencentes à espécie *C. penicillata* (Sagui-de-tufo-preto) são considerados endêmicos da região Centro-Oeste e parte do Nordeste do Brasil, ocorrendo comumente nas áreas de Cerrado e Mata Atlântica (floresta semidecídua e floresta pluvial perenifólia atlântica), além de Caatinga (DE VIVO, 1991; SILVA, SILVA, TERRA, 2018), enquanto, os indivíduos *C. jacchus* (Sagui-de-tufo-branco), são endêmicos da região Nordeste do Brasil, estando hoje distribuídos também pelas regiões Norte e Sudeste do país (MALUKIEWICZ et al., 2014). A distribuição atual destas espécies por diferentes regiões do país se dá principalmente por serem animais frequentemente traficados e vendidos como pet (LEVACOV, JERUSALINSKY, FIALHO, 2011).

A introdução de animais exóticos pode interferir no ambiente de diversas formas, alterando processos ecológicos importantes, sendo considerada a segunda maior causa de perda de biodiversidade no mundo (VITOUSEK et al., 1997; PEREIRA et al., 2005; SILVA, 2009). Tal introdução de espécies em áreas não naturais pode inclusive impulsionar a ocorrência de hibridação. A

hibridação pode ter implicações para a conservação de primatas não-humanos (PNH), principalmente quando induzidas por atividade humana. Apesar disso, estudos sobre hibridização nestes animais e zonas de hibridação ainda são escassos (CORTÉS-ORTIS, ROOS, ZINNER, 2019).

Como relatado por De Paula et al. (2005), em Bauru, São Paulo (SP), há registro das espécies *C. penicillata* e *C. jacchus*, bem como têm sido observados animais apresentando padrões morfológicos intermediários entre essas espécies, sendo prováveis híbridos de ambas. O Jardim Botânico Municipal de Bauru (JBMB), situado na mesma cidade, é uma instituição voltada à conservação das plantas (CARDOSO, 2013) e sua área de vegetação natural abrange dois *hostspots* de biodiversidade mundiais: Cerrado e Mata Atlântica. Até o ano de 2018 fazia parte da Área de Proteção Ambiental (APA) Vargem limpa – Campo Novo quando, a partir do Decreto Estadual nº 63.893, passou a integrar o Refúgio de Vida Silvestre (RVS) Aimorés, uma classificação de Unidade de Conservação (UC) de proteção integral.

Desde 2018 o JBMB tem realizado uma campanha de educação ambiental intitulada “Eu Curto Sagui – Ele lá, eu aqui”, que visa orientar a população a não oferecer alimentos nem ter contato com os saguis, evitando possíveis acidentes. A campanha surgiu da necessidade da instituição de intervir no comportamento do público visitante que favorecia a aproximação e reprodução dos PNH (SANTOS, CARDOSO, KNOLL, 2020). Para que o JBMB e outras instituições e municípios com quadro semelhante consigam manejar a presença de saguis e outros animais invasores da melhor forma, são necessárias informações etológicas, ecológicas e genéticas.

Por conseguinte, o presente trabalho visou identificar por meio da associação entre técnicas de biologia molecular e morfologia, indivíduos do gênero *Callithrix* presentes no JBMB quanto à sua espécie ou classificação híbrida, facilitando propostas de manejo. Além disso, pretende-se fornecer subsídios à vigente campanha de educação ambiental do JBMB, proporcionando melhoria da qualidade da saúde pública e do hábito de vida dos saguis, bem como de outros animais pertencentes à fauna local, uma vez que com a diminuição de sua população em zona urbana, diminuem as

chances de transmissão de doenças como herpes humana (HHV-1), raiva, varíola e sífilis (AGUIAR et al., 2012; CASAGRANDE et al., 2014; NAKAMURA, 2009). Planeja-se também a diminuição da interferência humana no hábito de forrageio, saúde, nutrição e reprodução dos saguis, bem como o impacto da predação e competição por recursos dos *Callithrix* sp. sobre espécies nativas.

O presente trabalho está dividido em capítulos conforme segue:

- Capítulo I: Considerações iniciais.
- Capítulo II: Apresentação do trabalho científico em forma de artigo conforme normas da revista.
- Capítulo III: Revisão de literatura sobre a biologia de *Callithrix* sp., causas e efeitos de espécies exóticas invasoras, hibridação entre espécies e utilização de biologia molecular para investigação de dados genéticos de diferentes espécies.

2. OBJETIVO

2.1. Gerais

O presente trabalho tem como objetivo principal utilizar os dados obtidos nesta pesquisa para inferir sobre a presença ou ausência de híbridos do gênero *Callithrix* no JBMB, fornecendo subsídios para o aprimoramento de programas sustentáveis de manejo das espécies nesta e em outras instituições públicas ou privadas.

2.2. Específicos

- Obter sequências parciais de DNA para os genes mitocondriais COI e Dloop dos espécimes de *C. penicillata* e *C. jacchus*.
- Caracterizar morfológicamente os indivíduos do JBMB empregando registros fotográficos e parâmetros morfométricos.
- Caracterizar geneticamente os indivíduos do JBMB utilizando como ferramenta a região controle do DNA mitocondrial (D-loop).

- Constatar a ocorrência de hibridação.
- Contribuir para a elaboração de estratégias adequadas para o manejo de *Callithrix* sp. e conservação no JBMB, bem como em demais instituições.

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser submetido à revista *Primates* (ISSN 0032-8332). Normas disponíveis em: <https://www.springer.com/journal/10329/submission-guidelines>).

TITLE: Genetic and morphological characterization of a population of the genus *Callithrix* from Southeastern Brazil.

AUTHORS

Bruna Mendonça Santos

ORCID 0000-0002-8711-2739

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

E-mail (corresponding author): bruna.mendonca@unesp.br

Talita Roberto Aleixo

ORCID 0000-0002-4767-6505

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Larissa Pereira Rodrigues

ORCID 0000-0002-7901-9411

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Pedro Paulo de Oliveira Nogueira

ORCID 0000-0001-8041-565X

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Daniel Angelo Felippi

ORCID 0000-0002-8552-5126

Graduate Program in Wild Animals, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Lígia Souza Lima Silveira da Mota

ORCID 0000-0003-4513-753X

Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Abstract

The Common marmoset (*Callithrix jacchus*) and Black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*) are endemic species in the Northeast, East Central and part of the Northeast, respectively in Brazil. Currently, both species are distributed in different regions of the country. The introduction of exotic animals is the second biggest cause of biodiversity loss in the world and can lead to hybridization. In Bauru, São Paulo (SP), there is a record of both species, as well as animals showing intermediate patterns between them. Thus, this work aimed to identify individuals of the genus *Callithrix* present in The Municipal Botanical Garden of Bauru (MBGB) as pure or hybrids, through morphological and molecular markers. Ten individuals were sampled, 4 of which were pure species for control and 6 free-living, which were photographed, morphometrically measured and from which the fragments of the mitochondrial genes COI and D-loop region were amplified. As results, all animals showed intermediate patterns between both species. After analyzing the sequences obtained for D-loop and obtaining a high haplotypic diversity (h), low nucleotide diversity (π), Tajima D and Fu's F_s statistic, it is possible to infer that the animals in the area continue receiving gene flow and the population began from a founder effect. Morphological and molecular data indicate that the individuals sampled are hybrids. From the data generated by this research, it is possible to include the management of these animals in the Conservation Unit (UC), with the main purpose of avoiding population growth and its outcomes.

Keywords: primate, hybrid, anthropogenic hybridization, molecular biology

Introduction

Marmosets are primates belonging to the genus *Callithrix* (Erxleben, 1777) and are restricted to the Brazilian territory (Nakamura, 2009). The Common Marmoset (*Callithrix jacchus* Linnaeus, 1758) and the Black-tufted-ear Marmoset (*Callithrix penicillata* Étienne Geoffroy, 1812) are small animals that base their feeding in plant exudates (gums, saps, latex), little arthropods, fruits and flowers (Ahlborn, Rothe, 1999; Miranda, Faria, 2001).

Individuals belonging to the *C. penicillata* species are endemic to the East Central and part of Northeastern Brazil, occurring in the states of Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, the Federal District, the southwest tip of Piauí, Maranhão and the north of São Paulo (north of the Tietê and Piracicaba Rivers). They commonly occur in the Cerrado, and Atlantic Forest in areas such as gallery forest and dry forest, beyond Caatinga (forest patches) (Silva, Silva, Terra, 2018; IUCN, 2021). Otherwise *C. jacchus* individuals are endemic to the Northeast region of Brazil and can be found in the semideciduous and deciduous scrub forest in Caatinga, besides gallery forest and humid Atlantic forest of Northeastern Brazil, in the states of Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Pernambuco and Piauí (IUCN, 2021). Both species were naturally separated from each other according to geographic barriers such as rivers, climate, relief and vegetation type (Malukiewicz, 2019; Malukiewicz et al., 2014; Rylands et al., 2009), and therefore passed through an allopatric specialization. Nowadays these species are also distributed throughout the North and Southeast of the country (Malukiewicz et al., 2014) which is related to escape from breeding sites, release and introduction into inappropriate environments and wild animal trafficking, so they become exotic (MMA, 2006; Levacov, Jerusalinsky, Fialho, 2011).

The introduction of exotic animals can interfere with the environment in different ways, altering important ecological processes, being considered the second biggest cause of biodiversity loss in the world (Vitousek et al., 1997; Pereira et al., 2005; Silva, 2009). Some exotic species settles in the new environment at the detriment of native species, altering their habitat, preying on them or competing for resources, thus making their existence unfeasible, potentially leading to extinction (Primack, Rodrigues, 2001).

Researches already carried out in order to understand the outcomes of *Callithrix* sp. as exotic had shown individuals of *C. penicillata* and *C. jacchus* as possible predators of birds, like *Turdus leucomelas* (pale-breasted thrush) and *Polioptila plumbea* (tropical gnatcatcher), in Pernambuco, Brazil (Lyra-Neves et al. 2007), *Zenaida auriculata* (eared dove), *T. leucomelas* and *Mimus saturninus* (chalk-browed mockingbird), in São Paulo, São Paulo (SP), Brazil (Begotti, Landesmann, 2008), and a high predation rate on artificial eggs in nests, in Bauru, SP, Brazil (SILVA, 2009), revealing that the presence of these animals in these regions may be negatively impacting the ornithological community (SILVA, 2009). Besides these papers focused in avifauna, in 2006, a research done in Rio de Janeiro state showed that in two areas where Golden Lion Tamarin (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) were reintroduced, there were more marmosets (*Callithrix* spp.) than tamarins, and both animals have similar diets and ecology, competing for resources (Ruiz-Miranda et al., 2006).

Furthermore, such introduction of species outside their natural range can even drive to the occurrence of hybridization with an autochthonous species (Cortés-Ortiz, Roos, Zinner, 2019). According to Zinner, Arnold and Roos (2011), natural hybrids

occur for several reasons and can be considered an evolutionary factor, however, when induced by human activity it may have implications for the conservation, mainly of non-human primates (NHP), such as reversal speciation (the fusion of parental species through interbreeding of them or interbreeding of them with hybrids - backcrossing) and introgression (exchanging of alleles between two species or one species receiving alleles of the other). Despite this, studies on hybridization in these animals and hybridization zones are still scarce (Cortés-Ortis, Roos, Zinner, 2019).

As reported by De Paula et al., 2005, in Bauru, São Paulo (SP), there is a record of the species *C. penicillata* and *C. jacchus*, as well as animals showing intermediate patterns between these species, being probable hybrids of both. The Municipal Botanical Garden of Bauru (MBGB), located in the same city, is an institution dedicated to plant conservation (Cardoso, 2013) and its area of natural vegetation covers two global biodiversity hotspots for conservation priorities: Cerrado and Atlantic Forest (Myers et al., 2000), additionally, it is part of the Wildlife Refuge (RVS) Aimorés, a classification of the National System of Conservation Units (SNUG) of Integral protection.

Therefore, this paper aims to associate tools of molecular biology and morphology to identify individuals of the genus *Callithrix* present in the MBGB as pure species or as hybrids, in order to provide biological data and subsidies for the conservation programs of both species, as well as to other species involved.

Methods

Study Area

The field job was carried out within a radius of 100m at The Municipal Botanical Garden of Bauru (22°20'30"S, 49°00'30"W) in the central-west region of the state of São Paulo, in Southeastern Brazil (Figure 1) in November, 2020, during the pandemic of Covid-19, when it got possible to work in the fields with primates in a more secure condition.

The animals were captured with auto-close, Tomahawk-style (34cm x 13cm x 12cm), covered with black cloth to decrease the stress in the animals, besides traps baited with a mix of bananas, paçoca (Brazilian sweet made with peanuts), and cornflour. All the samples were collected from free-range marmosets and all steps were done by biologists and veterinarians under the approval of the competent authorities in the country (Ethics Committee on Animal Experiments of São Paulo State University (CEUA - 0157/2019), (COTEC - 292/2020 D31/2020 WLS) and (SisBio - 71758-2).



Figure 1: The delimitation of Municipal Botanical Garden of Bauru and sample capture area highlighted in a red circle (Google Earth).

Control samples

The standard samples were obtained from blood and hair of 6 animals (3 *C. jacchus* and 3 *C. penicillata*) from a legalized animal breeding (Sagui Legal, based in Cotia, SP) and from hair of 5 animals (2 *C. jacchus*, 2 probably hybrids and 1 *C. penicillata*) from the Center for Medicine and Research in Wild Animals (CEMPAS), FMVZ, UNESP, SP, in order to standardize the following protocols used in this study.

Study samples

The animals were transported to a laboratory inside MBGB where they were monitored by a veterinarian. They were weighed and immobilized with an injection of ketamine (10 a 12 mg/kg) and midazolam (0,6 mg/kg) in the intramuscular region of the outer thigh. Then, they were measured, photographed and the biological samples (hair and blood) were collected.

While the animals were sedated, sex was checked (male or female) and age (not-adult or adult) was predicted based on size, behavior and number of teeth. Information about body characteristics as color patterns and pre and post-auricular tufts were collected. Body length, tail length, head length, chest and neck circumferences were measured with a measuring tape; hands, feet and ears were always measured with a 50 cm ruler, on the right side.

A plastic organizer box (36 cm x 28 cm x 23 cm) was adapted with led lights, holes and lined with covered cardboard, to be used as a photography studio. Every individual was photographed in portrait, lateral, ventral and dorsal decubitus, as possible, using a Nikon Coolpix L810 camera and an Asus Zenfone Max Shot (Silva, 2018).

Approximately 0,2 – 0,5 mL of whole blood were collected in Vacutainer® tube, preserved in EDTA and then stored at -20°C. At the end of data collection, trichotomy of the medial part of the tail was performed and the hair at the end of the tail and right tuft were dyed with pararosalin chloride in order to avoid recapture of the individuals. Afterward, animals were returned to cages and released at the same place they were captured as they got recovered from anesthesia (about 2h).

During the procedures, vital parameters such as body temperature, respiratory and heart rates were continuously monitored and recorded in an individual record.

Laboratory protocols

DNA from blood and hair was extracted using a standard proteinase K/phenol/chloroform protocol (Sambrook, Russell, 2001) with adaptations and later quantity and quality were verified on a spectrophotometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific) by 260/280 nm absorbance.

Nested Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed using primer pairs for the fragments Cytochrome C Oxidase I (COI) and displacement-loop (D-loop) region of mitochondrial DNA (mtDNA), in Thermocycler (Eppendorf® Mastercycler® Nexus X2).

The COI 700 bp fragment region was amplified using the primer pairs F1forward (5'TTTTCAACCAACCACAAAGACATCGG3') e F5reverse (5'ACTTCTGGGTGGCCGAAAAATCAGAA 3') (Loiola et al., 2015), while the 1200bp fragment of the D-loop gene was amplified with the pair of primers cal_dloopF1 (5'CCCTAGTAGCTGACCTATTAAC3') and cal_dloopR2 (5'TGAGGTATGCGAGGAGTAAC3') (Malukiewkz et al., 2014). Later, the Nested

PCR reactions were performed for both genes, obtaining around 180bp COI fragment using the same primer F1forward and F1reverse (5'AATAAATGCGTGAGATGTGACGAT3') (Loiola et al., 2015); and 1036bp D-loop fragment using the same primer cal_dloopF1 and HVIR (5'ATTCAATATCAGGCGCGATGATAG3'), as described by Malukiewkz et al (2014).

The PCR reactions were carried out in a final volume of 50µl, containing: 25µl of 2.0x Taq DNA Polymerase Master Mix (Ampliqon©), 25pmol of each primer, 50ng of genomic DNA and additional ultrapure water to complete the final volume. Amplification reactions of COI gene were carried out with initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 55°C for 45 seconds, 72°C for 2 minutes and final extension at 72°C for 7 minutes, while amplification reactions for D-loop gene were carried out with 5 minutes initial denaturation at 95°C; 35 cycles of 95°C for 45 seconds, 57°C for 30 seconds, 72°C for 90 seconds; and a final extension at 72°C for 4 minutes and 30 seconds.

Both fragments obtained were identified by electrophoresis in 1% agarose gel, stained with Gel Red® (Uniscience) (0,1 µl/10 ml), run in 1x Tris- acetate-EDTA (TAE) buffer and then visualized in transilluminator (Benchtop UV Transilluminator, Cambridge, UK) with the UVP® VisionWorksLS™ (LifeScience Software) software. The amplified products were purified after the first PCR of each gene using the Illustra Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), and after used in the Nested PCRs, following the same instructions given.

Thereafter, all the amplified products in Nested PCR were observed in an electrophoresis gel and purified with the same kit as used before. Fragments were

sequenced in both directions using the 2 µl BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 µl of 2,5 Save Money (400 mM Tris-HCl ph 9, 0,10 mM MgCl₂) and 5pmol of each primer in ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) following manufacturer's instructions.

Data Analysis

The analyzed fragment is of conserved domain and consists of the hypervariable region 1 (HVR1) and part of the hypervariable region 2 (HVR2). The obtained sequences and the electropherograms were analyzed (Geneious v.10.0.9; Biomatters, Auckland, New Zealand), aligned with the Muscle algorithm (Edgar, 2004) and manually checked. The sequences were compared with the gene sequences that belong to the genus and *C. jacchus* and *C. penicillata* species using the blast tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Haplotype diversity, nucleotide diversity, number of polymorphic sites, number of haplotypes, and their frequency were estimated using DnaSP version 5.0 program and Arlequin 3.0 software. The same software was used to do the Fu's Fs statistic and the Tajima D tests. The haplotype network design was made utilizing POPArt.

Results

Morphologic data

At MBGB, 8 individuals were sampled, 7 adults and 1 infant (non-adult). The body measurements are showed at the table 1. The mean and standard deviation (mean ± SD) for weight, body length and tail length of the captured *Callithrix* sp. (7

individuals) adults are $317.71 \pm 37.18\text{g}$, $17.64 \pm 1.34\text{cm}$ and $31.27 \pm 3.76\text{cm}$, respectively.

Table 1: Biometrical data from the MBGB individuals.

Sample	C1	C2	C3	C4
Weight (g)	320	347	305	362
Age	Adult	Adult	Adult	Adult
Sex	Male	Male	Female	Male
Body length (cm)	17	20.5	17	18
Tail length (cm)	35	33.5	25.5	29
Chest circumference (cm)	15.8	15.5	14	17.5
Head circumference (cm)	3.5	4.5	3.5	6
Right foot length (cm)	6.2	5.9	6	5.5
Right hand length (cm)	3.5	4	3.9	4
Right ear length (cm)	2	1.5	1.5	1.7
Neck circumference (cm)	14.5	14.5	12	11
Sample	C5	C6	C7	C8
Weight (g)	212	343	254	293
Age	Not adult	Adult	Adult	Adult
Sex	Female	Male	Male	Female
Body length (cm)	15.5	17	16.5	17.5
Tail length (cm)	29.5	29	30.9	36
Chest circumference (cm)	12	14.2	13	15
Head circumference (cm)	4	5	5.5	-
Right foot length (cm)	5.9	5.9	6	5.5
Right hand length (cm)	3.6	4	4.1	-
Right ear length (cm)	1.6	2	2	1.3
Neck circumference (cm)	11	13.3	12.5	-

The color patterns of the marmosets were compared with the ones already known for *C. jacchus* and *C. penicillata* (De Vivo, 1991) and all of them showed characteristics of both species, or even intermediate characteristics between them (Figure 2).

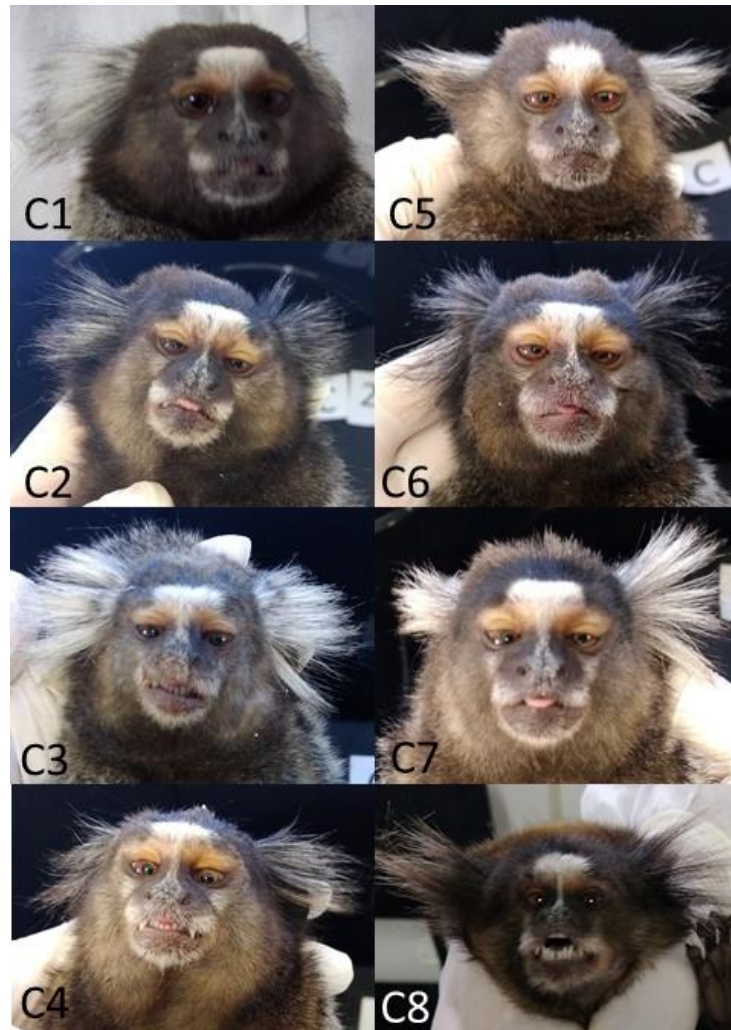


Figure 2 (C1 to C8): *Callithrix* sp. samples showing intermediate characteristics between *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*.

The tail sometimes showed a ringed pattern and others just a mix of colors consisting of wide dark gray and narrow white rings, sometimes with orange spots (Figure 3). The body showed two different patterns, being the first dark gray, with orange and white or light gray spots and the second light gray with orange and dark gray spots. Some had the upper back darker than the rest of the body. Most strands of hair in their bodies carried more than one color (dark gray and light gray/white or orange, dark gray and light gray/white). The tufts were represented by dark gray with few light gray/white hair strands, average pattern or light gray/white with few dark gray hair strands. It is also possible to notice that some strands are mixed themselves, having

2 colors in the same strand (possible to notice clearly on Figure 2 on individuals C1 and C3). During this research, no typical *C. jacchus* or *C. penicillata* were observed.



Figure 3: Individuals C2 and C6 (male-adults) showing pattern differences on their bodies and tails.

Molecular data

We successfully amplified and sequenced PCR products of ≈ 180 bp of COI from all the samples, including the ones used from standards, and after alignment, all the sequences showed the same patten (100% of identity). Besides, 795bp of D-loop mtDNA from 10 samples, being 4 obtained from captive marmosets (3 of *C. penicillata* from Sagui Legal and 1 of *C. jacchus* from CEMPAS) and the other 6 from wild *Callithrix* sp. (from MBGB).

Nucleotide D-loop sequencing allowed us to determine 7 haplotypes, being 1 of the 3 *C. penicillata*, 1 from the only *C. jacchus* and 5 from the 6 *Callithrix* sp. When compared to a bank data using the blast tool, all the sequences corresponded to the species described or the hybrids, in the case of the samples from MBGB.

The haplotypes also resulted in 28 polymorphic sites (table 2), haplotypic diversity (h) of 0,911 and nucleotidic diversity (π) of 0,017. The haplotype 1 (H1) is shared by 2 individuals of MBGB, the haplotype 7 (H7) is shared by 3 individuals of the same species (*C. penicillata*) and location, while the other haplotypes are not shared (Figure 4), e.g. H6, what belongs to *C. jacchus*.

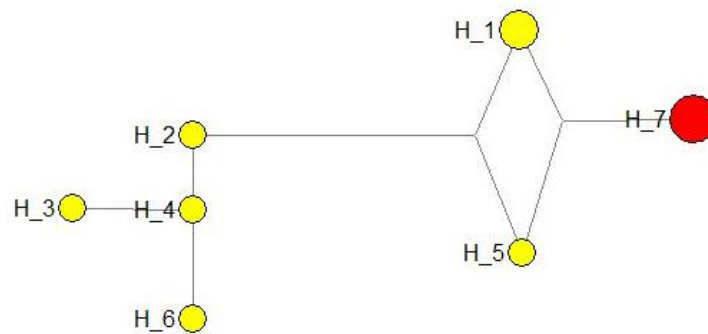


Figure 4: Haplotype (H) network for *Callithrix* sp. based on a 795 base pair (bp) sequence of the mitochondrial DNA control region (D-loop). Circle size is proportional to haplotype frequency. The haplotypes correspond to H1 (C1 and C3), H2 (C4), H3 (C7), H4 (C8), H5 (CH195), H6 (CJ156) and H7 (M99, M108 and M177) respectively.

Furthermore, when comparing the haplotypes of hybrids with haplotypes collected for *C. jacchus* and *C. penicillata*, all haplotypes have a bigger similarity to *C. jacchus*, above 57% while the similarity to *C. penicillata* is up to 28.6%.

Tests of neutrality performed on mitochondrial DNA control region sequences for all the individuals showed positive and non-significant values ($P < 0.05$). The value

obtained for Tajima D was 1.8983 ($p < 0.05$) and the value obtained for the Fu's F_s statistic was 1.64 ($p = 0.404$). Our results indicate that demographic parameters are not influencing the groups sampled and that there is no sign of population expansion.

Discussion

Morphologic data

The body weight of adults corresponds to the expected for the gender, specially to *C. jacchus* and *C. penicillata* species, otherwise body length is shorter than the pure species (IUCN, 2021). The other measures are not allowed to be compared for the lack of information available in literature.

According to De Vivo (1991) and Diniz (1997), *C. penicillata* has long, narrow and black preauricular tufts, with a median white spot on the forehead and menton region, with a face color that is black or dark brown to light-gray brown, striated dorso and ringed tail. While *C. jacchus* has wide and white circum auricular tufts, with a median white spot on the forehead, striated dorso and ringed tail. Both species are much similar and differ basically in tuft colors and disposition (as they can be distinguished from the other species of the genus).

In this research we observed that the auricular tufts of the free range marmosets do not match to the description of any species of the genus but are dark brown, dark gray or light gray with mixed strands, arranged anterior or around the ear and broken in some parts, forming a mosaic, suggesting the animals are hybrids and also they are probably outcomes of more than one generation of hybridization. This result is similar, in parts, with the research done by Cezar (2017) in natural and anthropogenic areas but different from the phenotypes found in a natural hybridization area, where the hybrids

maintained tufts similar to their parental, being totally dark or totally light (Valdivino et al., 2003).

Molecular data

The fragment sequenced of COI for all the individuals was not long enough to differentiate the individuals or to compare them with pure species, however it was expected once only 1bp was discriminated within Loiola et al., (2015) paper.

The comparisons among haplotypes in percentage, indicate that most D-loop is similar to *C. jacchus*, what can indicate *C. jacchus* females as more susceptible to mate with *C. penicillata* males than the opposite.

The haplotypic diversity (h) and nucleotidic diversity (π) for the *C. penicillata* from the breeding are null, what can indicate endogamy. Elseways, the haplotypic diversity (h) in the MBGB is high and similar to the ones found by Malukiewkz et al., (2014) and Faulkes et al. (2003) for populations of *C. jacchus*, *C. penicillata* and hybrids of both species in a natural hybridization zone, which probably indicates that the animals from the studied area have parental from areas that continue receiving gene flow. For the same research, the value found for areas with anthropogenic hybridization is low. Otherwise, nucleotidic diversity for MBGB is low, similar to the values found for *C. jacchus* and *C. penicillata* pure populations (Malukiewkz et al., 2014). According to Malukiewkz et al., (2014), populations of *Callithrix* sp. with low value of π , are expected to be in expansion and it also indicates a founder effect. The founder effect corresponds to the origin of these animals in Bauru, SP, once they are not endemic and were probably introduced in the area through illegal traffic of animals (De Paula et al., 2005).

Although π presumably indicates that the population is in expansion, the values of Fu's F_s statistic and Tajima D suggest that the population is in balance and not expanding. The two results are diverging probably in reason of the restrict number of samples.

Either in expansion or in balance, the exotic *Callithrix* sp. population at MBGB seems to be hybridizing and maintaining themselves for a huge period (De Paula et al., 2005), what comes with consequences for the local ecology. Besides, Bauru is 45km near from Lençois Paulista (SP), where a population of an endangered species (*Leontopithecus chrysopygus* - Black Lion Tamarin) of primate is resident (IUCN 2021) and has a similar behavior and ecology to the marmosets, what lead us to presume that if they get in the same location, the spends for the fauna and flora can be worse.

All the exotic species in UCs are recommended by Ministério do Meio Ambiente (MMA) to be monitored and eliminated as soon as the problem is detected. The “elimination” has different scenarios, and the most indicated are the ones that are less invasive as translocating animals to their original range or vasectomize the males. Thus, it is essential that the local authorities provide making a survey of the number of marmosets and repeat this survey year by year, while the other monitoring are made.

Whereas monitoring and management of animals in these circumstances being crucial, it is as important or even more to solve the problem from the origin, which means using environmental education (for teaching kids and the general population about the bad outcomes of buying illegal animals, offering food for wild animals, releasing animals outside their range), forbidding people from feeding wild animals and applying penalties if necessary, and reinforce the superintendence over traffic. The challenge gets exhausting when one effort is diverging from the direction of the others.

Acknowledgments

We would like to thank the financing agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing a master scholarship to Bruna Mendonça Santos. We are grateful to the The Municipal Botanical Garden of Bauru for all the support during this research and to the Sagui Legal Breeding for providing the standard samples.

References

- AHLBORN, S.; ROTHE, H. Food selection of semifree common marmosets (*Callithrix jacchus*): Indications for optimal foraging. **Primates**, v. 40, n. 3, p. 479–486. 1999.
- BEGOTTI, R. A.; LANDESMANN, L. F. Predação de ninhos por um grupo híbrido de sagüis (*Callithrix jacchus/penicillata*) introduzidos em área urbana: implicações para a estrutura da comunidade. **Neotropical Primates**, v. 15, n. 1, p. 28-29, 2008.
- CARDOSO, V. S. **O Programa de Educação Ambiental do Jardim Botânico Municipal de Bauru (Bauru-SP): a busca por uma identidade**. 2013. 153 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências, 2013.
- CEZAR, A. M.; PESSÔA, L. M.; BONVICINO, C. R. Morphological and genetic diversity in *Callithrix* hybrids in an anthropogenic area in southeastern Brazil (Primates: Cebidae: Callitrichinae). **ZOOLOGIA**. 2017 Jul 28;34:1-9.
- CORTÉS-ORTIZ, L.; ROOS, C.; ZINNER, D. Introduction to Special Issue on Primate Hybridization and Hybrid Zones. **International Journal of Primatology**. 2019;40:1-8.
- DE VIVO, M. Taxonomia de *Callithrix* (Erxleben, 1777) (Callitrichidae, Primates). Belo Horizonte, **Fundação Biodiversitas**, v. 105, p. 1991.
- DINIZ, L. S. M. Primatas em cativeiro: manejo e problemas veterinários enfoque para espécies neotropicais. São Paulo: Ícone, 1997.
- EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- FAULKES C. G., ARRUDA M. F., DA CRUZ A. O. MONTEIRO. Matrilinial genetic structure within and among populations of the cooperatively breeding common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Molecular Ecology**. 2003;12, p. 1101-1108.

FU XY (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147:915–925

HERSHKOVITZ, P. (1977) Living New World Monkeys (Platyrrhini). With an Introduction to Primates. **The University of Chicago Press**, Chicago, vol. 1.

IUCN, The IUCN Red List of Threatened Species, 2021. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 28, fevereiro, 2021.

LEVACOV DIANA, JERUSALINSKY LEANDRO, FIALHO MARCOS DE SOUZA. Levantamento dos primatas recebidos em centros de triagem e sua relação com o tráfico de animais silvestres no Brasil. **A Primatologia no Brasil**; 2011; Belo Horizonte, MG. 2011. 32 p. v. 11.

LOIOLA, S. et al. Barcode analysis using mini-amplicons strategy for museum samples of neotropical primates *Callithrix* spp. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 5, p. e225-e227, 2015.

LYRA-NEVES, R. M. D. et al. Interspecific behaviour between *Callithrix jacchus* (Linnaeus) (Callitrichidae, Primates) and some birds of the Atlantic forest, Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, p. 709–716, 2007.

MALUKIEWICZ, J. et al. Hybridization effects and genetic diversity of the Common and Black-Tufted Marmoset (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) mitochondrial control region. **American Journal of Physical Anthropology**, 2014.

MALUKIEWICZ, J. et al. A Review of Experimental, Natural, and Anthropogenic Hybridization in *Callithrix* Marmosets. **International Journal of Primatology**, v. 40, p. 72-98, 2019.

MIRANDA, G. H. B. de; FARIA, D. S. de. Ecological aspects of black-pinellated marmoset (*Callithrix penicillata*) in the cerrado and dense cerrado of the Brazilian Central Plateau. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 61, n. 3, 2001

MMA, Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Espécies exóticas invasoras: situação brasileira**. Brasília: MMA, 2006. 24 p. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/174/_publicacao/174_publicacao17092009113400.pdf Acesso em: 22 de maio 2019.

MYERS, N., MITTERMEIER, R., MITTERMEIER, C. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403, 853–858 (2000).

NAKAMURA, E. M. **Convívio entre saguis e pessoas: experiências no Parque Ecológico do Córrego Grande e Entorno, Florianópolis - SC**. 2009. 66 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2009.

PEREIRA, D. G. et al. Impactos de espécies exóticas invasoras sobre espécies nativas: o caso dos calitriquídeos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. *In:*

Simpósio Brasileiro Sobre Espécies Exóticas Invasoras, 2005, Brasília, DF. Sessão de Painéis.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. 2001. **Biologia da Conservação**, Editora Planta, Londrina, 2001, 327p.

RUIZ-MIRANDA C, AFFONSO A, DE MORAIS M, VERONA C, MARTINS A, BECK B. Behavioral and ecological interactions between reintroduced golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and introduced marmosets (*Callithrix* spp, linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic coast forest fragments. **Braz Arch Biol Techn.** 2006; 49: 99–109.

RYLANDS, A. B., COIMBRA-FILHO, A. F., & MITTERMEIER, R. A. (2009). The systematics and distributions of the marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Mico*) and *Callimico* (*Callimico*) (*Callitrichidae*, primates). In S. M. Ford, L. M. Porter, & L. C. Davis (Eds.), *The smallest anthropoids: The marmoset/ callimico radiation* (pp. 25–61). New York: Springer Science+Business Media.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, D. F.; SILVA, E. B.; TERRA, A. P. Controle populacional de espécies silvestres invasoras por meio de laqueadura e vasectomia em primatas *Callithrix penicillata*: relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, v. 25, n. 1, p. 9-15, 2018.

SILVA, G. L. **Avaliação dos impactos causados pela introdução do Sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) sobre a comunidade de aves e serpentes nativas do interior de SP**. Anuário da produção de iniciação científica discente. Faculdade Anhanguera de Bauru, Bauru, v. 12, n. 15, p. 29-37, 2009.

SILVA, M. O. M. **Análise fenotípica e genética em indivíduos de *Callithrix* (*Callitrichidae*: primates) no estado do Rio de Janeiro**. 2018. 112 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biológicas e da saúde, 2018.

TAJIMA, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123(3):585–595

VALDIVINO, E. M.; RÍMOLI, A. O.; RÍMOLI, J.; ALBUQUERQUE, L. B. Primates of the Dom Bosco Museum: identification and characterization. **Multítemas**. 2003 Outubro;:45-72.

VITOUSEK, P. M. et al., Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. **Issues in Ecology**, v.1, p. 1-16, 1997.

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

Table 2: Variable sites found in 7 haplotypes (H) of *Callithrix* sp. The first 6 sequences belong to hybrids (from MBGB and Cempas), the others belong to 1 *Callithrix jacchus* (from CEMPAS) and 3 *Callithrix penicillata* (from Sagui Legal) respectively.

Samples	Polymorphic sites													
	292	295	304	329	379	423	435	436	441	443	447	452	453	454
C1	C	C	T	T	T	T	G	A	A	C	T	C	C	C
C3
C4	T	.	.	.	C
C7	T	T	.	.	C
C8	T	.	.	.	C
CH195	C
CJ156	T	.	.	.	C
M108	T	T	C	C	.	C	A	G	G	T	C	T	A	T
M177	T	T	C	C	.	C	A	G	G	T	C	T	A	T
M99	T	T	C	C	.	C	A	G	G	T	C	T	A	T
Samples	Polymorphic sites													
	459	460	472	473	475	480	483	499	507	508	519	522	526	535
C1	C	A	C	C	C	C	C	A	T	T	C	T	T	C
C3
C4	.	G	A	T	.	T	T	C	C
C7	T	G	A	T	.	T	T	C	C
C8	T	G	A	T	.	T	T	C	C
CH195	T
CJ156	T	G	A	T	.	T	T	C	C	.	T	C	.	.
M108	T	T	.	.	.	C	T	C	C	T
M177	T	T	.	.	.	C	T	C	C	T
M99	T	T	.	.	.	C	T	C	C	T

CAPÍTULO III - REVISÃO DE LITERATURA

1. PRIMATAS

Os primatas são mamíferos que compartilham características tais como: dedos preênseis nos quatro membros, unhas planas ao invés de garras, olhos voltados para frente com visão binocular e ótima percepção de profundidade. A linhagem ancestral dos primatas deu origem as linhagens Strepsirrhini e Haplorrhini. Os grandes primatas e macacos presentes no subgrupo Haplorrhini, têm sido denominados símios, normalmente arborícolas e subdivididos em três grupos, sendo um deles dos macacos do Novo Mundo (Platyrrhini) (HICKMAN et al., 2016).

Os primatas neotropicais, também conhecidos como Platyrrinos, são animais que vivem no Novo Mundo, ou seja, no continente americano. Atualmente, são divididos em 20 gêneros, 224 espécies e subespécies (FLEAGLE, SEIFFERT, 2020). Os platirrininos adultos variam entre 120g (sagui pigmeu - *Cebuella pygmaea*) e 12kg (Muriqui - *Brachyteles arachnoides*; Macaco-barrigudo-cinza - *Lagothrix cana*) (GARBER et al., 2009). Estes animais possuem diversidade nos tipos de forrageamento, utilização de habitat e adaptações anatômicas, por vezes, tornando-se especialistas para alguns tipos de alimento.

Os Platyrrinos dos gêneros *Saguinus*, *Callithrix*, *Leontopithecus*, *Cebuella* e *Mico*, exibem comumente padrão de acasalamento poliândrico-poligênico, gestação gemelar e cooperação de outros indivíduos do bando no cuidado dos filhotes. Sempre há uma fêmea dominante e esta suprime a reprodução das outras fêmeas (GARBER et al., 2009).

Diferentemente dos macacos do velho mundo, a maioria dos macacos sul-americanos possuem dispersão bissexual, ou seja, fêmeas e machos partem do grupo de origem, de onde nasceram para outros, o que é efetivo em grupos pequenos para evitar acasalamentos endogâmicos (JACK, 2009).

Os PNH (primatas não-humanos) têm sido afetados pelo aumento da população humana, desmatamento, caça excessiva, agricultura e criação de

gado. A soma destes fatos tem resultado em declínio de biomassa e sobrevivência de populações de primatas, causando extinções locais, alterando padrões e processos de dispersão de sementes, polinização e regeneração florestal, além de aumentar a susceptibilidade dos PNH como novos vetores de doenças (GARBER et al., 2009).

2. GÊNERO *CALLITHRIX*

Os saguis são primatas da família Callitrichidae, pertencentes ao gênero *Callithrix* e habitam originalmente o Brasil (NAKAMURA, 2009). Correspondem atualmente a 6 espécies (*Callithrix aurita*, *Callithrix geoffroyi*, *Callithrix kuhli*, *Callithrix flaviceps*, *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) (RYLANDS, COIMBRA-FILHO, MITTERMEIER, 2009). São animais de pequeno porte, apresentando entre 300g e 400g, territorialistas e possuem hábito arborícola saltatório. A espécie *C. jacchus* (Linnaeus, 1758) e *C. penicillata* (Étienne Geoffroy, 1812) podem ser encontrados em matas ciliares, florestas de galeria, florestas semidecíduas, cerrado e em áreas urbanas e peri-urbanas, adequando-se a atividade antrópica. São considerados frugívoros-insetívoros, possuindo uma alimentação baseada em flores, frutos, exsudato de plantas, pequenos artrópodes, pequenos vertebrados e ovos (AHLBORN, ROTHE, 1999; MIRANDA, FARIA, 2001; NAKAMURA, 2009), sendo os frutos mais ingeridos quando disponíveis (DE CASTRO, ARAUJO, 2007).

Estes primatas são encontrados em grupos de três a 15 indivíduos, envolvendo todas as faixas etárias e, em geral, alcançam a maturidade sexual com um ano de vida, onde apenas uma das fêmeas do grupo será responsável por gerar a prole enquanto os outros agirão ativamente em outras funções como cuidado desta prole, proteção e procura ativa de alimentos (NUNES, 2006).

2.1. *Callithrix* sp. como exóticos e invasores

Em Bauru, município do interior do Estado de São Paulo, infere-se a presença de duas espécies do gênero, o sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) e o sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (Figura 1), bem como

seu híbrido (DE PAULA et al., 2005). Indivíduos de *C. penicillata*, caracterizados por tufos pretos e ralos nas orelhas, são endêmicos da região Centro-Oeste e parte do Nordeste do Brasil (Figura 2), ocorrendo comumente nas áreas de *hostspot* Cerrado e Mata Atlântica (floresta semidecídua e floresta pluvial perenifólia atlântica), além de Caatinga (DE VIVO, 1991; SILVA, SILVA, TERRA, 2018). Por outro lado, indivíduos de *C. jacchus*, que se diferenciam da espécie anterior principalmente pela presença de tufos brancos e cheios nas orelhas, são endêmicos da região Nordeste do Brasil (Figura 2), estando hoje distribuídos também pelas regiões Norte e Sudeste do país (MALUKIEWICZ et al., 2014).



Figura 1 – Espécimes característicos das espécies sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) e sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), respectivamente. Fonte: IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources).



Figura 2 - Distribuição espacial das espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*. Fonte: modificada do website da IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources).

Animais do gênero *Callithrix* presentes nesta região são considerados exóticos e invasores, uma vez que estão fora de seu local de origem. As causas para a presença desses animais em locais antes inexplorados pelos mesmos podem ser diversas, tais como: escape de criadouros, soltura e introdução em ambientes inadequados e tráfico de animais silvestres (intimamente ligado com as causas anteriores) (MMA, 2006). A introdução de animais exóticos altera vários processos ecológicos importantes e é considerada a segunda maior causa de perda de biodiversidade no mundo, afetando diversos aspectos como a economia e a saúde humana (VITOUSEK et al., 1997; PEREIRA et al., 2005; SILVA, 2009).

Quando uma espécie exótica consegue se ambientar, o faz às custas das espécies nativas, alterando seu habitat, predando-as ou competindo por recursos, tornando, desta forma, a existência das mesmas inviável, podendo levar à extinção (PRIMACK, RODRIGUES, 2001).

Em 2009, foi realizado um estudo no JBMB a fim de avaliar os impactos da introdução do *C. jacchus* sobre a comunidade de aves e serpentes nativas. Como resultado, observou-se uma alta taxa de predação em ovos artificiais em

ninhos, revelando que a presença desses animais na região pode estar impactando de forma negativa a comunidade ornitológica (SILVA, 2009). Um trabalho semelhante foi realizado em 2008 na cidade de São Paulo e apontou *C. penicillata* e *C. jacchus* como possíveis predadores de aves das espécies *Zenaida auriculata* (avoante), *Turdus leucomelas* (sabiá-do-barranco) e *Mimus saturninus* (sabiá-do-campo) (BEGOTTI, LANDESMANN, 2008), corroborando também com um estudo anterior realizado em Pernambuco, o qual registrou ataques à *T. leucomelas*, além de *Polioptila plumbea* (balança-rabo-de-chapéu-preto) (LYRA-NEVES et al., 2007).

Em 2006, um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro onde micos-leões-dourados (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766), animais ameaçados de extinção, haviam sido introduzidos, mostrou que saguis (*Callithrix* spp.) puros e híbridos estavam em igual número ou maior que os próprios micos, além dos saguis interagirem com os micos durante forrageio (RUIZ-MIRANDA et al., 2006).

3. HIBRIDAÇÃO

A coexistência de indivíduos de sagui-de-tufo-preto e sagui-de-tufo-branco, bem como sua similaridade ecológica e genética (NUNES, 2006; NOVAES, 2014) possibilitou o cruzamento e nascimento de híbridos. A hibridação é rara entre as espécies de mamíferos, porém, quando ocorre, pode favorecer os híbridos, em adaptação e vigor; entretanto, pode levar também a uma redução na fertilidade, ou mesmo à esterilidade, devido a anomalias meióticas (ANDREA et al., 1996). A avaliação da fertilidade do híbrido é de enorme importância quando se considera populações naturais ou em populações mantidas para exploração comercial (ANDREA et al., 1997). Os efeitos positivos da hibridação muitas vezes incluem crescimento mais rápido, maior tamanho dos híbridos e um aumento da agressividade (SOUZA et al., 2009).

Entretanto, em vários casos, híbridos interespecíficos podem representar sérios riscos biológicos ao meio ambiente e para conservação das espécies animais. O evento de hibridação pode ter diversos efeitos, como: (1) a

formação de uma população com alta variabilidade genética, (2) a fusão de 2 espécies parentais (espeiação reversa), quando os híbridos possuem maior *fitness* que uma ou ambas espécies parentais ou “perdem” suas restrições ecológicas (KEARNS et al., 2018), e (3) surgimento de uma nova espécie, caso os híbridos apenas cruzem entre si, porém não com os parentais (ABOTT et al., 2013).

A hibridação não é considerada um fator evolutivo quando induzida por atividade humana como nos casos de introdução de espécies em áreas não naturais e da diminuição de densidade populacional ocasionada por caça e/ou fragmentação ambiental. Animais nessas condições cruzarão entre si por dificuldade de encontrar indivíduos da mesma espécie para acasalar e competirão de diversas formas com as linhagens parentais (DETWILLER et al., 2005).

4. BIOLOGIA MOLECULAR

O advento das técnicas de biologia molecular, tornou possível a manipulação de ácidos nucleicos, o que levou à análise de diferentes tipos de marcadores moleculares na década de 1980. Tais marcadores moleculares podem corresponder a qualquer loco gênico, ou seu próprio produto, que apresente polimorfismos inerentes e que possam ser aplicados em estudos que buscam compreender um problema biológico. De maneira mais ampla, marcadores moleculares podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de qualquer outro segmento específico de DNA (AVISE, 2004).

Os dados resultantes de análises genéticas embasadas em diferentes tipos de marcadores moleculares, sejam estes nucleares ou mitocondriais, podem fornecer informações sobre a estrutura genética populacional, níveis de fluxo gênico, relações filogenéticas, biogeografia de grupos definidos e análise de parentesco (AVISE, 1994). Dessa forma, os marcadores genéticos representam ferramentas poderosas e informativas para ecólogos e geneticistas da conservação definirem, por exemplo, a escala geográfica e a

área adequada para realização de monitoramento e manejo das populações (FERAL, 2002).

4.1. Marcadores mitocondriais

O DNA mitocondrial (mtDNA) é um marcador de herança materna com taxa de mutação entre dez e cem vezes maior que o DNA nuclear (nDNA), com capacidade de mostrar evoluções rápidas ocorridas em táxons recentemente divergentes permitindo um registro histórico genético. As múltiplas mutações são mais observadas na região controle do mesmo (D-loop) (PERIC et al., 2005).

O código de barras de DNA (DNA *barcode*) corresponde a uma sequência curta e única de nucleotídeos para reconhecimento de uma espécie. Por conta de sua alta taxa de evolução molecular, é uma ótima ferramenta para distinguir espécies próximas e grupos filogenéticos dentro de uma mesma espécie, assim facilitando análises de biodiversidade (PERIC et al., 2005). Um dos fragmentos mais utilizados com esta finalidade situa-se na extremidade 5' do gene COI (Citocromo C oxidase subunidade I) (BUCKLIN et al., 2011). Apesar de sua alta taxa de mutações, a porção mais variável do mtDNA em nível intraespecífico é a região controle (D-loop), sendo também muito utilizada em estudos de variabilidade genética (LAU et al., 1998).

Quando combinados dados de mais de um marcador molecular, é possível obter dados mais fidedignos sobre a diversidade genética dos animais em estudo. Em trabalhos cujo intuito é o de avaliar o material genético proveniente de diferentes espécies de animais e obtidos de forma invasiva, porém não-destrutiva (não provocando a morte do animal) temos que as fontes mais comumente empregadas são sangue, fezes e os pelos, sendo o DNA do primeiro de melhor quantidade e qualidade para sua amplificação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os esforços desta pesquisa indicam tanto por meio de dados moleculares quanto morfológicos e fenotípicos, que os indivíduos amostrados

no Jardim Botânico Municipal de Bauru, além de exóticos e invasores, são híbridos. Outros dados importantes indicam que a população desses animais em Bauru, provavelmente surgiu por um efeito fundador viabilizado pelo tráfico ilegal e continua recebendo fluxo gênico pelo mesmo motivo.

É imprescindível que as autoridades locais prossigam com o compromisso de esclarecer para a população acerca da biologia e ecologia desses animais, bem como sobre as interações indicadas ou não para com eles, como vêm realizando há anos, além de informar a respeito da origem dos animais na região e consequências do tráfico de animais.

Ademais, como sugerido pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA – ICMBio) para locais com presença de animais exóticos, devem incluir a temática de invasões biológicas no contexto do manejo da UC, realizando o levantamento populacional dos saguis periodicamente, concomitantemente buscando controlar essa população por meio de técnicas de esterilização (indicada para híbridos e não-híbridos). É também imprescindível firmar parcerias com a Polícia Ambiental e Universidades, para que todos estejam familiarizados com o fenótipo de animais exóticos e híbridos, e evitem soltura em locais inadequados.

Estas informações podem ser utilizadas pelo JBMB e outras instituições que enfrentam o mesmo cenário para fortalecer programas que visam a conservação ambiental.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, R., ALBACH, D., ANSELL, S., ARNTZEN, J. W., BAIRD, S. J. E., et al (2013). Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, 26(2), 229–246.

AGUIAR TEREZA D'ÁVILA DE FREITAS, COSTA EDMARA CHAVES, ROLIM BENEDITO NEILSON, ROMIJN PHYLLIS CATHARINA, DE MORAIS NÉLIO BATISTA, TEIXEIRA MARIA FÁTIMA DA SILVA. Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2011 mai-jun;44:356-363.

AHLBORN, S.; ROTHE, H. Food selection of semifree common marmosets (*Callithrix jacchus*): Indications for optimal foraging. **Primates**, v. 40, n. 3, p. 479–486. 1999.

ANDREA, M. V. et al. Análise do complexo sinaptonêmico de *Tayassu pecari* (queixada) e de um híbrido entre *T. pecari* e *T. tajacu* (cateto). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 3, p. 104, 1996.

ANDREA, M. V. et al. Genética e Espermatogênese de *Tayassu tajacu* (cateto) e *Tayassu pecari* e de um híbrido interespecífico. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 76, 1997.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman and Hall, New York, 511 p. 1994.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)**. Sinauer, Sunderland, MA, 684 p. 2004.

BEGOTTI, R. A.; LANDESMANN, L. F. Predação de ninhos por um grupo híbrido de sagüis (*Callithrix jacchus/penicillata*) introduzidos em área urbana: implicações para a estrutura da comunidade. **Neotropical Primates**, v. 15, n. 1, p. 28-29, 2008.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D.; BLANCO-BERCIAL, L. DNA barcoding of marine metazoa. **Annu. Rev. Mar. Sci.** v. 3, p. 471-508, 2011.

CARDOSO, V. S. **O Programa de Educação Ambiental do Jardim Botânico Municipal de Bauru (Bauru-SP): a busca por uma identidade**. 2013. 153 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências, 2013.

CASAGRANDE RENATA A., PANNUTI CLÁUDIO S., KANAMURA CRISTINA, FREIRE WILTON S., GRESPAN ANDRÉ, MATUSHIMA ELIANA R. Fatal Human herpesvirus 1 (HHV-1) infection in captive marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) in Brazil: clinical and pathological characterization. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2014 novembro;34:1109-1114.

CORTÉS-ORTIZ LILIANA, ROOS CHRISTIAN, ZINNER DIETMAR. Introduction to Special Issue on Primate Hybridization and Hybrid Zones. **International Journal of Primatology**. 2019;40:1-8.

DE CASTRO CARLA SORAIA SOARES, ARAÚJO ARRILTON. Diet and feeding behavior of marmoset, *Callithrix jacchus*. **Revista Brasileira de Ecologia**. 2007;

DE VIVO, M. Taxonomia de *Callithrix* (Erxleben, 1777) (Callitrichidae, Primates). Belo Horizonte, **Fundação Biodiversitas**, v. 105, p. 1991.

DE PAULA, H. M. G. et al. Estudos Preliminares da Presença de Sagüis no Município de Bauru, São Paulo, Brasil. **Neotropical Primates**, Bauru, v. 13, n. 3, p. 6-11, 2005.

DETWILER, K. M., BURRELL, A. S., & JOLLY, C. J. (2005). Conservation implications of hybridization in African cercopithecine monkeys. *International Journal of Primatology*, 26(3), 661–684.

FERAL, J. P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, p. 121-145, 2002.

FLEAGLE, J. G.; SEIFFERT, E. R. The Phylogeny of Primates. **Evolutionary Neuroscience**. 2020.

GARBER, P. A. et al. **South American primates, comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation**. New York: Springer, 2009. 531 p.

HICKMAN JR. CLEVELAND P., ROBERTS LARRY S., KEEN SUSAN L., EISENHOUR DAVID J., LARSON ALLAN, I'ANSON HELEN. **Princípios Integrados de Zoologia**. 16th ed. Guanabara Koogan; 2017. 3123 p.

IUCN, **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2021. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 28, fevereiro, 2021.

JACK, K. M.; ISBELL, L. A. Dispersal in Primates: Advancing an Individualized Approach: Preface. **Behaviour**. 2009;146:429-436.

KEARNS, A. M., RESTANI, M., SZABO, I., SCHRØDER-NIELSEN, A., KIM, J. A., et al (2018). Genomic evidence of speciation reversal in ravens. **Nature Communications**, 9(1), 906.

LAU, C. H. et al. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. **Animal Genetics**, v. 29, p. 253-264, 1998.

LEVACOV DIANA, JERUSALINSKY LEANDRO, FIALHO MARCOS DE SOUZA. Levantamento dos primatas recebidos em centros de triagem e sua relação com o tráfico de animais silvestres no Brasil. **A Primatologia no Brasil**; 2011; Belo Horizonte, MG. 2011. 32 p. v. 11.

LOIOLA, S. et al. Barcode analysis using mini-amplicons strategy for museum samples of neotropical primates *Callithrix* spp. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 5, p. e225-e227, 2015.

LYRA-NEVES, R. M. D. et al. Interspecific behaviour between *Callithrix jacchus* (Linnaeus) (Callitrichidae, Primates) and some birds of the Atlantic forest, Pernambuco State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, p. 709–716, 2007.

MALUKIEWICZ, J. et al. Hybridization effects and genetic diversity of the Common and Black-Tufted Marmoset (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) mitochondrial control region. **American Journal of Physical Anthropology**, 2014.

MIRANDA, G. H. B. de; FARIA, D. S. de. Ecological aspects of black-pincelled marmoset (*Callithrix penicillata*) in the cerrado and dense cerrado of the Brazilian Central Plateau. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 61, n. 3, 2001.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Espécies exóticas invasoras: situação brasileira**. Brasília: MMA, 2006. 24 p. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/174/_publicacao/174_publicacao17092009113400.pdf Acesso em: 22 de maio 2019.

NAKAMURA, E. M. **Convívio entre saguis e pessoas: experiências no Parque Ecológico do Córrego Grande e Entorno, Florianópolis - SC**. 2009. 66 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2009.

NOVAES, C. M. **Análise cariotípica de saguis híbridos do gênero *Callithrix* no Sudeste brasileiro**. 2014. 62 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2014.

NUNES, A. M. **Ecologia cognitiva e forrageio social em híbridos de *Callithrix penicillata* x *Callithrix jacchus* (Primates: Cebidae: Callitrichinae) introduzidos na ilha de Santa Catarina**. 2006. 55 p. Dissertação (mestrado), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PEREIRA, D. G. et al. Impactos de espécies exóticas invasoras sobre espécies nativas: o caso dos calitriquídeos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. In: **Simpósio Brasileiro Sobre Espécies Exóticas Invasoras**, 2005, Brasília, DF. Sessão de Painéis.

PERIC, M. et al. Review of Croating Genetic Heritage as Revealed by Mitochondrial DNA and Y Chromosomal Lineages. **Croat Med J**, v. 46, n. 4, p. 502-513, 2005.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. 2001. **Biologia da Conservação**, Editora Planta, Londrina, 2001, 327p.

RUIZ-MIRANDA C, AFFONSO A, DE MORAIS M, VERONA C, MARTINS A, BECK B. Behavioral and ecological interactions between reintroduced golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) and introduced marmosets (*Callithrix* spp, linnaeus, 1758) in Brazil's Atlantic coast forest fragments. **Braz Arch Biol Techn**. 2006; 49: 99–109.

SANTOS B. M., CARDOSO V.S., KNOLL F.R.N., Análise Etológica Da Interação Entre Pessoas E Saguis (*Callithrix*). Anais Da XII JOIA - Jornada De Integração Dos Os Alunos Da Graduação E Pós-Graduação. 2020.

SILVA, D. F.; SILVA, E. B.; TERRA, A. P. Controle populacional de espécies silvestres invasoras por meio de laqueadura e vasectomia em primatas *Callithrix penicillata*: relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, v. 25, n. 1, p. 9-15, 2018.

SILVA, G. L. **Avaliação dos impactos causados pela introdução do Sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) sobre a comunidade de aves e serpentes nativas do interior de SP.** Anuário da produção de iniciação científica discente. Faculdade Anhanguera de Bauru, Bauru, v. 12, n. 15, p. 29-37, 2009.

SOUZA, R. C. C. L.; CALAZANS, S. H.; SILVA, E. P. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. **Ciência e Cultura**, v. 61, n. 1, p. 35-41, 2009.

VITOUSEK, P. M. et al., Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. **Issues in Ecology**, v.1, p. 1-16, 1997.