

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE**

Nathalia Bulhões Javarotti

Estrutura genética e relações de parentesco no mico leão preto (*Leontopithecus chrysopygus*)  
inferidos por marcadores microssatélites

**SÃO CARLOS  
2021**

Nathalia Bulhões Javarotti

Estrutura genética e relações de parentesco no mico leão preto (*Leontopithecus chrysopygus*)  
inferidos por marcadores microssatélites

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao curso de Centro de Ciência Biológicas e  
Saúde da Universidade Federal de São Carlos  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Domingues de  
Freitas

SÃO CARLOS  
2021

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha família, por todo amor, apoio e paciência durante essa etapa da minha vida. Obrigada por possibilitar a realização desse sonho. Mãe, pai e Pepe, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Patricia Domingues de Freitas, pela oportunidade de participar do Laboratório de Biodiversidade e Conservação, pelo apoio e pela oportunidade de conhecer os micos, essa espécie de primata tão carismática, que sofrem com os desafios encontrados atualmente.

Agradeço a todos os integrantes do LabBMC, pela amizade, carinho e também pelos ensinamentos passados durante todos esses anos. Em especial, quero agradecer a Paola Ayala-Burbano, pela sua enorme ajuda, tanto na realização deste trabalho, como também na vida pessoal.

Agradeço aos meus amigos da graduação, por todo apoio e carinho. Vocês tornaram esses anos muito mais fáceis e divertidos. Sou muito grata por ter encontrado pessoas como vocês na minha vida.

Por fim, agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro. E agradeço também as instituições: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Parque Ecológico de São Carlos, Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ) e ao Durrell Wildlife Conservation Trust.

## RESUMO

Programas de reprodução e conservação *ex situ* têm sido estabelecidos para espécies ameaçadas com o objetivo de manter populações autossustentáveis e demograficamente estáveis, capazes de reter diversidade genética e evitar a depressão endogâmica. Entretanto, apesar do sucesso de muitos destes programas, a manutenção de uma espécie em cativeiro enfrenta grandes desafios. O baixo número de indivíduos que origina o grupo fundador e a reprodução entre indivíduos relacionados propiciam a perda de diversidade genética e o aumento da endogamia nas populações cativas. Para resolver estas questões, alguns programas de conservação passaram a combinar análises tradicionais, baseadas nos registros genealógicos da espécie (*Studbook*), com abordagens genético-moleculares. Essas informações podem ser utilizadas inclusive para manejo *in situ* e *ex situ* integrado, o qual facilita tomadas de decisões que contemplem translocações e/ou a criação de áreas de conservação prioritárias, e, eventualmente, introduções de animais de cativeiro na natureza. Nesse contexto, o presente trabalho analisou a diversidade genética de grupos de vida livre e de cativeiro do mico leão preto *Leontopithecus chrysopygus*, uma espécie de primata ameaçada, endêmica da Mata Atlântica de São Paulo, que vem sendo mantida em cativeiro como estratégia alternativa para sua conservação, através de marcadores microsatélites. Os dados demonstram que o manejo em cativeiro está obtendo sucesso em evitar a homozigose, visto que os valores de  $H_o$  se mantiveram igualmente superiores aos de  $H_e$  após nove gerações. Os valores de  $F_{is}$ ,  $H_e$ ,  $H_o$  não apresentaram diferenças significativas entre o de 2014 e os de 2018, no entanto, houve uma diminuição significativa na riqueza alélica nos grupos brasileiros, demonstrando que está ocorrendo perda de alelos ao longo das gerações. As análises de parentesco para os grupos cativos confirmaram as relações descritas no *Studbook*; e as análises de estruturação genética demonstraram a existência de uma metapopulação *ex situ* cativa. Quanto aos grupos *in situ*, foram evidenciadas diferenças significativas nos níveis de diversidade genética calculados para as populações pertencentes a três fragmentos distintos. Os valores observados para o coeficiente de endogamia, no entanto, foram similares, demonstrando excesso de heterozigoto e provavelmente um comportamento de tendência de fuga da endogamia. As análises de estruturação genética demonstraram que as três populações de vida livre analisadas neste estudo estão estruturadas e possuem forte diferenciação genética. Quando os grupos *ex situ* e *in situ* foram comparados, foi verificada existência de estruturação populacional.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado de São Paulo destacando os grupos pertencentes à Floresta Nacional de Capão Bonito, à Fazenda Santa Maria, à Estação Ecológica Mico Leão Preto, ao Parque Estadual Morro do Diabo e o Guareí, Fonte: Ayala-Burbano, P.A. 2019, baseado em informações disponíveis no SOS Mata Atlântica. ....20

Figura 2 - Coeficiente de endogamia (Fis) estimado para a Metapopulação Brasileira (A; N=37) e para uma população de vida livre pertencente a Floresta Nacional de Capão Bonito (B; N=10), usando uma combinação de 1 a 15 loci microssatélites. Cada ponto representa um set de loci simulado. ....27

Figura 3 - Probabilidade de identidade (PIB) estimada para a metapopulação brasileira (A; N=37) e para uma população de vida livre pertencente a Floresta Nacional de Capão Bonito (B; N=10), usando uma combinação de 5 a 15 loci microssatélites. Cada ponto representa um set de loci simulado. As linhas horizontais nos gráficos representam os valores recomendados para aplicações forenses em populações naturais segundo Waits et al, 2001. ....27

Figura 4 - Heterozigosidade esperada estimada para a Metapopulação Brasileira (A; N=37) e para uma população de vida livre pertencente a Floresta Nacional de Capão Bonito (B; N=10), usando uma combinação de 1 a 15 loci microssatélites. Cada ponto representa um set de loci simulado.....27

Figura 5 - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela a heterozigosidade esperada, riqueza alélica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia dos grupos *in situ*. FZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust. ....28

Figura 6 - Análise de Coordenadas Principais mostrando a pontuação na primeira e na segunda coordenada principal com base na matriz de distância genética para o conjunto de dados genéticos obtidos para os grupos cativos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Fundação Zoológico de São Paulo (FPZSP) e europeu, Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT), baseados nas frequências genéticas. ....30

Figura 7 - Análise de estruturação ( $K=2$ ) entre os três grupos analisados Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT). .....31

Figura 8 - Relação entre o tamanho populacional e a endogamia média por ano no cativeiro. A linha vermelha mostra a variação do coeficiente de endogamia de heredograma e a linha verde representa o tamanho populacional. ....33

Figura 9 - Representação do *pedigree* do mico leão preto, segundo dados do Studbook. Linhas verdes indicam os machos. Linhas roxas indicam fêmeas. F0 representa os indivíduos fundadores e G1-9 as gerações. ....34

Figura 11 - Heredograma dos micos leões pretos mantidos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, de acordo com os dados disponíveis no *Studbook* da espécie. Os indivíduos marcados com a cor azul foram transferidos para Durrell Conservation Trust como medida de manejo. A cor verde indica os indivíduos que vieram da natureza. As linhas inclinadas indica a relação de gêmeos entre os indivíduos. ....35

Figura 10 - Heredograma dos micos leões pretos mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, de acordo com os dados disponíveis no Studbook da espécie. Os indivíduos marcados com a cor azul foram transferidos para Durrell Conservation Trust como medida de manejo. A cor verde indica os indivíduos que vieram da natureza. As linhas inclinadas indica a relação de gêmeos entre os indivíduos. ....35

Figura 12 - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela a heterozigosidade esperada, riqueza alélica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia e, respectivamente da esquerda para direita, dos grupos *in situ* brasileiros e europeu nos anos de 2014, analisados por Ayala-Burbano et al. (2017) e analisados nesse estudo. FZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust.....36

<p>Figura 13 - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela a heterozigosidade esperada, riqueza alélica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia. para grupos <i>in situ</i> Fazenda Santa Maria, Guareí e Floresta Nacional Capão Bonito. ....</p>	39
<p>Figura 14 - Análise de Coordenadas Principais mostrando a pontuação na primeira e na segunda coordenada principal com base na matriz de distância genética para o conjunto de dados genéticos obtidos para os grupos da Fazenda Santa Maria e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito, analisado por Ayala-Burbano et al. (2017). 40</p>	40
<p>Figura 15 - Análise de estruturação (K= 3) com os grupos de vida livre da Fazenda Santa Maria (S. Maria) e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito (C. Bonito), analisado por Ayala-Burbano et al. (2017). ....</p>	40
<p>Figura 16 – Genealogia dos grupos da Fazenda Santa Maria, proposta a partir das interpretações dos resultados da análise de paternidade, dos haplótipos e também das informações de sexo e idade dos animais. ....</p>	43
<p>Figura 17 - Genealogia dos grupos de Guareí, proposta a partir das interpretações dos resultados da análise de paternidade, dos haplótipos e também das informações de sexo e idade dos animais. ....</p>	43
<p>Figura 18 - Genealogia dos grupos da Floresta Nacional de Capão Bonito, proposta a partir das interpretações dos resultados da análise de paternidade, dos haplótipos e também das informações de sexo e idade dos animais. ....</p>	44
<p>Figura 19 - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela a heterozigosidade esperada, riqueza alélica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia e, respectivamente da esquerda para direita, dos grupos <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>. FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust. ....</p>	45

Figura 20 - Análise de Coordenadas Principais mostrando a pontuação na primeira e na segunda coordenada principal com base na matriz de distância genética para o conjunto de dados genéticos obtidos para os grupos cativos da Fundação Zoológico de São Paulo (FPZSP), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Durrell Conservation Trust (DWCT) e dos grupos de vida livre da Fazenda Santa Maria e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito, analisado por Ayala-Burbano et al. (2017). .....46

Figura 21 - Análise de estruturação (K= 5) com os grupos cativos Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT) e os grupos de vida livre da Fazenda Santa Maria (S. Maria) e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito (C. Bonito), analisado por Ayala-Burbano *et al.* (2017). .....47



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre os locos microssatélites utilizados nesse estudos, como as sequências dos <i>primers forward e reverse</i> , temperatura de anelamento (TA) e fluorescência utilizada. ....	22
Tabela 2 - Diversidade genética dos grupos cativos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT). ....	29
Tabela 3 - Valores de $F_{st}$ par a par encontrado nos grupos <i>ex situ</i> brasileiros e europeu. ....	30
Tabela 4 - Resultado das análises de paternidade dos animais mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.....	32
Tabela 5 - Índices de diversidade genética dos grupos <i>in situ</i> brasileiros e europeu nos anos de 2014, analisados por Ayala-Burbano <i>et al.</i> (2017) e para os grupos atuais analisados nesse estudo. Asteriscos denotam um desvio significativo da hipótese nula ( $p < 0,05$ ). ....	37
Tabela 6 - Diversidade genética dos grupos cativos da Fazenda Santa Maria e Guareí. ....	38
Tabela 7 - Comparativo dos valores de $F_{st}$ encontrado nos grupos <i>ex situ</i> da Fazenda Santa Maria, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito, analisado por Ayala-Burbano <i>et al.</i> (2017). ....	39
Tabela 8 – Identificação dos indivíduos das populações de vida livre .....	41
Tabela 9 – Resultado da análise de parentesco para os animais das populações <i>in situ</i> .....	41
Tabela 10 - Comparativo dos valores de $F_{st}$ encontrado nos grupos <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> . ....	46

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	Definição do problema .....	12
1.2	Espécie estudada: <i>Leontopithecus chrysopygus</i> .....	14
1.3	Programa de reprodução do mico leão preto.....	15
1.4	Estudos genéticos através dos marcadores microssatélites .....	17
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO</b> .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
3.1	Amostragem biológica e extração de DNA.....	19
3.2	Amplificação dos locos de microssatélites .....	21
3.3	Análise da diversidade genética .....	23
3.4	Estruturação Genética .....	23
3.5	Análise de <i>Pedigree</i> .....	24
3.6	Teste de Paternidade .....	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	25
4.1	Alteração no painel de microssatélites.....	25
4.2	Análise dos grupos <i>ex situ</i> .....	28
4.2.1	Diversidade genética .....	28
4.2.2	Análise de parentesco.....	31
4.3	Monitoramento da diversidade genética dos grupos de cativeiro.....	32
4.3.1	Análise do <i>Studbook</i> .....	32
4.3.2	Diversidade genética .....	36
4.4	Análise dos grupos <i>in situ</i> .....	37
4.4.1	Diversidade genéticas.....	37
4.4.2	Análises de parentesco .....	40
4.5	Análise integrada <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> .....	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
5.1	Análises dos grupos <i>ex situ</i> .....	47

5.2	Monitoramento genético <i>ex situ</i> .....	49
5.3	Análises dos grupos <i>in situ</i> .....	50
5.4	Análises integradas <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> .....	53
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	56

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Definição do problema

Os programas de reprodução em cativeiro estabelecidos por zoológicos e aquários têm como objetivo principal manter populações autossustentáveis e demograficamente estáveis, que retenham diversidade genética e baixa endogamia (BALLOU; LACY, 1995; FOOSE; BALLOU, 2007; HEDRICK; MILLER, 1992). Estes objetivos são fundamentados no fato de que as populações em cativeiro teoricamente devem ser representativas das populações de vida livre, para que aquelas possam ser, eventualmente, usadas em programas de reintrodução, se necessário (ROBERT; COUVET; SARRAZIN, 2007). Apesar desse importante potencial, sabemos, no entanto, que as populações mantidas em cativeiro enfrentam uma série de desafios, incluindo o número reduzido de reprodutores utilizados e a consequente perda de diversidade genética e tendência à depressão endogâmica, além da própria adaptação ao cativeiro. Por outro lado, na natureza, espécies ameaçadas também tendem a apresentar baixos níveis de diversidade genética, decorrentes dos efeitos de gargalo e ausência de fluxo gênico entre populações fragmentadas, e que, em geral, apresentam baixa densidade populacional e ameaças constantes devido à caça, tráfico ilegal e destruição de seu habitat e recursos disponíveis (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017). Este é o caso do mico leão preto, espécie foco deste estudo.

A espécie *Leontopithecus chrysopygus*, conhecida popularmente como mico leão preto (MLP), é endêmica da Mata Atlântica brasileira, bioma atualmente considerado como um dos mais fragmentados do continente americano (RIBEIRO *et al.*, 2009). O MLP é listado como ameaçado de extinção pela lista vermelha da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) e pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) (Ministério do Meio Ambiente, Governo Federal, Brasil).

O primeiro grupo de *L. chrysopygus* em cativeiro foi estabelecido no ano de 1973 no Banco Biológico da Tijuca (Rio de Janeiro, RJ), pela introdução de sete animais provenientes do Parque Estadual do Morro do Diabo (Teodoro Sampaio, SP), quando a população de vida livre desta espécie foi estimada em aproximadamente 200 animais (COIMBRA-FILHO, 1970). Com a finalidade de contribuir com o manejo dos grupos em cativeiro, no ano de 1987 foi criado um Comitê Internacional para a Preservação e Manejo do Mico-Leão-Preto, iniciativa que também deu origem ao primeiro registro genealógico da espécie (*Studbook*) (KLEIMAN; RYLANDS, 2008).

Em 2017, a população mundial de *L. chrysopygus* em cativeiro foi estimada em 55 indivíduos distribuídos em zoológicos brasileiros e a Europa. No exterior, o grupo em cativeiro está atualmente formado por 13 indivíduos, todos alocados no zoológico de Jersey/Durrell Wildlife Conservation Trust (Jersey, Inglaterra). No Brasil, o maior grupo em cativeiro se concentra na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, São Paulo, SP), a qual mantém 27 indivíduos. O Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ, Guapimirim, RJ) abriga 15 (WORMELL; MARQUES, 2020).

Até 2017, o manejo dos grupos *ex situ* do MLP havia sido feito unicamente através de análises de *pedigree*, as quais são realizadas para auxiliar as recomendações anuais para a reprodução dos animais em cativeiro (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017). Tal manejo visa atender metas demográficas e genéticas, como a minimização do grau de parentesco e manutenção ou aumento no número de animais e dos níveis de variação genética (FERNÁNDEZ; TORO, 1999; FOOSE; BALLOU, 1988; SONESSON; MEUWISSEN, 2001). Estas recomendações e as estimativas de diversidade genética, no entanto, são em geral baseadas em análises de *Studbook*, as quais costumam ser limitadas, uma vez que o grupo fundador frequentemente representa uma proporção desconhecida da diversidade genética total da espécie. Além disso, devido ao potencial relacionamento entre os fundadores, a diversidade genética nas gerações subsequentes costuma ser superestimada, já que comumente se assume ausência de relacionamento no grupo fundador (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017, 2020; RUDNICK; LACY, 2008).

Com a finalidade de maximizar as informações obtidas para os grupos de cativeiro e otimizar o seu manejo, mais recentemente alguns programas de reprodução *ex situ* passaram a combinar análises moleculares com as análises de *pedigree* tradicionalmente realizadas (ITO *et al.*, 2017). Neste contexto, parâmetros genéticos são estimados a partir de dados de genealogias registrados no *Studbook* e também de dados moleculares produzidos para os grupos mantidos em cativeiro. Nesta estratégia, estimativas de diversidade genética, do coeficiente de endogamia e do grau de parentesco obtidas pelas análises de *pedigree* são comparadas às obtidas por marcadores moleculares, gerando informações valiosas acerca da estrutura genética das populações em cativeiro. Uma outra estratégia extremamente interessante é a extensão dos estudos genéticos *ex situ* também para populações *in situ* (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017, 2020), com vistas ao manejo integrado da espécie, e potenciais reintroduções, caso haja necessidade.

## 1.2 Espécie estudada: *Leontopithecus chrysopygus*

O MLP foi avistado pela 1ª vez na região de Sorocaba-SP, no ano de 1822, por Johann Natterer, mas foi Johann C. Mikan quem descreveu a espécie no ano seguinte, em 1823, com o nome inicial de *Jacchus chrysopygus* (COIMBRA-FILHO, 1970; MEDICI *et al.*, 2003; VON PELZELN, 1883). Sua distribuição original abrangia as partes baixas da Mata Atlântica, localizadas entre os rios Tietê e Paranapanema (KLEIMAN; RYLANDS, 2004). No entanto, o desmatamento da floresta e substituição de seu habitat nativo por áreas urbanas e para uso agrícola, juntamente com a fragmentação das áreas de mata remanescente, manteve essa espécie sem ocorrência de registros na natureza por cerca de 65 anos, sendo esta considerada extinta durante todo esse período. Somente no ano de 1970, alguns micos leões pretos foram novamente avistados na Floresta Estadual do Morro do Diabo, localizada na região próxima ao Pontal de Paranapanema (SP) (BALLOU *et al.*, 2008; COIMBRA-FILHO, 1970; REZENDE, 2015).

Atualmente, estima-se que existam cerca de 1600 animais na natureza (REZENDE *et al.*, 2020), distribuídos em 18 distintas populações, pertencentes a sete áreas protegidas, sendo estas: Parque Estadual do Morro do Diabo, Estação Ecológica Mico-Leão-Preto, Fazenda Mosquito, Estação Ecológica Caetetus, Reserva Privada Olavo Egydio Setúbal, Estação Ecológica Angatuba e a Floresta Nacional de Capão Bonito (HOLST *et al.*, 2006; REZENDE, 2015). Essas populações fazem parte de um programa de manejo gerido pelo Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ), que abrange programas de reintrodução, translocação e ambientação, além de realizar estudos relacionados ao comportamento e ecologia da espécie (KLEIMAN; RYLANDS, 2002).

Após a redescoberta do MLP na natureza e formação dos primeiros grupos *ex situ*, os animais mantidos em cativeiro passaram a ter seus dados registrados no livro genealógico da espécie (*Studbook*) (KLEIMAN; RYLANDS, 2002). O *Studbook* do MLP tem auxiliado o manejo em cativeiro da espécie, direcionando acasalamentos com vistas a evitar o aumento da endogamia e a perda de diversidade genética. Apesar do constante esforço para manejar adequadamente essa espécie em cativeiro, o baixo número de casais reprodutores e a idade avançada de alguns animais, constituem alguns dos problemas constantemente enfrentados pelos gestores que mantêm a espécie *ex situ*.

O aumento na taxa de deformidades, a baixa mobilidade dos espermatozoides e a alta taxa de mortalidade de infantes nascidos em cativeiro apontam para um provável efeito ocasionado pela depressão por endogamia. Pouco também se conhece sobre a estrutura genética das populações de vida livre do MLP, e sobre a relação destas com os plantéis mantidos em

cativeiro, a despeito de haver registros de procedência para alguns animais que compõem, ou compuseram, os grupos de cativeiro da espécie (AYALA-BURBANO *et al.*, 2020).

Na natureza, o MLP se organiza em pequenos grupos sociais (CARVALHO; CARVALHO, 1989) constituídos de 3 a 5 indivíduos, incluindo, geralmente, um casal alfa reprodutor, juvenis e infantes (KLEIMAN, 1983; SALDANHA, 1967). As fêmeas herdam das mães o território e também a posição de reprodutora dentro do grupo. Assim, a dispersão das fêmeas costuma ser um evento não comumente observado. Apesar disso, a migração de animais de diferentes idades e sexo, para integrar-se a grupos vizinhos ou ainda novos grupos, já foi observada para a espécie (CARVALHO; CARVALHO, 1989). Os indivíduos dominantes costumam ser substituídos em decorrência de seu falecimento ou emigração (BAKER; BALES; DIETZ, 2002) e, embora, *Leontopithecus* seja considerado um gênero monogâmico, casos de poliginia já foram documentados para o mico leão dourado (MLD) *Leontopithecus rosalia* (BAKER; BALES; DIETZ, 2002).

### 1.3 Programa de reprodução do mico leão preto

Os programas de reprodução em cativeiro empenham esforços para salvar espécies quase extintas, em processo de extinção ou ainda espécies que não estão sob ameaça, tendo ainda ações realizadas para fins recreativos, educacionais e investigativos (BALLOU *et al.*, 2008). As populações cativas atuam também como uma apólice de seguro, possibilitando a sobrevivência da espécie *ex situ*, caso ocorra uma extinção ou redução drástica nas populações *in situ*, além de ser útil para obtenção de informações sobre a biologia da espécie (BALLOU *et al.*, 2008).

O grupo *ex situ* do MLP foi fundado a partir de um baixo número de indivíduos e enfrentou problemas devido as baixas taxas de reprodução e sobrevivência dessa espécie em cativeiro (BALLOU *et al.*, 2008). O primeiro plano para o manejo do grupo cativo de mico leão preto foi proposto em 1991 e incluía recomendações para a reprodução e intercâmbios de animais. Após um ano das ações, a introdução de novos indivíduos no cativeiro, devido à baixa diversidade genética e ao seu pequeno tamanho amostral foi proposta pelo Comitê Internacional de Monitoramento e Recuperação, IMRC (Internation Recovery and Management Commitee). Essa estratégia, no entanto, foi pouco viável, tendo sido recomendada uma nova estratégia que abordasse um programa de manejo de metapopulação, na qual a população núcleo seria de cativeiro (SEAL; BALLOU; VALLADARES-PÁDUA, 1990).

Como medidas para o manejo metapopulacional do MLP, foram iniciadas algumas translocações entre fragmentos com o objetivo de colonizar manchas florestais não habitadas, mas que historicamente eram áreas de ocorrência da espécie (BALLOU *et al.*, 2008). Em 1998, foi proposto que a população núcleo atingisse de 150 a 200 indivíduos, com a finalidade de maximizar a variabilidade genética dentro dos cativeiros. Porém, para isso, seria necessária uma suplementação periódica dos grupos em cativeiro com a introdução de novos animais de vida livre (BALLOU *et al.*, 1998, 2008). Na ocasião, foi sugerida a introdução de 14 novos fundadores da natureza e introduções periódicas de 3 a 4 animais por geração (VALLADARES-PADUA *et al.*, 2002). Infelizmente, tais medidas não foram implementadas.

O programa de manejo do MLP ainda contou com três tipos de movimentações experimentais, com o intuito de avaliar, através de parâmetros ecológicos e comportamentais, qual seria o tipo de movimentação com melhor potencial de ser sucedido. A primeira movimentação foi a transferência de um grupo de vida livre de MLP da Fazenda Rio Claro para a Fazenda Mosquito, onde existia um grupo que havia sido anteriormente translocado da Fazenda Rio Claro em 1995. A segunda movimentação foi a translocação de um grupo constituído de animais de vida livre e cativos. Por fim, uma terceira movimentação foi feita a partir da translocação de dois machos de vida livre em um território diferente do original, porém, dentro da mesma população. Após a avaliação das ações, constatou-se que a primeira movimentação foi a mais bem-sucedida em termos ecológicos e comportamentais (SADDY, 2003; VALLADARES-PADUA *et al.*, 2002).

Em cativeiro, embora o programa de reprodução do MLP esteja conseguindo dar continuidade aos grupos *ex situ*, novas introduções são raras e têm ocorrido de forma muito esporádica (FREITAS PD, comunicação pessoal). Desta forma, a reprodução dos animais *ex situ* tem enfrentado uma série de dificuldades devido ao baixo número de casais reprodutores e à idade avançada em que estes se encontram (AYALA-BURBANO *et al.*, 2020). Assim, o manejo populacional *ex situ* continua tendo como maior desafio, o monitoramento adequado dos grupos cativos visando assegurar sua viabilidade e expansão demográfica, além do aumento da variabilidade genética, através de introduções e translocações de indivíduos entre recintos (KLEIMAN; RYLANDS, 2008).



#### 1.4 Estudos genéticos através dos marcadores microsatélites

Dentre as principais classes de marcadores moleculares utilizadas em análises que visam caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações de espécies ameaçadas, sejam estas de vida livre ou de cativeiro, estão os microsatélites (BEAUMONT; BUFORD, 1998; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; RUSSELLO; AMATO, 2004).

Em *L. chrysopygus* estes marcadores já se mostraram extremamente eficientes para análise da variabilidade genética de populações de cativeiro e de vida livre, permitindo inclusive a diferenciação populacional baseada na distribuição de componentes principais (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017). Os marcadores microsatélites possibilitam também identificar as relações entre progênie e progenitor, podendo sugerir ou excluir uma provável paternidade (ARAÚJO, 2004) e assim estimar o grau de parentesco entre os indivíduos. Tais dados podem também ser utilizados para caracterizar os níveis de heterozigosidade individual e realizar estudos preditivos que visem produzir progênies mais heterozigóticas a partir da seleção de potenciais parentais e suas respectivas proles simuladas a partir do uso de algoritmos de predição estabelecidos especificamente para esta finalidade (AYALA-BURBANO *et al.*, 2020).

Neste contexto, tais marcadores podem ser úteis para o delineamento de acasalamentos que visem, por exemplo, maximizar a variabilidade genética e a heterozigosidade individual e minimizar as taxas de endogamia (BEAUMONT; BUFORD, 1998; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; RUSSELLO; AMATO, 2004). Além disso, a realização dos testes de paternidade e estabelecimento das relações de parentesco, permite a comparação do perfil genético dos animais, independentemente da idade, de condições fisiológicas, entre outros fatores. Isso possibilita a verificação da identidade do indivíduo na natureza ou cativeiro, em qualquer momento de sua história de vida (ALVES SILVA, 2012; PRESTI, 2010), ou mesmo após seu falecimento, caso amostras biológicas tenham sido preservadas.

A análise de animais apreendidos via tráfico ilegal também pode ser realizada através do uso de marcadores moleculares. Tal análise pode estabelecer as relações de parentesco entre os indivíduos apreendidos e possibilitar recomendações para alocação destes animais em recintos distintos, caso estes, por exemplo, sejam irmãos completos. É possível também comparar o perfil genético dos animais apreendidos com a estrutura genética das diferentes populações de vida livre, visando determinar o provável local de onde o animal foi retirado na natureza. Havendo esta possibilidade, animais caçados e vítimas de tráfico ilegal poderão eventualmente ser realocados em seu habitat de origem, e não em cativeiro. Tais estudos já vêm

sendo realizados no mico leão dourado, em parceria com a Polícia Ambiental e o ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (FREITAS PD, in prep.).

## 2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Teoricamente, os objetivos de um programa de conservação *ex situ* visam estabelecer uma população autossustentável, capaz de minimizar as perdas de diversidade genética, a endogamia e outros efeitos negativos da adaptação ao cativeiro (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Com o intuito de atingir estes objetivos, muitos esforços têm sido empenhados para tentar realizar acasalamentos entre indivíduos geneticamente menos aparentados e maximizar a contribuição genética dos indivíduos fundadores do grupo cativo. No entanto, estratégias de manejo visando minimizar o parentesco médio são mais efetivas apenas quando as relações entre os indivíduos de uma população são conhecidas (AYALA-BURBANO *et al.*, 2020).

No caso do mico leão preto, a relação entre os fundadores é desconhecida, assumindo-se inexistência de relacionamento entre estes e um coeficiente de endogamia inicial igual a zero (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017; 2020). Tal premissa, no entanto, subestima os níveis de endogamia dos animais, e conseqüentemente os parâmetros genéticos estimados nas gerações subsequentes produzidas em cativeiro. Considerando ainda que a maioria dos programas de reprodução *ex situ* de espécies ameaçadas, incluindo o do MLP, se inicia com poucos indivíduos fundadores de uma população, que em geral representa uma pequena proporção da diversidade genética total de uma espécie (RUDNICK; LACY, 2008), e que novas introduções em cativeiro são raras, é de se esperar que os estimadores de diversidade genética baseados nos registros genealógicos sejam superestimados em relação a aqueles estimados pela análise genético-molecular (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017, 2020).

Desta forma, a análise conjunta de dados moleculares e de *Studbook* pode possibilitar uma melhor compreensão das informações genéticas dos grupos existentes em cativeiro, auxiliando o manejo da espécie *ex situ*, através da determinação dos níveis de diversidade e diferenciação genética intra- e interpopulacional, dos coeficientes de endogamia. Além disso, a análise de grupos de vida livre pode evidenciar frequências alélicas específicas para os diferentes fragmentos, contribuindo para o mapeamento das populações na natureza e sua relação com o plantel *ex situ*. Estimativas sobre o grau de parentesco entre os animais de vida livre podem fornecer também informações relevantes sobre a estrutura populacional e comportamento dos grupos sociais. Todos estes dados são relevantes para o melhor

conhecimento da biologia da espécie e de suas populações, com vistas ao seu melhor entendimento e ao desenvolvimento de estratégias de manejo alternativas que contribuam de forma efetiva para a conservação do MLP.

Considerando a problemática apresentada para a espécie *L. chrysopygus*, este projeto visou alcançar os seguintes objetivos de trabalho:

Determinar os níveis de diversidade genética de grupos em cativeiro e de vida livre do mico leão preto, através da análise de marcadores de microssatélites;

1. Estimar as relações de parentesco entre os indivíduos de cativeiro com base nos dados moleculares obtidos, visando confirmar os dados genealógicos disponíveis no *Studbook* da espécie;
2. Avaliar o potencial de aplicação dos locos microssatélites para avaliar as relações de parentesco entre os indivíduos de vida livre o estabelecimento de relacionamento entre animais de vida livre, sem dados de *pedigree* previamente conhecidos, visando esclarecer questões relacionadas ao sistema social da espécie na natureza;
3. Utilizar dados disponíveis no *Studbook* da espécie para inferir sobre a relação entre cruzamentos endogâmicos e viabilidade;
4. Gerar informações úteis para serem incorporadas aos dados atualmente disponíveis no *Studbook* da espécie para que estas possam ser utilizadas nas recomendações de manejo da espécie;
5. Disponibilizar informações genéticas para as populações de vida livre, as quais futuramente possam ser utilizadas em programas de manejo metapopulacional integrado, que visem a translocação e/ou reintrodução de animais na natureza.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

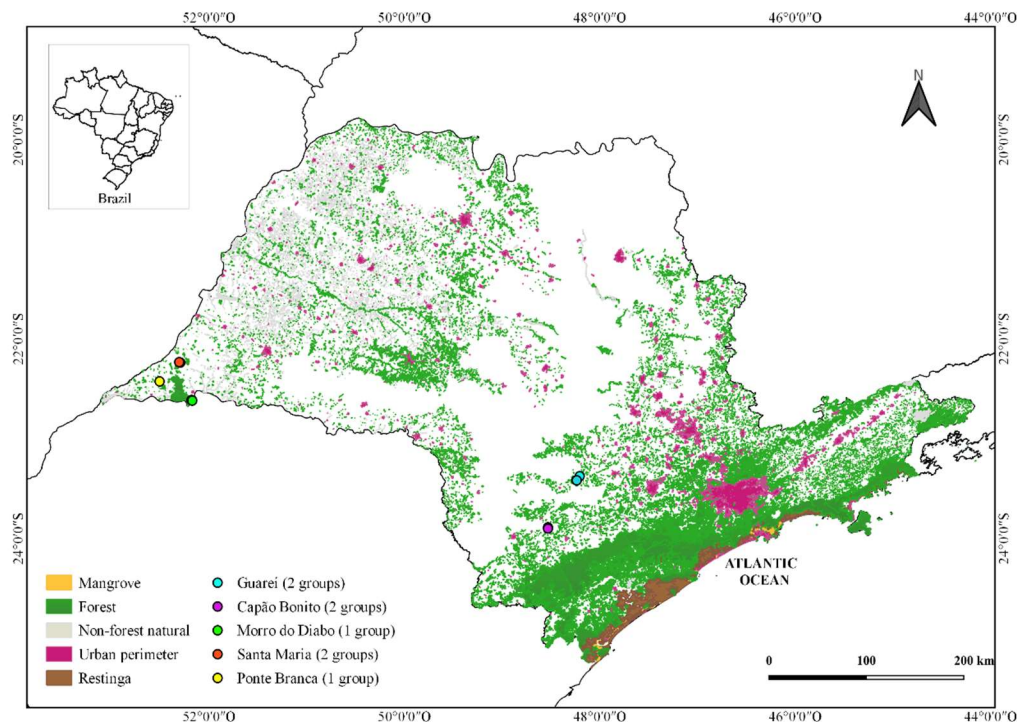
#### **3.1 Amostragem biológica e extração de DNA**

Todas as coletas e utilização das amostras biológicas de *L. chrysopygus* deste trabalho estão em acordo com as normas e requerimentos éticos e legais estabelecidas pelo SISBIO (ICMBio, MMA, Governo Federal, Brasil), autorizações números 36961-1 e 34862-2; CITES (Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção) números EX 14-65, EX 14,70, EX 14-67 e EX 14-66, 14BR015534/DF, 14BR015532/DF, 14BR015538/DF e 14BR015533/DF; pelo Comitê de Ética no Uso e

Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, números 9805200815 e 7058110316; e pelo SISGEN A411359 .

No total foram analisadas 46 amostras de micos leões pretos de cativeiro, desta 23 foram previamente coletadas durante os anos de 2015 a 2017 e 23 foram coletadas dos indivíduos atualmente mantidos nos cativeiros brasileiros e europeu, conforme a versão atual do *Studbook* da espécie (WORMELL; MARQUES, 2020). Estas amostras se distribuem da seguinte maneira: 27 animais da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, São Paulo, SP), 14 animais do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ, Rio de Janeiro, RJ) e cinco do Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT, Jersey, Inglaterra).

Na natureza, foram coletadas 18 amostras, sendo de pelo, sangue e/ou fezes de MLPs pertencentes a cinco grupos de vida livre (grupos 1, 2, 3, 4 e 5). Os grupos 1 e 2 ( $22^{\circ}14'10.87''S$ ,  $52^{\circ}17'48.79''O$ ) são provenientes da Fazenda Santa Maria (FSM), localizada na região de Presidente Epitácio (próxima a Estação Ecológica Mico Leão Preto). O grupo 1 inclui uma fêmea e um macho adulto; e o grupo 2 inclui sete indivíduos, sendo dois machos adultos, um macho filhote e quatro fêmeas adultas. O grupo 3 ( $-23^{\circ}22'34.5''S$ ,  $48^{\circ}12'29.2''W$ ), 4 e 5 ( $23^{\circ}25'04.7''S$   $48^{\circ}14'16.7''W$ ) foram capturados no fragmento Guareí, conectado à Estação Ecológica de Angatuba, no município de Guareí (SP). O grupo 3 é composto por um macho adulto, o grupo 4 é composto por oito indivíduos e inclui duas fêmeas adultas, três machos



**Figura 1** - Mapa do Estado de São Paulo destacando os grupos pertencentes à Floresta Nacional de Capão Bonito, à Fazenda Santa Maria, à Estação Ecológica Mico Leão Preto, ao Parque Estadual Morro do Diabo e o Guareí, **Fonte:** Ayala-Burbano, P.A. 2019, baseado em informações disponíveis no SOS Mata Atlântica.

adultos, um macho infante e uma fêmea juvenil e o grupo 5 é composto por um macho adulto. A distribuição geográfica desses grupos está representadas na Figura 1.

Além de produzir novos dados moleculares para estes grupos de vida livre, dados previamente produzidos para dois outros grupos da Floresta Nacional de Capão Bonito (localizada na região de Buri, SP), analisados anteriormente por Ayala-Burbano *et al.* (2017), com o mesmo painel de marcadores utilizado no presente trabalho. foram reanalisados e integrados a este trabalho.

As amostras de sangue venoso periférico foram coletadas utilizando-se seringas para sucção de aproximadamente 0,2 centímetro cúbico (200  $\mu$ L) de sangue por indivíduo. Uma vez coletado o sangue, este foi preservado em tubos *Vacutainer* contendo anticoagulante EDTA. Posteriormente os tubos foram acondicionados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Na impossibilidade de coleta de sangue, amostras de pelo foram coletadas a partir da retirada manual de alguns tufo contendo bulbo piloso ou fezes. Os pelos foram acondicionados em envelopes de papel com sílica gel e mantidos em temperatura ambiente. Amostras de fezes foram coletadas e acondicionadas em álcool 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A extração de DNA das amostras de sangue e pelo foram feita usando o protocolo fenol-clorofórmio proposto por Sambrook *et al.* (1989). As amostras de fezes foram extraídas utilizando o kit QIAGEN Fast DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA extraído foi checada em gel de agarose 1% numa condição de corrida de 90 V por 30 minutos, e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro (GE NanoVue Plus, GE Healthcare, Chicago, Estados Unidos).

### 3.2 Amplificação dos locos de microssatélites

As reações de amplificação de DNA foram realizadas seguindo o protocolo de Ayala-Burbano *et al.* (2017) e de Schuelke (2000), no qual adiciona-se à PCR um terceiro primer universal M13 marcado com um fluoróforo (FAM, NED, PET, VIC) e um dos primers (forward ou reverse) flanqueador do microssatélite contendo uma cauda complementar M13. As amplificações foram realizadas usando-se 1x de GoTaq® (PROMEGA, Madison, Estados Unidos), 1x Buffer, 0,46 pmol dos primers reverse e M13, 0,12 pmol do primer forward, 0,30 mg/mL de BSA, 0,75 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  a 50 ng de DNA, 0,25 mM de cada dNTPs e 3,85  $\mu\text{L}$  de água milli-Q, completando um volume final de 10  $\mu\text{L}$  de reação.

As condições da PCR incluíram uma etapa de desnaturação à  $94^{\circ}$  por 5", seguida de 30 ciclos de 30" à  $94^{\circ}\text{C}$ , um gradiente de alinhamento específico para cada loco durante 45" e mais

8 ciclos adicionais, distribuídos da seguinte maneira: 30” à 94°C, 45” à 53°C (temperatura de alinhamento da cauda M13 marcada), 45” à 72°C, e finalmente uma etapa de extensão de final à 72°C por 10”.

Inicialmente foi testado um painel de 15 locos microssatélites sendo oito deles descritos especificamente para a espécie *L. chrysopygus* (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2008), quatro para *Leontopithecus chrysomelas* (GALBUSERA; GILLEMOT, 2008) e três locos descritos para *Leontopithecus rosalia* (GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER, 2001).

**Tabela 1** - Informações sobre os locos microssatélites utilizados nesse estudos, como as sequências dos *primers forward* e *reverse*, temperatura de anelamento (TA) e fluorescência utilizada.

Espécies	Locos	Sequências do <i>Primers</i> (5'-3')	TA (°C)	Fluorescência
<i>L. chrysopygus</i>	Leon2	F: CTGCTTCTTGTTCCACTTCTTCTC R: GTTTGGGTGGTTGCCAAG	55	FAM
	Leon3c20	F: CTGTATGTGATCGCTTTTACCTG R: AAGGCAATCTAACTAATCAACACTC	60	NED
	Leon11c72	F: AGGATTACAGGTGCCAC R: TTGCATATTGTGTTCAACTTC	60	VIC
	Leon15c85	F: CTGATCCTTGAAGCAGCATTG R: GGTAAAGGGGTTTCGTTCTGTG	60	FAM
	Leon21c75	F: CAGTTGAGGGAACAGGAATTA R: CACTGCACTGACAGAGCAAG	60	FAM
	Leon30c73	F: GGACCTGATTGAAGCAGTC R: TTCCTGAGAATCTAATGGAG	60	NED
	Leon31c97	F: TGGTCCAGAGAAATGATGTC R: GTAATTCCTTGGATTTATGCC	58	PET
	Leon35c42	F: GTGAAAAGGTTTCAGAATATC R: TGCAGTTGCCACACTTA	60	FAM
<i>L. chrysomelas</i>	Lchu1	F: GCTCAGGTGTTATTTATGTCCAAA R: GTTTCTTGCAACTATCTTGCATGTTCTGC	58	FAM
	Lchu6	F: GCCTTAATTAGCACCAAGAAC R: GTTTCTTACCCTCAAGCCTTCAGTA	55	PET
	Lchu7	F: TCTCATTCTTCTCATGGACTC R: GTTTCTTCTTGACTCACAGCATGACCT	55	FAM
	Lchu8	F: CACGGCAATGTGGGAATAA R: GTTTCTTTTCAGTAGTTGGGACTGGGATAA	58	VIC
	Lr.P2BH6	F: TCTGTTTGAATCCCCAGTCC R: GCAGTCCCTCAAGGTTTTTCT	55	PET
<i>L. rosalia</i>	Lr.P5BE6	F: TGTGCATGCTTGCCTGTGTC R: ATCTCACTGGACCCACCT	55	PET
	Lr.P3AF1	F: CCATCCTGGCCAACATAGGT R: GTAGCTGGGATTACAGGCAC	62	FAM

A visualização dos produtos de amplificação foi feita através de eletroforese, adicionando de 2 µL de cada amostra a 1 µL de azul de bromofenol e 1 µL de GelRed. O gel utilizado foi de agarose 2%, sendo este submetido a uma voltagem de 100V por 30 minutos. As amostras que apresentaram padrão de amplificação satisfatório foram genotipadas em sequenciador automático (Applied Biosystems 3730XL). O estabelecimento de genótipos e alelos foi realizado utilizando o software Geneious 6.0.6 (DRUMMOND *et al.*, 2011). Nesta

etapa apenas 12 locos foram mantidos, sendo excluídos três locos descritos para *L. rosalia*. (Tabela 1), devido à dificuldade de amplificação em amostras de DNA obtidas de material biológico mal preservado principalmente de pelos, fezes e alíquotas de sangue mal preservadas. As análises realizadas para a redução do painel de microssatélite foram realizadas no programa R (versão 4.02) (R CORE TEAM, 2014), a partir de um script desenvolvido por Carvalho et al. (2020) *in prep.*, utilizando metodologia descrita por Waits *et al* (2001).

### 3.3 Análise da diversidade genética

A ocorrência de alelos nulos, alelos dropout e stuttering foi avaliada no programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos locos foi estimado no programa Cervus 3.0.3 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). A determinação do número alelos ( $N_a$ ) e dos valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), observada ( $H_o$ ) e de coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) foi realizada utilizando o programa GenAIEx 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). A riqueza alélica ( $R_a$ ) e a diferenciação populacional ( $F_{st}$ ) foram determinada pelo software FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 1995) e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) entre os pares de locos foi testado no programa Genepop (RAYMOND; ROUSSET, 1995). As estimativas para o desvio de HWE e deficiência de heterozigotos foram obtidas pelo algoritmo Cadeia de Markov-Monte Carlo (MCMC). Foi utilizada também a correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) para todos os testes realizados, visando corrigir os intervalos de confiança obtidos para valores significativos. Os testes de Shapiro-Wilk, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para analisar a normalidade e diferenças significativa entre duas ou mais amostras, respectivamente, através do GraphPad Prism 7.00 (SWIFT, 1997).

### 3.4 Estruturação Genética

A estrutura populacional foi verificada através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando o programa GenAIEx 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Foi utilizado também o programa Structure versão 2.1 (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2003) para avaliar a estrutura populacional, considerando 10 repetições para cada corrida, para  $k= 1-6$ , utilizando

o modelo de mistura (admixture model) com 200.000 interações MCMC e 40.000 burnin. O número de grupos genéticos foi determinado o Struture Haverst (EARL; VONHOLDT, 2012)

### 3.5 Análise de *Pedigree*

Para realizar a genealogia da espécie em cativeiro foi utilizado o programa *Pedigree Viewer* versão 6.5 (KINGHORN; KINGHORN, 1994). O valor de parentesco entre os casais reprodutores dos cativeiros foi calculado com o programa PMx 1.6.2 (LACY; BALLOU; POLLAK, 2012), considerando que o coeficiente de parentesco entre dois indivíduos é igual ao coeficiente de consanguinidade da prole que é produzida pelo acasalamento entre esses dois indivíduos (LACY; BALLOU; POLLAK, 2012).

### 3.6 Teste de Paternidade

A verificação da paternidade foi realizada no programa Cervus 3.0.3 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). Para atribuir confiança a esses dados, o candidato parental mais provável de cada indivíduo foi determinado pelo valor estatístico LOD, obtido a partir do logaritmo natural da razão da verossimilhança. As simulações foram realizadas com 100.000 filhos, três candidatos pais/mãe e 10% de erro, e nível de confiança estrito de 95% e relaxado de 80%. Para os animais de vida livre foram testados como pais/mães candidatos todos os indivíduos adultos do grupo. Esse programa analisa o parentesco através de uma análise de probabilidade, entre duas hipóteses, a hipótese nula (H1), em que o pai candidato é o pai verdadeiro e a hipótese alternativa (H2), em que o pai candidato não é o pai verdadeiro (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007; MARSHALL et al., 1998).

A razão de verossimilhança é calculada a partir da divisão da probabilidade de que o pai candidato seja o pai verdadeiro pela probabilidade de o pai candidato não ser o pai verdadeiro. Desta forma, valores altos de razão de verossimilhança indicam que o pai candidato tem maior probabilidade de ser o pai verdadeiro, do que não ser (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007; MARSHALL et al., 1998). Nas análises de parentesco, a razão de verossimilhança é transformada em LOD a partir da obtenção do logaritmo natural, assim, o valor de LOD positivo indica que o pai candidato tem maior probabilidade de ser o pai verdadeiro, do que não ser; um valor de LOD igual a 0 indica que a probabilidade do pai candidato ser o pai verdadeiro é a mesma que não ser e um valor de LOD negativo indica que o pai candidato tem maior



probabilidade de não ser o pai verdadeiro, do que ser (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007; MARSHALL et al., 1998).

Além dos dados de microssatélites usados nos testes de paternidade, dados de *Studbook* da espécie (WORMELL; MARQUES, 2020) e dados mitocondriais (MODENA *et al.*, in prep.) obtidos para os grupos *ex situ* e *in situ*, respectivamente, foram incorporados a estas análises para avaliar a confiabilidade das informações de parentesco geradas e avaliar seu potencial de uso em análises de animais de vida-livre, sem relações de *pedigree* conhecidas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Alteração no painel de microssatélites

O painel de microssatélite inicialmente utilizado nesse estudo, proposto por Ayala-Burbano *et al.* (2017), incluía 15 locos de microssatélites, sendo oito deles homólogos para a espécie (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2005) e sete heterólogos, com quatro locos específicos para o mico leão de cara dourada (GALBUSERA; GILLEMOT, 2008) e três para o mico leão dourado (GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER, 2001).

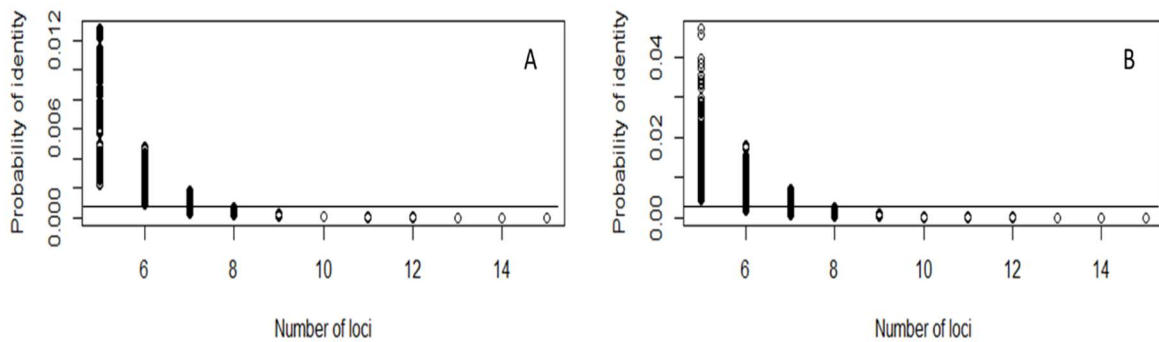
Após a amplificação desses locos em um amplo conjunto de amostras de MLP, incluindo animais de vida livre e de cativeiro, alguns desses marcadores, no entanto, demonstraram padrões de amplificação insatisfatórios, evidenciando monomorfismo, baixa reprodutibilidade ou ausência de amplificação, principalmente para amostras coletadas de animais de vida livre, as quais incluem pelos, fezes e alíquotas de sangue conservadas indevidamente (por exemplo em álcool 70%). Desta forma, visando estabelecer um painel de locos adequado para o monitoramento da diversidade genética no MLP e estabelecimento das relações de parentesco *ex situ* e *in situ*, sem comprometer a qualidade dos resultados obtidos no presente estudo e em análises futuras, implementamos uma abordagem que permitisse associações aleatórias entre diferentes conjuntos de microssatélites para assim verificar o número mínimo de locos necessários para as inferências genéticas propostas.

Inicialmente, estas análises para estabelecimento do número mínimo de locos informativos para a espécie foram conduzidas baseadas no princípio de curva do coletor (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2009) e estabilização dos valores para a probabilidade de identidade (PID), que consiste na probabilidade de dois indivíduos retirados aleatoriamente da população terem o mesmo genótipo para vários locos. Esse estimador é muito utilizado para obter

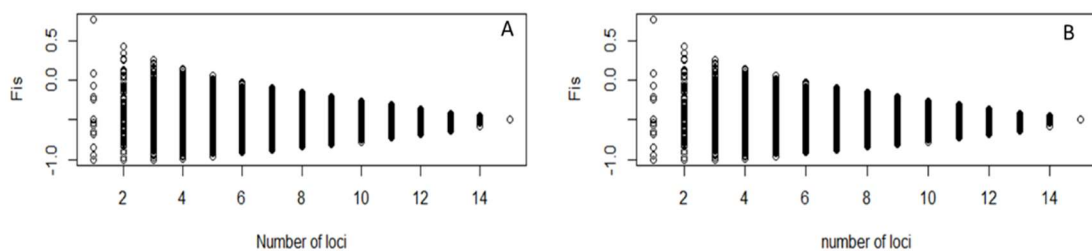
confiança estatística para a identificação individual e também para quantificar o nível de diversidade genética em uma população (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001). Posteriormente estas análises foram extrapoladas para os índices de heterozigosidade e coeficientes de endogamia estimados.

Neste sentido, os valores de PID foram primeiramente calculados para um conjunto de cinco locos, considerando-se todas as possibilidades de combinação, e posteriormente, novos marcadores foram sendo adicionados a este conjunto, seguindo os mesmos princípios de análise combinatória multifatorial. Após isso, foi gerada uma curva para demonstração da variação dos valores de PID para cada conjunto de locos considerado (5 a 15). O resultado dessa análise evidenciou que para ambos os grupos *in situ e ex situ*, a partir da utilização de 12 locos, os valores de PID situam-se entre 0,001 e 0,0001 (Figura 2), sendo estes recomendados para estudos com aplicações forenses em populações naturais (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001).

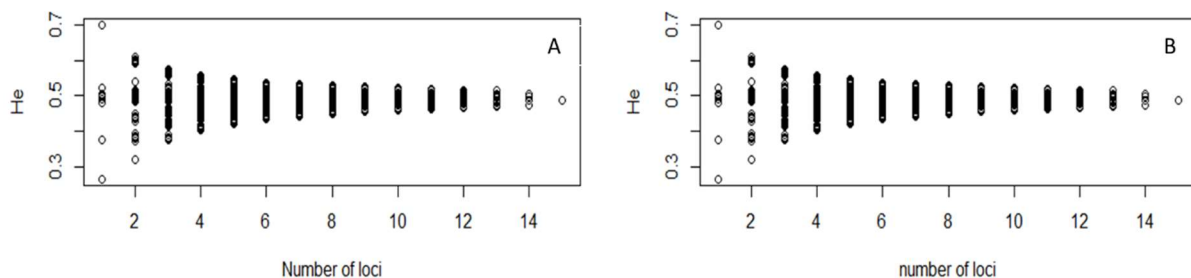
Além da probabilidade de identidade, essa análise foi implementada considerando também os valores de coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) (Figura 3) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) (Figura 4). Esta análise também foi feita considerando-se um mínimo de 5 e máximo de 15 locos, visando-se comparar com os resultados obtidos previamente por Ayala-Burbano *et al.* (2017) para grupos de cativeiro e de vida livre com o conjunto completo de 15 locos de microssatélites. Os gráficos mostraram que estes estimadores se mantem igualmente informativos utilizando-se 12, 13, 14 ou 15 locos. Desta forma, três locos heterólogos (P3AF1, P5BE6 e P2BH6), que apresentaram baixa eficiência de amplificação nas novas amostras avaliadas, foram desconsiderados nas análises posteriores.



**Figura 2** - Probabilidade de identidade (PIB) estimada para a metapopulação brasileira (A; N=37) e para uma população de vida livre pertencente a Floresta Nacional de Capão Bonito (B; N=10), usando uma combinação de 5 a 15 loci microssatélites. Cada ponto representa um set de loci simulado. As linhas horizontais nos gráficos representam os valores recomendados para aplicações forenses em populações naturais segundo Waits et al, 2001.



**Figura 3** - Coeficiente de endogamia (Fis) estimado para a Metapopulação Brasileira (A; N=37) e para uma população de vida livre pertencente a Floresta Nacional de Capão Bonito (B; N=10), usando uma combinação de 1 a 15 loci microssatélites. Cada ponto representa um set de loci simulado.



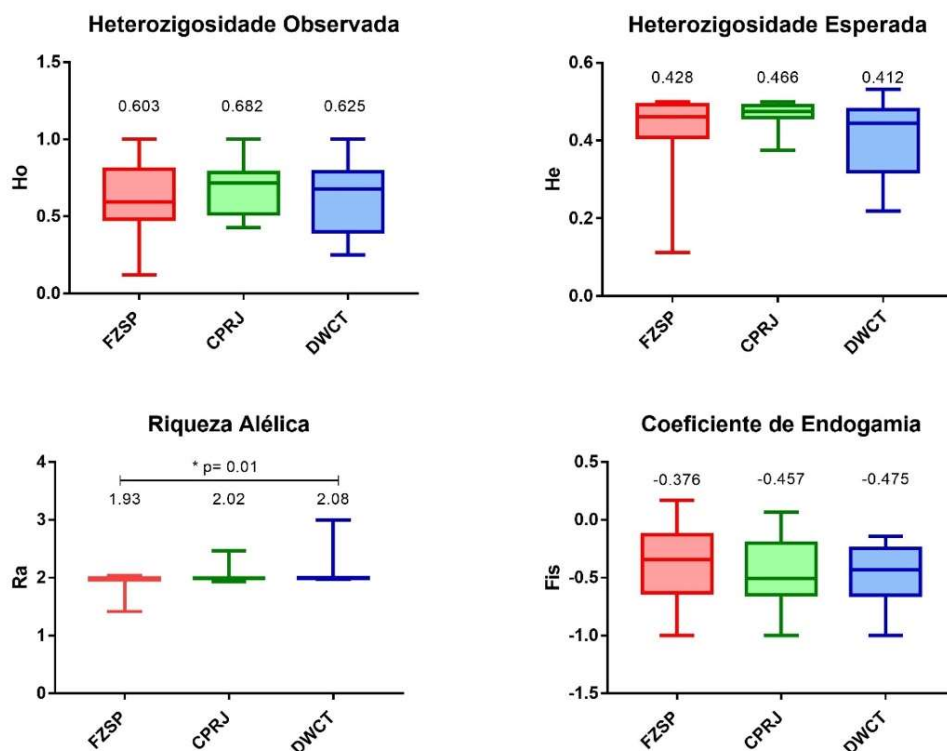
**Figura 4** - Heterozigosidade esperada estimada para a Metapopulação Brasileira (A; N=37) e para uma população de vida livre pertencente a Floresta Nacional de Capão Bonito (B; N=10), usando uma combinação de 1 a 15 loci microssatélites. Cada ponto representa um set de loci simulado.

## 4.2 Análise dos grupos *ex situ*

### 4.2.1 Diversidade genética

Foram utilizados 12 locos microssatélite que demonstraram padrões de amplificação satisfatórios para a espécie. Não foram encontrados alelos nulos, alelos dropout e stuttering para os grupos cativos atuais para nenhum grupo analisado. O valor médio de PIC estimado foi de 0,352 para o conjunto de marcadores testados, indicando que esses locos são razoavelmente informativos (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

Foram calculados os estimadores genéticos para os grupos da Fundação Zoológico de São Paulo (FPZSP), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT), que é composto pelos animais representantes da população cativa atual de acordo com o *Studbook* (WORMELL, MARQUES, 2020).



**Figura 5** - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela a heterozigosidade esperada, riqueza alélica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia dos grupos *in situ*. FZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust.

Os valores para heterozigidade esperada (He) e observada (Ho), coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ), riqueza alélica (Ra) e alelos privados, por locos, para os grupos de cativeiro do CPRJ, da FPZSP e do DWCT, estão indicados na Tabela 2 e Figura 5.

**Tabela 2** - Diversidade genética dos grupos cativos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT).

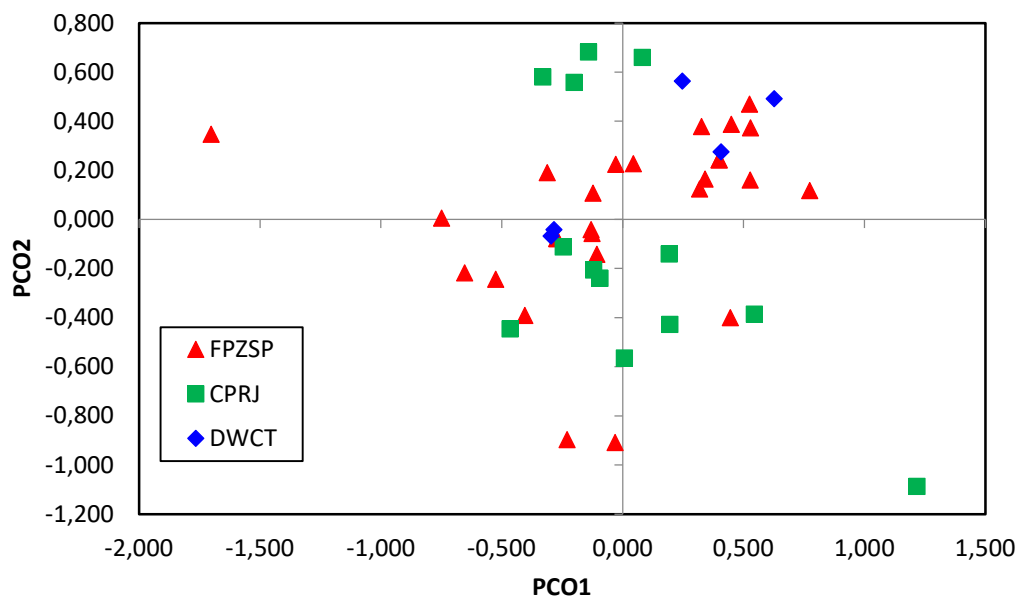
Locus	N	Na	Ra	Ho	He	$F_{is}$	HW	Alelos Exclusivos
<b>Fundação Parque Zoológico de São Paulo - FPZSP</b>								
Lchu01	26	2	1.969	0.577	0.440	-0.311	0.11	-
Lchu6	25	2	1.944	0.480	0.403	-0.190	0.34	-
Lchu7	23	2	1.96	0.609	0.423	-0.438	0.04*	-
Lchu8	25	2	1.414	0.120	0.113	-0.064	0.75	-
Leon2	27	2	1.977	0.630	0.456	-0.380	0.05*	-
Leon3	27	2	1.982	0.519	0.466	-0.112	0.56	-
Leon11	27	2	1.996	1.000	0.500	-1.000	0.00*	-
Leon15	27	3	2.035	0.481	0.374	-0.288	0.44	-
Leon21	27	2	1.99	0.815	0.483	-0.688	0.00*	-
Leon30	27	2	1.995	0.778	0.497	-0.564	0.00*	-
Leon31	27	2	1.994	0.815	0.494	-0.650	0.00*	-
Leon35	27	2	1.992	0.407	0.489	0.167	0.39	-
<b>Média</b>			1.937	0.603	0.428	-0.376		-
<b>Centro de Primatologia do Rio de Janeiro - CPRJ</b>								
Lchu01	14	2	1.935	0.500	0.375	-0.333	0.21	-
Lchu6	14	2	1.986	0.714	0.459	-0.556	0.04*	-
Lchu7	14	2	1.996	0.857	0.490	-0.750	0.01*	-
Lchu8	14	4	2.469	0.500	0.441	-0.133	0.00*	236
Leon2	14	2	1.996	0.571	0.490	-0.167	0.53	-
Leon3	14	2	1.986	0.429	0.459	0.067	0.80	-
Leon11	14	2	1.998	1.000	0.500	-1.000	0.00*	-
Leon15	14	2	1.986	0.714	0.459	-0.556	0.04*	-
Leon21	14	2	1.992	0.786	0.477	-0.647	0.02*	-
Leon30	14	2	1.992	0.786	0.477	-0.647	0.02*	-
Leon31	13	2	1.992	0.615	0.473	-0.300	0.28	-
Leon35	14	2	1.996	0.714	0.490	-0.458	0.09	-
<b>Média</b>			2.027	0.682	0.466	-0.457		-
<b>Durrell Wildlife Conservation Trust - DWCT</b>								
Lchu01	5	2	2.000	0.800	0.480	-0.667	0.14	-
Lchu6	5	2	1.978	0.400	0.320	-0.250	0.58	-
Lchu7	5	2	1.978	0.400	0.320	-0.250	0.58	-
Lchu8	4	2	2.000	0.250	0.219	-0.143	0.78	-
Leon2	4	2	2.000	0.750	0.469	-0.600	0.23	-
Leon3	5	2	2.000	0.600	0.420	-0.429	0.34	-
Leon11	5	2	2.000	0.800	0.480	-0.667	0.14	-
Leon15	4	3	3.000	0.750	0.531	-0.412	0.70	-
Leon21	5	2	2.000	1.000	0.500	-1.000	0.03*	-
Leon30	5	2	2.000	0.600	0.420	-0.429	0.34	-
Leon31	4	2	2.000	0.750	0.469	-0.600	0.23	-
Leon35	5	2	1.978	0.400	0.320	-0.250	0.58	-
<b>Média</b>			2.078	0.625	0.412	-0.475		-

\* Valores estatisticamente significativos. – Ausência de alelos exclusivos. N: número de amostras genotipadas, Na: número de alelos, Ra: riqueza alélica, Ho: heterozigidade observada, He: heterozigidade esperada,  $F_{is}$ : coeficiente de endogamia HW: valores de p obtidos para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Ho média observada foi maior que a He média esperada em todos os grupos analisados, assim como o coeficiente de endogamia médio se apresentou negativo em todos os

grupos, demonstrando que há um excesso de heterozigoto nos grupos *ex situ*. Os valores de heterozigosidade observada, esperada e os coeficientes de endogamia não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos cativos, no entanto, DWCT apresentou um valor de riqueza alélica significativamente maior comparado à FPZSP ( $p=0,01$ ). Em relação ao número de alelos, o CPRJ apresentou o maior número, contando com 26 alelos, sendo um deles exclusivo (236 – Lchu08), seguido pelo DWCT que apresentou 25 alelos e o FPZSP apresentou 24 alelos, sendo que estas duas instituições não apresentaram alelos exclusivos em sua amostragem.

Os valores de  $F_{st}$  (Tabela 3) encontrados são baixos ( $<0,15$ ), demonstrando que não há diferenciação genética entre os grupos analisados (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Esses valores corroboram com as análises de PCoA (Figura 6) e análise de inferência bayesiana (Figura 7), que demonstram ausência de estruturação genéticas entre os cativos, apresentando uma configuração com tendência a estrutura de uma metapopulação.



**Figura 6** - Análise de Coordenadas Principais mostrando a pontuação na primeira e na segunda coordenada principal com base na matriz de distância genética para o conjunto de dados genéticos obtidos para os grupos cativos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Fundação Zoológica de São Paulo (FPZSP) e europeu, Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT), baseados nas frequências genéticas.

**Tabela 3** - Valores de  $F_{st}$  par a par encontrado nos grupos *ex situ* brasileiros e europeu.

Valores de $F_{st}$ par a par	FPZSP	CPRJ
CPRJ	0.0191	
DWCT	-0.0024	0.0163



**Figura 7** - Análise de estruturação ( $K=2$ ) entre os três grupos analisados Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT).

#### 4.2.2 Análise de parentesco

As relações de parentesco baseadas nos dados moleculares de todas as famílias do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e da Fundação Zoológico de São Paulo foram analisadas no programa Cervus, com 100.000 simulações, com nível de confiança restrito (95%) e relaxado (80%). Os resultados dessas análises estão descritos na Tabela 4. Para estas análises não foram informados ao programa quem são os pais/mães conhecidos, apenas os candidatos. Os resultados das análises de maternidade e de paternidade, demonstram que 85,7% (24 pares) e 96,3% (26 pares) dos relacionamentos tiveram atribuições corretas, respectivamente (Tabela 4). Todas as análises moleculares foram comparadas posteriormente com os dados de parentesco disponíveis na última versão do *Studbook* da espécie, confirmando os parentescos estabelecidos.

Dos 25 pares de maternidade (mãe/filho) analisados, 24 (96%) foram atribuídos corretamente, destes, 5 (21%) obtiveram 95% de confiança, 13 (54%) obtiveram 80% de confiança, e apenas 6 (25%) pares não apresentaram nível de confiança. Entre os 28 casos de paternidade (pai/filho) avaliados, 26 (96%) foram atribuídas corretamente, destes, 5 (19%) pares obtiveram 95% de confiança, 12 (46%) obtiveram 80% de confiança e 9 (35%) não apresentam nível de confiança. Foram analisados também 25 trios (pai/mãe/filho), destes, 22 (88%) foram atribuídos corretamente, sendo que destes 5 (23%) obtiveram 95% de confiança, 8 (36%) obtiveram 80% de confiança e 9 (41%) não apresentaram níveis de confiança.

**Tabela 4** - Resultado das análises de paternidade dos animais mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.

Prole	Mãe Atribuída	LOD do Par	N.C.	Pai Atribuído	LOD do Par	N.C.	LOD do Trio	N.C
TE67	°	°	°	457	2.56	*	°	°
TE75	°	°	°	457	2.34	*	°	°
TE76	°	°	°	457	2.88	*	°	°
TE72	432	0.77	+	A.I.	4.27			
TE74	432	3.86	*	392	4.04	*	4.44	+
470	432	4.83	*	392	8.69	*	10.41	*
491	430	2.53	+	412	1.18	+	7.49	*
496	430	1.71	+	412	0.35	+	3.26	+
502	430	5.50		412	4.14		4.34	
TE64	430	1.57		412	0.22		3.50	+
TE65	430	2.81	*	412	0.89		8.05	*
TE66	430	2.53	+	412	1.18	+	7.49	*
467	430	8.94	*	412	0.31		10.10	*
473	430	3.87	*	A.I.	2.92	*	4.12	+
497	A.I.	0.56	+	412	0.09	+	0.24	
472	430	1.21	+	412	4.92		0.01	
471	430	0.24	+	412	0.77	+	4.24	+
486	408	1.04	+	312	1.79	+	2.19	+
427	408	1.04	+	312	1.79	+	2.19	+
387	408	1.57	+	312	2.32	+	3.44	+
481	408	0.57	+	312	3.73	+	4.45	
431	408	0.06	+	312	3.11	+	3.20	
425	408	0.49	+	312	0.03	+	0.51	+
428	408	3.73	+	312	3.66	+	4.49	
TE68	481	2.86		425	0.46		5.94	
TE69	481	4.82		425	0.67		8.26	
TE70	481	4.33		425	0.85		7.94	
TE71	481	4.05		425	0.97		8.06	

**A.I.:** Atribuição Incorreta. **Pai/mãe atribuído:** parental mais provável, atribuído pelo programa. **LOD do Par:** logaritmo natural da razão da verossimilhança das relações progenitor-progênie entre o pai/mãe atribuído e o filho. Esses valores são expressos em notação científica  $10^{14}$ . **N.C:** Nível de confiança da atribuição usando o 95%(\*) e 80% (+). Os casos indicados com ° não foram resolvidos devido à falta de genótipos materno em nossa amostragem.

### 4.3 Monitoramento da diversidade genética dos grupos de cativeiro

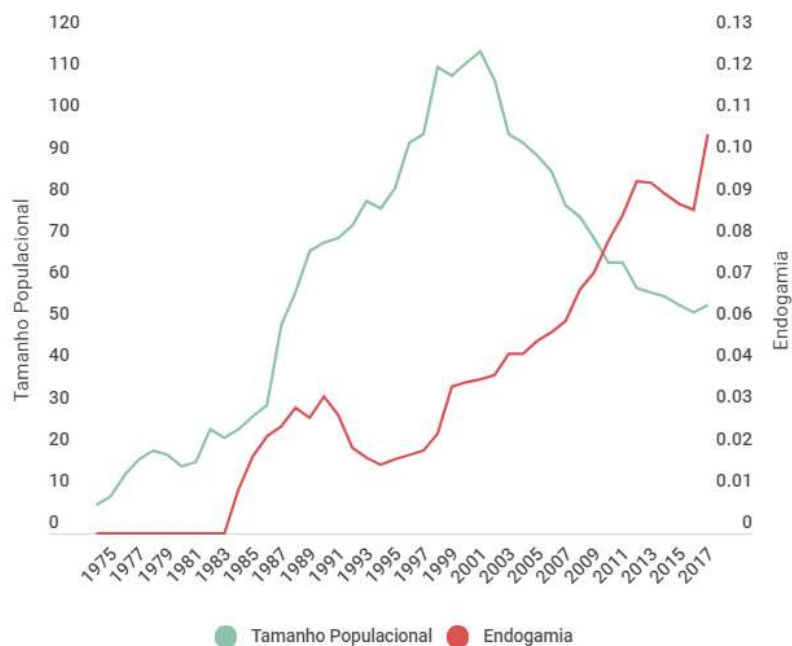
#### 4.3.1 Análise do *Studbook*

Em relação a dinâmica populacional dos grupos em cativeiro, observamos que durante os anos de 2014 e 2018, 11 animais vieram a óbito, 15 nasceram, cinco foram translocados e um animal de vida-livre foi introduzido em cativeiro. Na FPZSP, o número de micos leões pretos mantidos na instituição passou de 16 em 2014 para 27 em 2018, sendo que doze MLPs nasceram, três foram a óbito, um foi introduzido da natureza, três foram translocados do Parque Ecológico de São Carlos (PESC, São Carlos, SP), e outros três foram transferidos para o DWCT, em 2017,

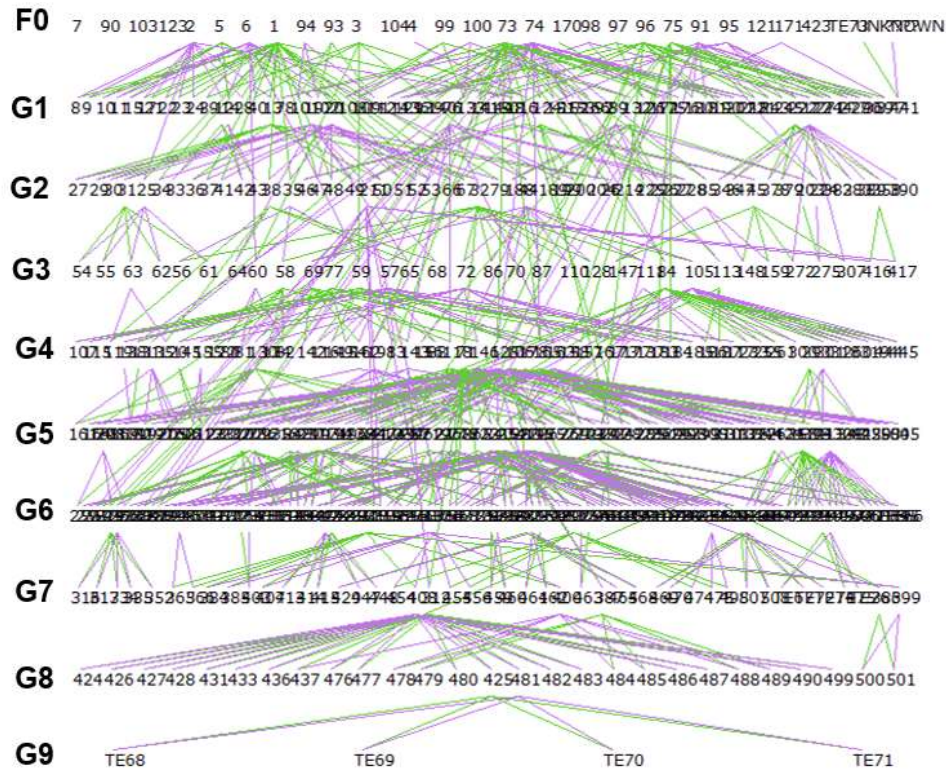


devido as recomendações de manejo dadas pelo *Studbook Keeper* da espécie. No CPRJ houve uma diminuição no número de MLPs, sendo que em 2014, existiam 17 animais, e atualmente existem apenas 14 MLPs. Embora tenham nascido quatro MLPs nesse período, essa diminuição se deve ao fato de que quatro animais vieram a óbito e dois animais foram transferidos para o DWCT. Em DWCT houve um aumento no número de MLPs devido justamente a este manejo e o plantel passou de nove animais em 2014 para 13 animais em 2018.

A representação gráfica realizada a partir de dados genealógicos indicou que há 9 gerações (Figura 9), sendo que F0 representa os indivíduos fundadores do primeiro grupo *ex situ* da espécie. Os animais vivos atualmente representam as últimas cinco gerações (G5, G6, G7, G8 e G9). A partir dos dados presentes no *Studbook* foi possível estimar a endogamia de heredograma, calculada por meio do coeficiente de endogamia (F), que demonstra a probabilidade de que indivíduos sejam idênticos por descendência (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Desta forma, podemos observar no gráfico (Figura 8) que há um aumento na endogamia ao longo dos anos, devido ao baixo número de casais reprodutores ao alto grau de parentesco entre estes. Ainda é possível observar que o tamanho populacional apresenta uma drástica redução a partir de 2003. Ainda, podemos observar que entre os anos de 2014 e 2017 houve um aumento na endogamia e diminuição do tamanho populacional.



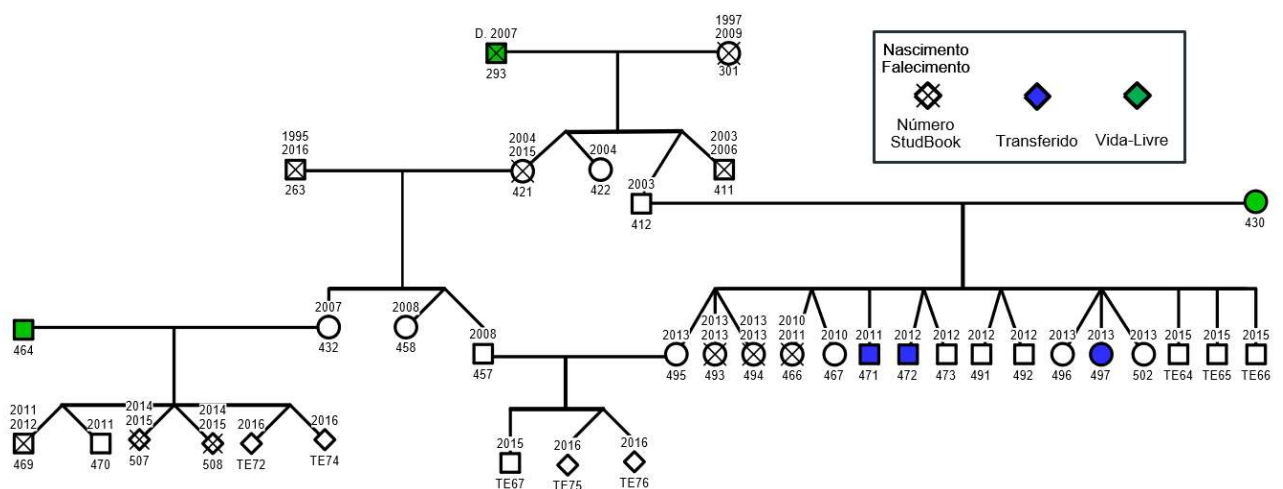
**Figura 8** - Relação entre o tamanho populacional e a endogamia média por ano no cativeiro. A linha vermelha mostra a variação do coeficiente de endogamia de heredograma e a linha verde representa o tamanho populacional.



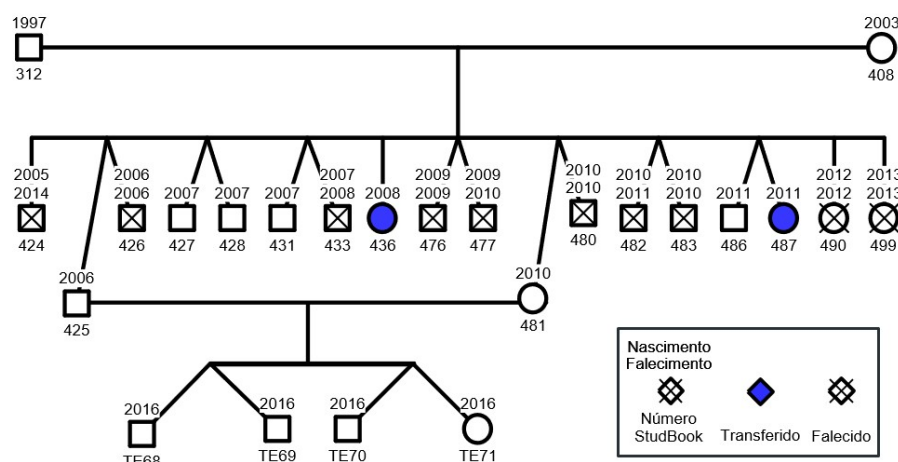
**Figura 9** - Representação do *pedigree* do mico leão preto, segundo dados do *Studbook*. Linhas verdes indicam os machos. Linhas roxas indicam fêmeas. F0 representa os indivíduos fundadores e G1-9 as gerações.

Em relação à estrutura familiar, de acordo com a versão atual do *Studbook*, existem atualmente três famílias de MLPs na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Como demonstrado na Figura 10, a primeira delas é formada por cinco indivíduos (434, 464, TE72, 470 e TE74), sendo que o macho reprodutor dessa família é proveniente do Parque Estadual do Morro do Diabo (Teodoro Sampaio, SP) e a fêmea descende de indivíduos nascidos em cativeiro; o casal reprodutor dessa família possui coeficiente de parentesco calculado com base nas análises de *pedigree*, igual a zero, devido a não ter relações de parentesco com base na genealogia. Já a segunda família, composta por cinco indivíduos (457, TE67, TE75 e TE76 e 495), possui os seus reprodutores aparentados, sendo que estes possuem coeficiente de parentesco igual a 0,09. A terceira família é a maior delas, sendo constituída por 15 indivíduos (412, 495, 502, TE64, TE65, TE66, 491, 492, 496, 467, 473, 497, 471, 472, 430), na qual a fêmea reprodutora é proveniente da região de Buri e o macho descende de indivíduos nascidos na FPZSP; desta forma, o coeficiente de parentesco desse casal também é zero. Três filhotes desse casal foram recentemente enviados para o Durrel Wildlife Conservation Trust, Jersey, como medida de manejo (Marques M, comunicação pessoal).

O Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) possui duas famílias (Figura 11): a família 1 é constituída por 10 indivíduos (312, 425, 486, 427, 431, 428, 481, 487, 436, 408), sendo o casal reprodutor descendente de indivíduos nascidos no próprio CPRJ e possui coeficiente de parentesco igual a 0,21. Desses indivíduos, dois deles também foram enviados para Jersey como medida de manejo. A segunda família é constituída por seis indivíduos (425, TE68, TE69, TE70, TE71 e 481), sendo que o casal reprodutor possui relação de irmãos completos, e coeficiente de parentesco igual a 0,39.



**Figura 10** - Heredograma dos micos leões pretos mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, de acordo com os dados disponíveis no Studbook da espécie. Os indivíduos marcados com a cor azul foram transferidos para Durrell Conservation Trust como medida de manejo. A cor verde indica os indivíduos que vieram da natureza. As linhas inclinadas indica a relação de gêmeos entre os indivíduos.

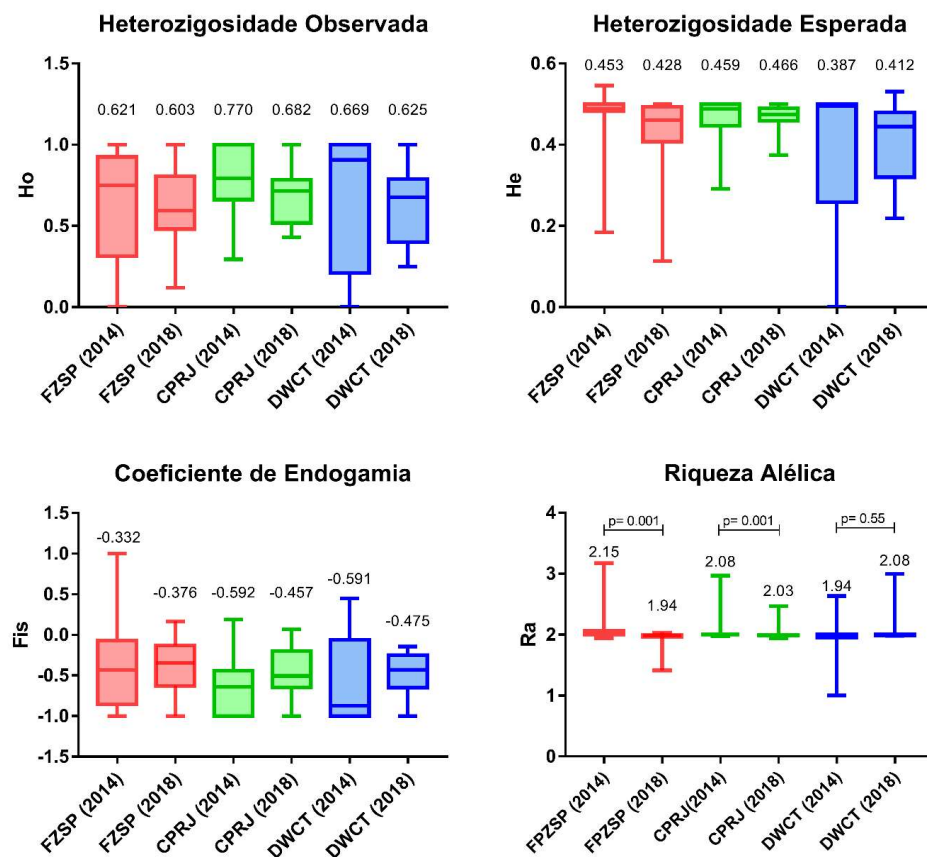


**Figura 11** - Heredograma dos micos leões pretos mantidos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, de acordo com os dados disponíveis no Studbook da espécie. Os indivíduos marcados com a cor azul foram transferidos para Durrell Conservation Trust como medida de manejo. A cor verde indica os indivíduos que vieram da natureza. As linhas inclinadas indica a relação de gêmeos entre os indivíduos.

### 4.3.2 Diversidade genética

Os dados de diversidade publicados por Ayala-Burbano (2017), para os grupos cativos de acordo com a versão do *Studbook* da espécie publicada em 2014, foram comparados com os dados da versão de 2018. Desta forma os valores de riqueza alélica, heterozigosidade esperada e coeficiente de endogamia foram avaliados para os grupos mantidos em cativeiro passados quatro anos.

A variação dos valores de riqueza alélica, coeficiente de endogamia e heterozigosidade esperada e observada, foram plotados em um gráfico para melhor visualização da distribuição desses valores por instituição (Figura 12). Nesta análise comparativa, os valores médios para os grupos *ex situ*, segundo o *Studbook* 2014 e a atual, evidenciaram que os estimadores de  $H_e$ ,  $H_o$  e  $F_{is}$  não mostraram diferenças significativas entre os dois períodos analisados em nenhum grupo cativo. No entanto, houve diferenças significativas para os valores de riqueza alélica na FPZSP e no CPRJ ( $p=0,01$ ) (Figura 12 e Tabela 5).



**Figura 12** - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela heterozigosidade esperada, riqueza alélica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia e, respectivamente da esquerda para direita, dos grupos *in situ* brasileiros e europeu nos anos de 2014, analisados por Ayala-Burbano et al. (2017) e analisados nesse estudo. FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust.

**Tabela 5** - Índices de diversidade genética dos grupos *in situ* brasileiros e europeu nos anos de 2014, analisados por Ayala-Burbano *et al.* (2017) e para os grupos atuais analisados nesse estudo. Asteriscos denotam um desvio significativo da hipótese nula ( $p < 0,05$ ).

	FPZSP		CPRJ		DWCT	
	2014	2018	2014	2018	2014	2018
<b>Heterozigosidade Observada</b>	0.621	0.603	0.770	0.682	0.669	0.625
<b>Heterozigosidade Esperada</b>	0.453	0.4428	0.459	0.466	0.387	0.412
<b>Coefficiente de Endogamia</b>	-0.322	-0.376	-0.592	-0.457	-0.591	-0.475
<b>Riqueza Alélica</b>	2.15*	1.94*	2.08*	2.03*	1.94	2.08

#### 4.4 Análise dos grupos *in situ*

##### 4.4.1 Diversidade genética

Parâmetros de diversidade genética foram estimados para dois fragmentos *ex situ*, Fazenda Santa Maria (FSM) e Guareí (G), através da determinação da riqueza alélica ( $R_a$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e de alelos privados; estes resultados estão mostrados na Tabela 6.

Não foram encontrados alelos nulos, alelos *dropout* e *stuttering* para nenhum grupo de vida livre analisado. O valor médio do conteúdo de informação polimórfica foi de 0,440, indicando que esse painel é razoavelmente informativo (BOTSTEIN *et al.*, 1980). Em relação ao número de alelos, a FSM possui o maior número de alelos,  $N=20$ , sendo que quatro desses alelos são exclusivos. Guareí possui 19 alelos, sendo que quatro desses são exclusivos.

A heterozigosidade média observada foi maior que a heterozigosidade média esperada, assim como o  $F_{is}$  foi negativo em ambos os fragmentos, demonstrando que há um excesso de heterozigotos nos indivíduos analisados.

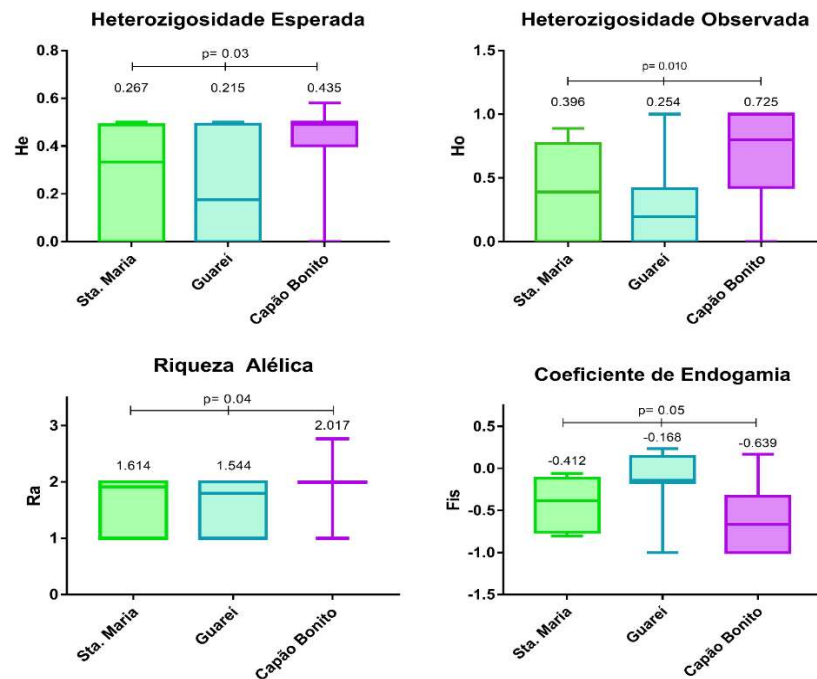
Quando comparamos os resultados obtidos para esses dois fragmentos com os dados publicados por Ayala-Burbano e colaboradores (2017), em que dois grupos pertencentes a Floresta Nacional de Capão Bonito (FNCB) foram analisados, esses resultados demonstram que há diferenças significativas para todos os estimadores considerados (Figura 13).

Tabela 6 - Diversidade genética dos grupos cativos da Fazenda Santa Maria e Guareí.

Locus	N	Na	Ra	Ho	He	$F_{is}$	HW	Alelos Privados
<b>Fazenda Santa Maria – FSM</b>								
Lchu1	9	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Lchu6	6	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Lchu7	9	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Lchu8	9	2.000	2.000	0.556	0.475	-0.169	0.61	-
Leon2	9	2.000	2.000	0.556	0.500	-0.111	0.74	-
Leon3	9	2.000	1.817	0.222	0.198	-0.125	0.71	312
Leon11	9	2.000	2.000	0.889	0.494	-0.800	0.02*	323
Leon15	9	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Leon21	8	2.000	2.000	0.750	0.469	-0.600	0.09	-
Leon30	9	2.000	2.000	0.778	0.475	-0.636	0.06	274/276
Leon31	9	2.000	1.556	0.111	0.105	-0.059	0.86	-
Leon35	9	2.000	2.000	0.889	0.494	-0.800	0.02*	-
<b>Média</b>		<b>1.667</b>	<b>1.614</b>	<b>0.396</b>	<b>0.267</b>	<b>-0.413</b>		
<b>Guareí</b>								
Lchu1	5	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Lchu6	7	3.000	2.000	0.571	0.490	-0.167	0.66	197/199
Lchu7	8	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Lchu8	8	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Leon2	7	2.000	1.714	0.143	0.133	-0.077	0.84	-
Leon3	6	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Leon11	8	3.000	2.000	0.375	0.492	0.238	0.50	305
Leon15	7	2.000	1.934	0.286	0.245	-0.167	0.66	-
Leon21	8	2.000	1.875	0.250	0.219	-0.143	0.69	-
Leon30	7	2.000	2.000	1.000	0.500	-1.000	0.01*	282
Leon31	7	1.000	1.000	0.000	0.000			-
Leon35	7	2.000	2.000	0.429	0.500	0.143	0.71	-
<b>Média</b>		<b>1.750</b>	<b>1.544</b>	<b>0.254</b>	<b>0.215</b>	<b>-0.167</b>		
<b>Floresta Nacional de Capão Bonito - FNCB</b>								
Lchu1	10	1.000	1.000	0.000	0.000			
Lchu6	10	2.000	2.000	1.000	0.500	-1.000	0.002*	193
Lchu7	10	2.000	2.000	1.000	0.500	-1.000	0.002*	346
Lchu8	10	2.000	1.957	0.400	0.320	-0.250	0.43	
Leon2	10	2.000	2.000	0.800	0.480	-0.667	0.04*	
Leon3	10	2.000	2.000	0.800	0.480	-0.667	0.04*	316/318
Leon11	10	2.000	2.000	1.000	0.500	-1.000	0.002*	314
Leon15	10	2.000	2.000	0.400	0.480	0.167	0.60	
Leon21	10	3.000	2.763	1.000	0.580	-0.724	0.02*	300
Leon30	10	2.000	2.000	1.000	0.500	-1.000	0.002*	286
Leon31	10	3.000	2.498	0.800	0.515	-0.553	0.22	338
Leon35	10	2.000	1.984	0.500	0.375	-0.333	0.29	
<b>Média</b>		<b>2.083</b>	<b>2.017</b>	<b>0.725</b>	<b>0.436</b>	<b>-0.639</b>		

\* Valores estatisticamente significativos. – Ausência de alelos exclusivos.

N: número de amostras genotipadas, Na: número de alelos, Ra: riqueza alélica, Ho: heterozigidade observada, He: heterozigidade esperada,  $F_{is}$ : coeficiente de endogamia HW: valores de p obtidos para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

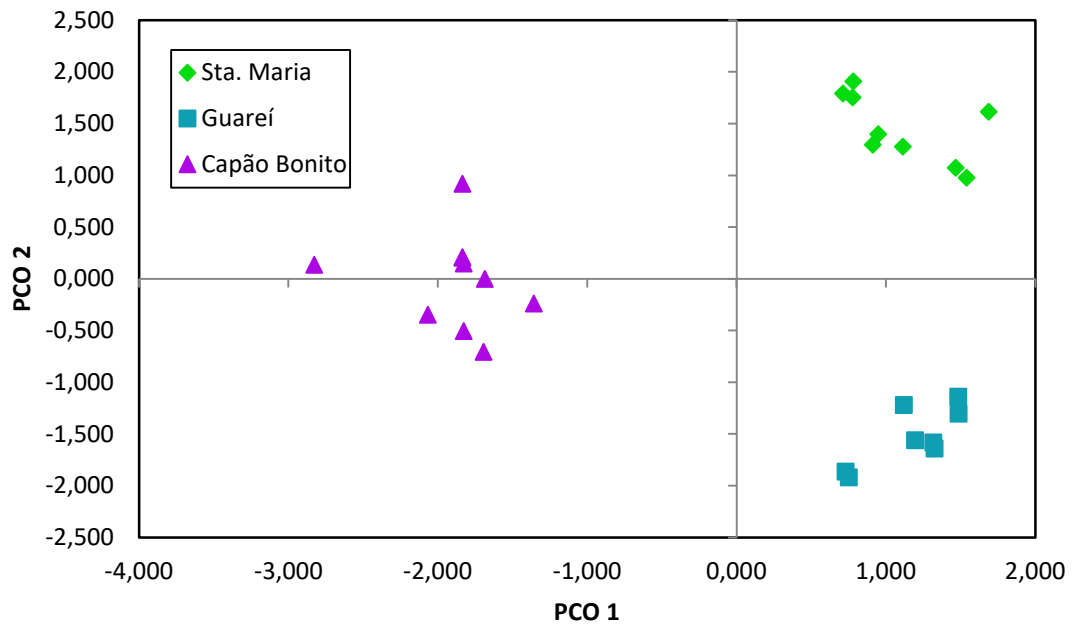


**Figura 13** - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela heterozigosidade esperada, riqueza alélica, heterozigosidade observada e coeficiente de endogamia. para grupos *in situ* Fazenda Santa Maria, Guareí e Floresta Nacional Capão Bonito.

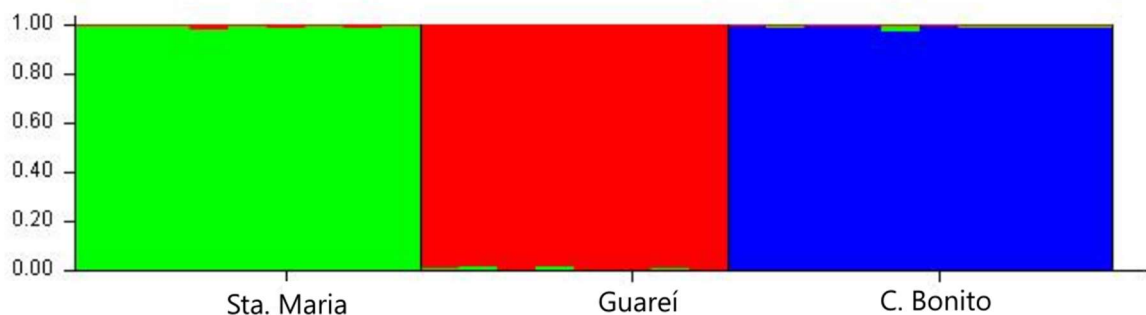
Os valores de  $F_{st}$  calculados para esses três fragmentos (Tabela 7) são maiores que 0,25, indicando que entre eles há uma forte diferenciação genética, considerando que valores entre 0 e 0,05 indicam uma baixa diferenciação genética; valores entre 0,05 e 0,15 uma diferenciação moderada; valores entre 0,15 e 0,25 uma grande diferenciação; e valores maiores que 0,25 indicam ampla diferenciação genética (HARTL; CLARK; CLARK, 1997; WRIGHT, 1965). Esses valores corroboram com a diferenciação evidenciada na análise de componentes principais (PCoA) (Figura 14). As análises de inferências bayesiana (Figura 15) demonstram um  $K=3$ , representado pelas três populações distintas, corroborando a ampla diferenciação genética encontrada nas outras análises.

**Tabela 7** - Comparativo dos valores de  $F_{st}$  encontrado nos grupos *ex situ* da Fazenda Santa Maria, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito, analisado por Ayala-Burbano *et al.* (2017).

Valor de $F_{st}$ par a par	Fazenda Santa Maria	Guareí
Guareí	0.4778	
Floresta Nacional de Capão Bonito	0.4317	0.4414



**Figura 14** - Análise de Coordenadas Principais mostrando a pontuação na primeira e na segunda coordenada principal com base na matriz de distância genética para o conjunto de dados genéticos obtidos para os grupos da Fazenda Santa Maria e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito, analisado por Ayala-Burbano *et al.* (2017).



**Figura 15** - Análise de estruturação (K= 3) com os grupos de vida livre da Fazenda Santa Maria (S. Maria) e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito (C. Bonito), analisado por Ayala-Burbano *et al.* (2017).

#### 4.4.2 Análises de parentesco

Devido ao baixo grau de diversidade genética e altas taxas de parentesco observadas nos grupos de vida livre, os dados de microssatélites foram combinados a dados mitocondriais considerando haplótipos da região Dloop gerados para esses animais em um estudo paralelo desenvolvido por Modena *et al.* (2020, in prep.) (Tabela 8).



**Tabela 8** – Identificação dos indivíduos das populações de vida livre

<b>Indivíduo</b>	<b>Localização</b>	<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Haplótipo</b>
SM1_08	Faz. Santa Maria	SM1	Fêmea	Adulto	H5
SM1_09	Faz. Santa Maria	SM1	Macho	Adulto	H5
SM2_01	Faz. Santa Maria	SM2	Macho	Adulto	H5
SM2_02	Faz. Santa Maria	SM2	Fêmea	Adulto	H5
SM2_03	Faz. Santa Maria	SM2	Fêmea	Adulto	H5
SM2_04	Faz. Santa Maria	SM2	Macho	Infante	H5
SM2_05	Faz. Santa Maria	SM2	Fêmea	Adulto	H5
SM2_06	Faz. Santa Maria	SM2	Fêmea	Adulto	H3
SM2_07	Faz. Santa Maria	SM2	Macho	Adulto	H5
GB1_01	Guareí - Ponte	GB1	Macho	Adulto	H3
GC1_03	Guareí - Camargo	GC1	Fêmea	Adulto	H3
GC1_04	Guareí - Camargo	GC1	Fêmea	Adulto	H3
GC1_05	Guareí - Camargo	GC1	Macho	Adulto	H3
GC1_06	Guareí - Camargo	GC1	Macho	Adulto	H3
GC1_07	Guareí - Camargo	GC1	Macho	Adulto	H3
GC1_08	Guareí - Camargo	GC1	Fêmea	Juvenil	H3
GC2_09	Guareí - Camargo	GC2	Macho	Adulto	H3
GC1_10	Guareí - Camargo	GC1		Infante	H3
CB1_01	F. N. Capão Bonito	CB1	Macho	Adulto	H2
CB1_02	F. N. Capão Bonito	CB1	Macho	Adulto	H3
CB1_03	F. N. Capão Bonito	CB1	Macho	Adulto	H7
CB1_04	F. N. Capão Bonito	CB1	Macho	Infante	H2
CB1_05	F. N. Capão Bonito	CB1	Fêmea	Infante	H7
CB2_01	F. N. Capão Bonito	CB2	Fêmea	Adulto	H2
CB2_02	F. N. Capão Bonito	CB2	Fêmea	Adulto	H2
CB2_03	F. N. Capão Bonito	CB2	Macho	Adulto	H2
CB2_04	F. N. Capão Bonito	CB2	Macho	Adulto	H2
CB2_05	F. N. Capão Bonito	CB2	Macho	Adulto	H2

Os resultados das análises para o parentesco utilizando os dados microssatélites para cada população são mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Resultado da análise de parentesco para os animais das populações *in situ*

<b>Fazenda Santa Maria</b>								
<b>Prole</b>	<b>Mãe</b>	<b>LOD do</b>	<b>Confiança</b>	<b>Pai</b>	<b>LOD do</b>	<b>Confiança</b>	<b>LOD do</b>	<b>Confiança</b>
	<b>Atribuída</b>	<b>par</b>	<b>do Par</b>	<b>Atribuído</b>	<b>par</b>	<b>do Par</b>	<b>Trio</b>	<b>do Trio</b>
SM2_01	SM2_02	0.450	-	SM2_07	-2.88	-	-1.59	-
SM2_02	SM2_03	-11.9.	-	SM2_01	0.450	-	-12.1.	-
SM2_03	SM2_02	-11.9.	-	SM2_07	8.25	+	-5.39	-
SM2_05	SM2_02	4.72	-	SM2_01	-1.55	-	2.96	-
SM2_04	SM2_02	5.78	+	SM2_01	-0.495	-	4.78	-
SM2_06	SM2_02	0.976	-	SM2_01	2.46	-	4.34	-
SM2_07	SM2_03	8.25	+	SM2_01	-2.88	-	8.63	-
SM1_08	SM2_02	0.0309	-	SM2_01	1.51	-	2.55	-
SM1_09	SM2_02	-16.0.	-	SM2_01	2.12	-	-15.0.	-
<b>Guareí</b>								
<b>Prole</b>	<b>Mãe</b>	<b>LOD do</b>	<b>Confiança</b>	<b>Pai</b>	<b>LOD do</b>	<b>Confiança</b>	<b>LOD do</b>	<b>Confiança</b>
	<b>Atribuída</b>	<b>Par</b>	<b>do Par</b>	<b>Atribuída</b>	<b>Par</b>	<b>do Par</b>	<b>Trio</b>	<b>do Trio</b>
GB1_01	GC1_04	-8.54	-	GC1_07	-2.72	-	-7.28	-
GC1_05	GC1_04	-8.72	-	GC1_07	11.6.	+	6.75	-
GC1_06	GC1_04	-7.55	-	GC1_07	-9.71	-	-23.5.	-
GC1_07	GC1_04	-8.72	-	GC1_06	-9.71	-	-26.2.	-
GC1_08	GC1_04	3.67	-	GC1_07	-3.19	-	1.20	-
GC2_09	GC1_04	-17.9.	-				-35.8.	-
GC1_10	GC1_04	-3.17	-	GC2_09	9.50	+	6.33	-

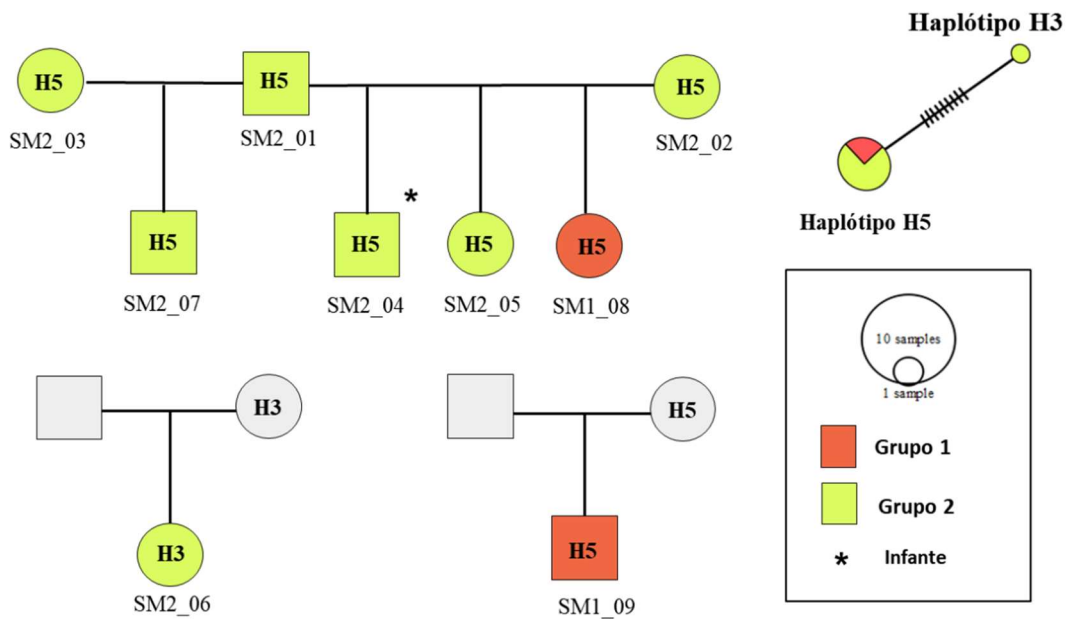
Continuação Tabela 9

Floresta Nacional de Capão Bonito								
Prole	Mãe Atribuída	LOD do par	Confiança do Par	Pai Atribuído	LOD do Par	Confiança do Par	LOD do Trio	Confiança do Trio
CB1_01	°			CB1_03	-3.75	+		
CB1_02	°			CB1_03	-3.75	+		
CB1_03	°				-3.75			
CB1_03	°				-3.75			
CB1_04	°			CB1_03	3.35	+		
CB1_05	°			CB1_03	-2.80	+		
CB2_01	CB2_02	-5.30	+	CB2_05	4.64	+	0.586	-
CB2_02	CB2_01	-5.30	+	CB2_04	-2.83	+	0.845	-
CB2_03	CB2_02	2.52	+	CB2_04	1.24	+	8.08	-
CB2_04	CB2_02	-2.83	+	CB2_05	-10.4.	+	-7.24	-
CB2_05	CB2_02	4.64	+	CB2_04	-10.4.	+	4.14	-

**Pai/mãe atribuído:** parental mais provável, atribuído pelo programa. **LOD do Par:** logaritmo natural da razão da verossimilhança das relações progenitor-progênie entre o pai/mãe atribuído e o filho. Esses valores são expressos em notação científica  $10^{13}$ . **N.C:** Nível de confiança da atribuição usando o 95%(\*) e 80% (+). Os casos indicados com ° não foram resolvidos devido à falta de genótipos materno em nossa amostragem.

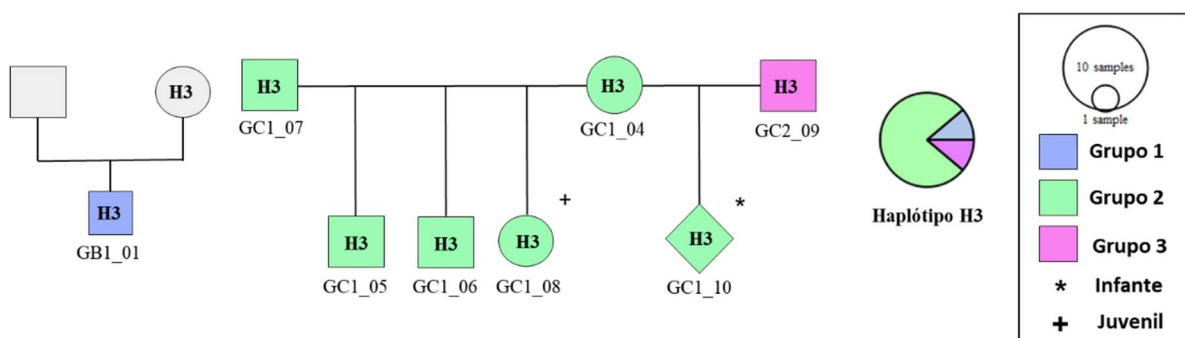
A partir da interpretação integrada, dos dados de haplótipos mitocondriais, genótipos de microssatélites e também informações de sexo e idade dos animais, foi possível estabelecer as potenciais relações de parentesco, as quais estão ilustradas nas Figuras 16, 17 e 18.

Para Santa Maria (Figura 16), foi sugerido o acasalamento de duas fêmeas adultas com o mesmo macho (SM2\_01), resultando nos prole SM2\_04, SM2\_05 e SM1\_08, com a fêmea SM2\_02; e em um único filho (SM2\_07), com a fêmea SM2\_03. Apesar das atribuições de parentesco evidenciadas pelos marcadores microssatélites terem alocado a fêmea SM2\_06, como filha do casal SM2\_01 e SM2\_02, os dados mitocondriais demonstraram que o haplótipo encontrado é diferente do haplótipo da possível mãe; desta forma, é mais provável que essa fêmea seja um migrante (provavelmente do grupo 1 ou de outro grupo não amostrado), e que seus pais não foram amostrados. O macho SM1\_09 também foi atribuído como filho do casal SM2\_01 e SM2\_02, no entanto, o valor de LOD para o trio foi negativo ( $-15 \times 10^{13}$ ); sendo assim, não podemos excluir a possibilidade de que esse indivíduo seja filho também de um casal não amostrado, e que o fato dele ser capturado junto com o SM1\_08, seja indício da formação de um novo grupo familiar.



**Figura 16** – Genealogia dos grupos da Fazenda Santa Maria, proposta a partir das interpretações dos resultados da análise de paternidade, dos haplótipos e também das informações de sexo e idade dos animais.

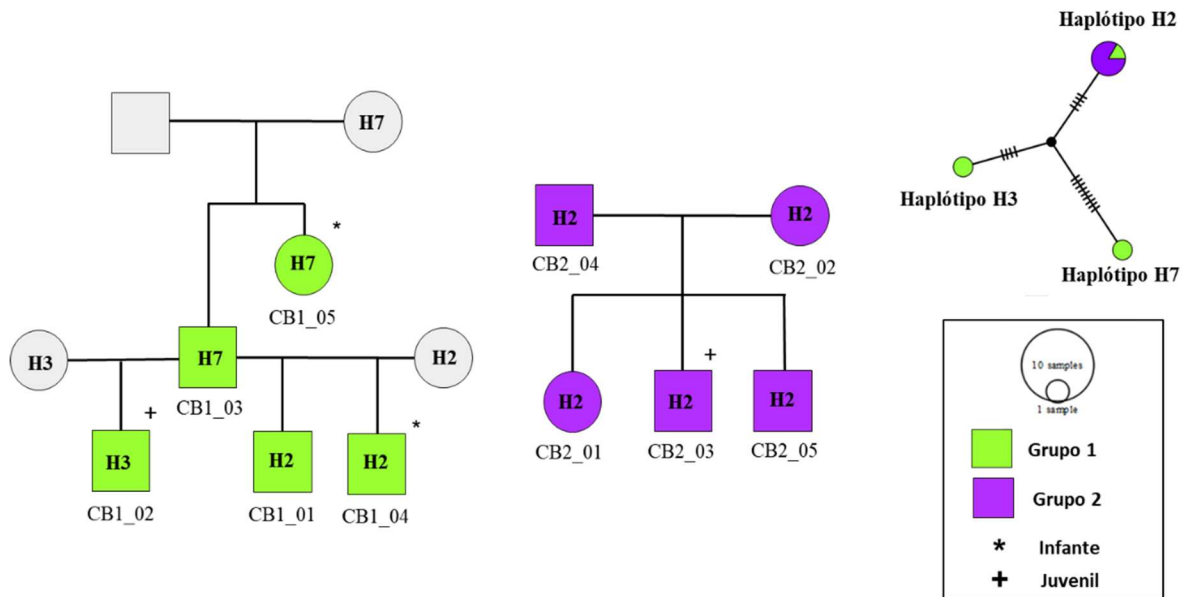
Em Guareí (Figura 17), observamos o provável acasalamento de dois machos (GC1\_07 e GC2\_09) com uma mesma fêmea (GC1\_04), resultando na prole GC1\_05, GC1\_06 e GC1\_08 com o macho GC1\_07, e em um único filho (GC1\_10) com o macho GC2\_09. No entanto, o macho GC1\_06 apresentou um valor negativo de LOD do trio ( $-23 \times 10^{13}$ ), sendo assim, não podemos excluir a possibilidade de que ele seja um migrante e seus pais não foram amostrados. O mesmo acontece com o macho GC1\_01, que apresenta um LOD do trio de  $-7,28 \times 10^{13}$ .



**Figura 17** - Genealogia dos grupos de Guareí, proposta a partir das interpretações dos resultados da análise de paternidade, dos haplótipos e também das informações de sexo e idade dos animais.

No grupo 1 de Capão Bonito (Figura 18), provavelmente há o acasalamento de duas fêmeas com o macho CB1\_03, visto que a prole apresenta dois haplótipos. As análises de parentesco atribuem a fêmea CB1\_05 como filha do macho CB1\_03, no entanto, devido ao haplótipo de ambos serem o mesmo, podemos considerar a hipótese de que esses indivíduos

sejam irmãos completos e essa atribuição deve ao alto grau de parentesco entre eles. No segundo grupo (Figura 18), provavelmente o casal CB2\_04 e CB2\_02 gerou toda a prole. O indivíduo CB2\_01 foi atribuído como filho do CB2\_05 com a fêmea CB2\_04, no entanto o valor de LOD é menor que as outras atribuições, assim essa atribuição pode também ser devido ao alto grau de parentesco entre esses dois indivíduos.

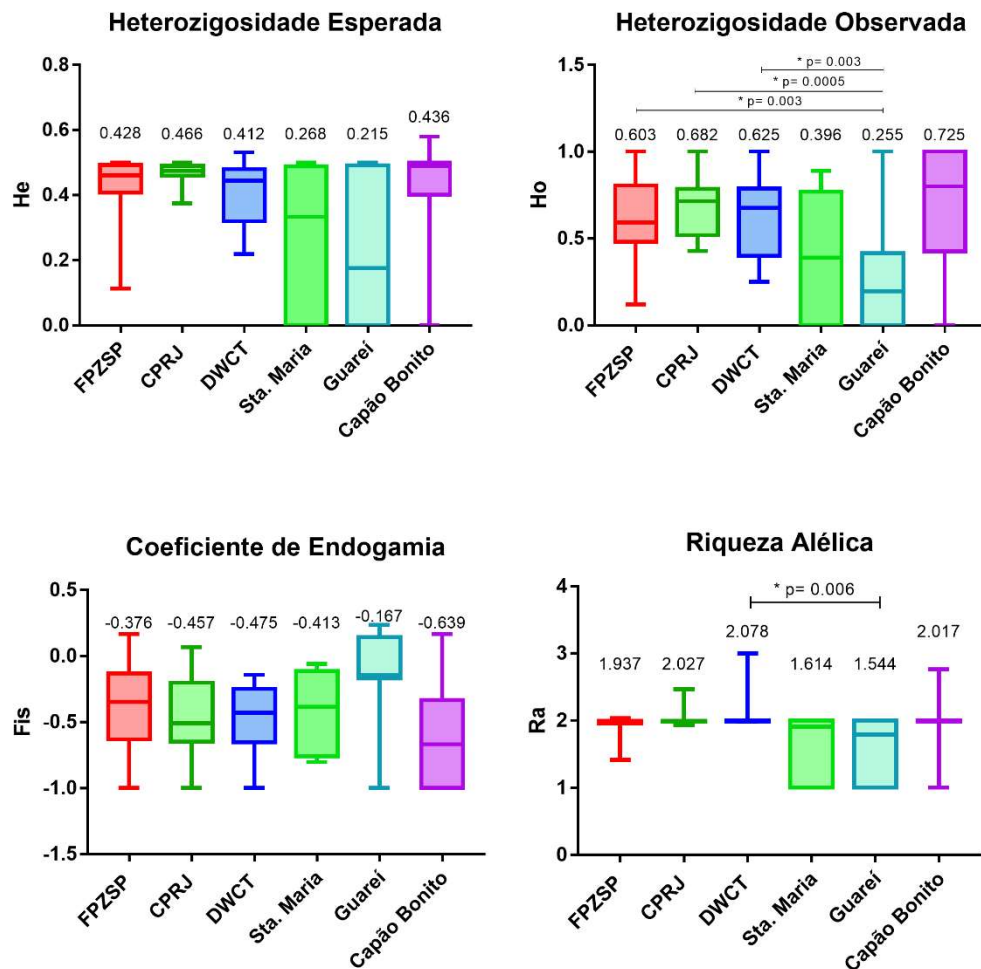


**Figura 18** - Genealogia dos grupos da Floresta Nacional de Capão Bonito, proposta a partir das interpretações dos resultados da análise de paternidade, dos haplótipos e também das informações de sexo e idade dos animais.

#### 4.5 Análise integrada *in situ* e *ex situ*

Foram realizadas análises comparativas entre os grupos *ex situ* e *in situ* analisados a fim de gerar informações úteis para o manejo integrado.

Ao compararmos os parâmetros de diversidade genética, observamos que os valores dos estimadores são semelhantes entre grupo de cativo e vida livre, mesmo quando comparamos com a Fazenda Santa Maria que apresenta a diversidade genética mais baixa. Entretanto, quando consideramos os valores de heterozigosidade observada e riqueza alélica entre Guareí e DWCT, observamos diferenças significativas (Figura 19).



**Figura 19** - Gráficos comparativos com os valores de diversidade genética, medidos pela heterozigidade esperada, riqueza alélica, heterozigidade observada e coeficiente de endogamia e, respectivamente da esquerda para direita, dos grupos *ex situ* e *in situ*. FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust.

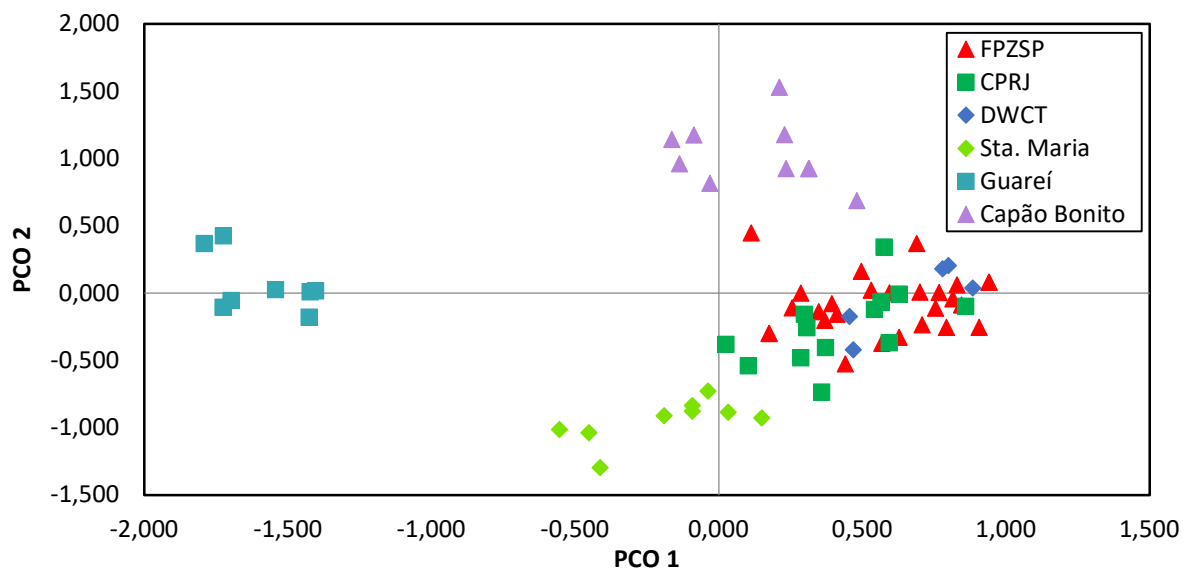
Os valores de  $F_{st}$  calculados para as populações *in situ* foram altos em relação aos dos grupos cativos (Tabela 10), demonstrando grande ou ampla diferenciação genética (HARTL; CLARK; CLARK, 1997; WRIGHT, 1965). No entanto, percebemos que os valores entre a Floresta Nacional de Capão Bonito e a Fazenda Santa Maria e os grupos de cativeiro são menores comparados aos valores encontrados entre o fragmento Guareí e os grupos cativos.

**Tabela 10** - Comparativo dos valores de  $F_{st}$  encontrado nos grupos *ex situ* e *in situ*.

Valores de $F_{st}$ par a par	FPZSP	CPRJ	DWCT	Sta. Maria	Guareí
<b>CPRJ</b>	0.0191				
<b>DWCT</b>	-0.0024	0.0163			
<b>Sta. Maria</b>	0.2625	0.2098	0.3308		
<b>Guareí</b>	0.3903	0.3643	0.4710	0.4778	
<b>C. Bonito</b>	0.2510	0.2499	0.2597	0.4317	0.4414

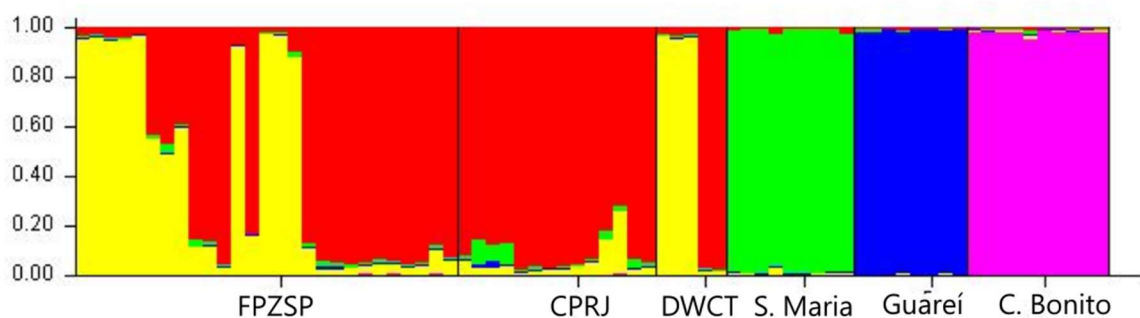
**FPZSP:** Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **CPRJ:** Centro de Primatologia do Rio de Janeiro. **DWCT:** Durrell Wildlife Conservation Trust. **Sta. Maria:** Fazenda Santa Maria. **Guareí:** Fragmento Guareí e **C. Bonito:** Floresta Nacional Capão Bonito.

Esses valores são corroborados com os resultados encontrados na análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 20), em que os grupos de Sta. Maria e FNCP estão mais próximos dos grupos cativos, enquanto Guareí está mais distante.



**Figura 20** - Análise de Coordenadas Principais mostrando a pontuação na primeira e na segunda coordenada principal com base na matriz de distância genética para o conjunto de dados genéticos obtidos para os grupos cativos da Fundação Zoológico de São Paulo (FPZSP), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Durrell Conservation Trust (DWCT) e dos grupos de vida livre da Fazenda Santa Maria e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito, analisado por Ayala-Burbano et al. (2017).

As análises no Structure (Figura 21) demonstraram um  $k = 5$ , evidenciando cinco clusters genéticos para a amostragem *ex situ* e *in situ*. Foram observados três clusters referentes a cada uma das populações de vida livre e outros dois reunindo os três grupos de cativeiro. Essa subestruturação detectada em cativeiro quando comparada aos grupos *in situ* pode ser devido à existência de animais de vida livre em cativeiro, com origens distintas, mas principalmente da região de Morro do Diabo, bem como devido à contribuição desigual dos parentais para formação das proles, resultando em grupos familiares mais distintos ou similares entre as instituições



**Figura 21** - Análise de estruturação ( $K=5$ ) com os grupos cativos Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT) e os grupos de vida livre da Fazenda Santa Maria (S. Maria) e Guareí, analisados nesse estudo e da Floresta Nacional de Capão Bonito (C. Bonito), analisado por Ayala-Burbano *et al.* (2017).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Análises dos grupos *ex situ*

Os dados gerados no presente trabalho demonstram pelas análises do *Studbook* da espécie, que a FPZSP possui três famílias, sendo que dois casais reprodutores foram formados por um descendente de cativeiro e um indivíduo introduzido da natureza, portanto, nessas duas famílias o casal reprodutor não possui nenhum tipo de relacionamento. Já no CPRJ há duas famílias, e ambos os casais reprodutores descendentes de indivíduos mantidos em cativeiro, sendo que um desses casais possui relação de irmãos completos. É sabido que a formação de grupos familiares com indivíduos com relação de parentesco muito alta, e também com reprodução desigual dos indivíduos, propicia o aumento na endogamia, com consequente perda de diversidade genética (LACY, 1989). Nos grupos de cativeiro aqui analisados, no entanto, foi observado um valor de coeficiente de endogamia negativo, quando calculado pelos marcadores moleculares, e também um excesso de heterozigotos, evidenciado pelos valores de  $H_o$  maiores

que os de He, em todos os grupos analisados. Isso demonstra que embora os dados de pedigree estejam evidenciando um aumento da endogamia, o manejo está sendo eficiente em evitar o aumento da homozigosidade, que poderia conduzir a espécie à perda de fitness e depressão endogâmica, devido a exposição à alelos recessivos prejudiciais (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Apesar disso, dada a pouca disponibilidade de animais não-relacionados para serem usados como reprodutores, ainda é observado níveis de endogamia de heredograma altos, como consequência do grau de relacionamento desses indivíduos. Portanto, estratégias para introdução de novos animais de vida livre em cativeiro, devem ser priorizadas para incremento de indivíduos menos relacionados.

Muitos programas de conservação realizam os manejos utilizando informações de *pedigree*, no entanto, ao combinar estes dados com os dados de marcadores moleculares podemos otimizar os programas de conservação, tornando-os mais eficazes (TORO et al., 1999; WANG, 2004). Para o mico leão preto, estudos previamente realizados propõem que essa integração entre dados de *pedigree* e de marcadores moleculares pode auxiliar as tomadas de decisões no manejo da espécie em cativeiro (AYALA-BURBANO et al., 2020). Desta forma, além de conhecer a estrutura dos grupos familiares em cativeiro, avaliar o comportamento dos níveis de variabilidade genética mensurados por marcadores moleculares é relevante para o manejo eficiente.

Os valores de heterozigosidade esperada estimados para os grupos de cativeiro atuais foram baixos, porém, similares aos descritos na literatura para *L. chrysopygus* (AYALA et al., 2017; 2020) e outras espécies do gênero. Em estudos com o mico leão dourado foram encontrados valores de heterozigosidade que variaram entre 0,42 à 0,66, utilizando diferentes números de locos microssatélites (GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER, 2001; MORAES et al., 2018; PEREZ-SWEENEY et al., 2005). Para o mico leão de cara dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) o valor de heterozigosidade encontrado foi de 0,59, utilizando nove locos (GALBUSERA; GILLEMOT, 2008) e para o mico leão de cara preta (*Leontopithecus caissara*) os valores de heterozigosidade encontrados variaram de 0,42 e 0,48 utilizando nove locos (MARTINS et al., 2011; MARTINS; GALETTI JUNIOR, 2010).

Os valores de diversidade genética estimados pelas análises moleculares para heterozigosidade esperada e observada e para os coeficientes de endogamia foram semelhantes em todas as três instituições que mantêm a espécie sob cuidado humano. No entanto, a FPZSP apresentou valores de riqueza alélica menores aos encontrados em DWCT. Por outro lado, os valores de  $F_{st}$  encontrados par a par foram menores que 0,15, demonstrando que não há diferenciação genética significativa entre os grupos cativos analisados (FRANKHAM;



BALLOU; BRISCOE, 2008). Esses valores corroboram as análises de estruturação bayesiana que demonstraram um agrupamento dos grupos, evidenciando uma tendência a possível existência de uma metapopulação cativa.

## 5.2 Monitoramento genético *ex situ*

Os cativeiros têm a função de servir como uma reserva genética e demográfica das espécies (RALLS; BALLOU, 2004). Para o mico leão preto, estima-se que o tamanho populacional para manter 95% da variabilidade genética, se os grupos cativos forem manejados como subpopulações de uma metapopulação, é de aproximadamente 150 a 200 animais (VALLADARES-PADUA *et al.*, 2002). Entretanto, o tamanho atual da população da espécie em cativeiro é de 55 indivíduos. Assim, monitorar a variabilidade genética dos grupos de cativeiro é extremamente importante para verificar se o manejo realizado está sendo efetivo na manutenção dos níveis de variabilidade genética ao longo das gerações. Além disso, a análise da variabilidade genética via marcadores moleculares pode auxiliar a entender processos relacionados à diferenciação e estruturação das populações, auxiliando não somente o manejo *ex situ*, mas também o manejo integrado. (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017; 2020).

Segundo a análise comparativa da versão anterior do *Studbook* da espécie (WORMELL, 2014) com a mais atual (WORMELL, dados ainda não publicados), o manejo dos grupos de cativeiro do MLP, entre os anos de 2014 e 2018, demonstrou que houve um pequeno aumento no tamanho populacional, devido ao nascimento, introdução e transferência de alguns animais na FPZSP, que passou de 16 indivíduos em 2014 para 27 em 2018. Já no CPRJ, o número de indivíduos mantidos em cativeiro diminuiu, passando de 17 para 14 animais, devido à translocação e morte de alguns animais. Essa dinâmica populacional devido a introdução, translocação, nascimento e morte de indivíduos pode ocasionar modificações na estrutura genética observada nos diferentes grupos pela entrada e/ou saída de alelos. No CPRJ, por exemplo, foi observado a perda de três alelos ( $N_{a2014} = 29$ ;  $N_{a2018} = 26$ ), assim como no FPZSP, onde houve perda de quatro alelos ( $N_{a2014} = 28$ ;  $N_{a2018} = 24$ ), o que influencia diretamente na diminuição significativa da riqueza alélica durante o período analisado, visto que esse parâmetro é sensível a perda de alelos.

Em relação aos alelos raros, não foram encontrados alelos raros na FPZSP, visto que esses agora são compartilhados com o grupo de DWCT, devido ao manejo de alguns indivíduos. No grupo do CPRJ, notamos que, atualmente, o alelo 236 (Lchu08) é exclusivo deste grupo, embora, no estudo anterior este também tenha sido encontrado em animais da FPZSP. O alelo

224 (Lchu08) que havia sido descrito como exclusivo para o CPRJ, atualmente, está presente no CPRJ e em DWCT, também devido ao recente manejo.

A análise do *pedigree* da espécie demonstra que já houve a formação de nove gerações em cativeiro, sendo a primeira geração (F0) representada pelos animais fundadores. Os MLP vivos atualmente estão representados pelas últimas cinco gerações (G5, G6, G7, G8 e G9), sendo que a maioria dos animais vivos está representada nas gerações G7 (17 animais) e G8 (12 animais). A última geração (G9) foi formada em 2016, com o nascimento de quatro animais, filhos de um mesmo casal (425 e 481). Pudemos observar também que as últimas gerações apresentaram um declínio populacional, e conseqüentemente o número de reprodutores também sofreu uma redução, aumentando assim a endogamia por geração.

Quando comparamos os valores de diversidade genética para as populações cativas do MLP, verificamos que a heterozigosidade esperada nos grupos de cativeiro atuais é semelhante ( $p > 0,05$ ) aos valores encontrados nas análises anteriores realizadas por Ayala-Burbano *et al.* (2017). Este dado demonstra que o manejo da espécie está conseguindo evitar o aumento da homozigosidade em cativeiro e a conseqüente exposição de alelos recessivos prejudiciais, fato este que conduziria à acentuada perda de fitness pela depressão por endogamia (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002).

Em relação ao coeficiente de endogamia, os valores de  $F_{is}$  foram negativos evidenciando um excesso de heterozigotos, e não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) com aqueles estimados anteriormente (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017), demonstrando mais uma vez que o manejo está sendo eficiente em evitar a homozigose ao longo das gerações.

### 5.3 Análises dos grupos *in situ*

As amostras de vida livre analisadas nesse trabalho pertencem a duas populações consideradas pequenas devido ao número de indivíduos e tamanho da área. A Fazenda Santa Maria possui uma estimativa populacional de 18 animais habitando uma área de 515 ha, composta por um fragmento de floresta medianamente alterado com efeito de borda e sem estradas. Esse fragmento está localizado na região do Pontal do Paranapanema - SP, próximo ao Parque Estadual do Morro do Diabo, onde atualmente se encontra a maior população de mico leão preto na natureza. Por sua vez, o fragmento Guareí Camargo possui um menor tamanho populacional, contando com 15 animais em 105 hectares. Este fragmento está conectado a Estação Ecológica de Angatuba, e é um fragmento muito alterado, com mata ciliar, e forte efeito de borda com presença de gado e estradas (CULOT, L. comunicação pessoal). Os

dados gerados para estas duas populações foram comparados com os dados genéticos de dois grupos da Floresta Nacional de Capão Bonito, localizada na região de Buri – SP, que possui uma estimativa populacional de 35 indivíduos, em uma área com 4.344 hectares. Essa área é caracterizada por ser um fragmento alterado, ocupado por plantações de pinheiro e araucárias, e também pela presença de estradas (CALDANO; MONTICELLI; GALETTI, 2016).

As análises de diversidade genética realizadas para os animais de vida livre mostraram que os grupos da Fazenda Santa Maria e Guareí possuem valores de  $H_e$  e  $H_o$  similares entre si ( $p > 0,05$ ), porém, significativamente menores aos encontrados nos grupos da Floresta Nacional de Capão Bonito ( $p_{H_e} = 0,03$ ,  $p_{H_o} = 0,01$ ). Os valores de riqueza alélica também não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre Fazenda Santa Maria e Guareí, porém foram significativamente menores do que os valores encontrados para Capão Bonito. Quanto ao número de alelos, em Capão Bonito foi encontrado o maior número de alelos ( $N_{a_{FNCP}} = 25$ ;  $N_{a_{FSTM}} = 20$  e  $N_{a_{Guareí}} = 19$ ).

Segundo Ayala-Burbano *et al.* (2017), a baixa diversidade genética observada nas populações de MLPs na natureza pode ser devido à eventos históricos de gargalos populacionais ocasionados principalmente por fatores antropogênicos, como caça, coleta, e desmatamento, fatores estes que podem afetar a diversidade e estrutura genética das populações (COIMBRA-FILHO, 1996; CUNNIFF, 1996; DA FONSECA, 1985; POPE, 1996). Além disso, esses animais vivem em pequenos grupos familiares formados por três a seis indivíduos e sua reprodução tem sido normalmente associada a uma única fêmea e ocasionalmente à duas, com um único macho reprodutor. Assim, a baixa diversidade genética aqui observada parece ser uma característica intrínseca da espécie, compartilhada no gênero e em outros calitriquídeos (FAULKES; ARRUDA; MONTEIRO DA CRUZ, 2003; LIMA *et al.*, 2003).

O coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) estimado para ambos os grupos de vida livre apresentou valores negativos, indicando excesso de heterozigotos ( $p > 0,05$ ) nas populações. Este resultado foi semelhante ao encontrado em Capão Bonito, sugerindo que esteja acontecendo um possível comportamento de fuga da endogamia, em que os animais tendem a se acasalar com outros menos aparentados na natureza, evitando assim a depressão endogâmica. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para confirmar se de fato este comportamento se manifesta na espécie.

Os valores de  $F_{st}$  encontrados foram altos e evidenciam uma ampla diferenciação genética entre os três fragmentos analisados. As análises de PCoA corroboram essa forte estruturação, demonstrando clara diferença genética entre as populações analisadas. Estes resultados são importantes para avaliar como está o padrão de distribuição da diversidade

genética da espécie na natureza, e conseqüentemente para auxiliar políticas conservacionistas de manejo, visto que, o plano de manejo da espécie visa conectar fragmentos isolados na região do Pontal do Paranapanema, SP através da implementação de corredores ecológicos e também da movimentação de grupos de áreas maiores, como o Parque Estadual Morro do Diabo, para fragmentos menores (IPÊ, 2019). Portanto, conhecer a estrutura e diversidade genética das populações de vida livre poderá ser importante para auxiliar na tomada de decisões de manejo da espécie.

Quanto as análises de parentesco, foram encontrados grupos formados por 5 a 8 animais, sendo estes compostos por fêmeas e machos adultos, com a presença de juvenis e também filhotes, dados similares aos já descritos na literatura (BAKER; BALES; DIETZ, 2002; CARVALHO; CARVALHO, 1989). Nos micos-leões e em outras espécies da família Callitrichidae, têm sido descritos sistemas de acasalamento flexíveis, sendo encontrados relações de monogamia, poliandria e poligamia em saguis, micos e micos-leões (BAKER; BALES; DIETZ, 2002; DIGBY; BARRETO, 1993; GOLDIZEN, 1987). No gênero *Leontopithecus* já foram relatados casos de poliandria e poligamia em grupos de *L. rosalia* e *L. chrysomelas* (BAKER; BALES; DIETZ, 2002). Nas análises de parentesco aqui realizadas evidenciamos duas prováveis relações de poliandria, na FSTM e no grupo 1 de Capão Bonito, mesmo que nesse último, as fêmeas reprodutoras não tenham sido amostradas. Evidências também de um possível caso de poliginia podem ser atribuídas à população de Guareí, no entanto, um dos machos reprodutores foi capturado sozinho, o que pode sugerir a expulsão deste do grupo familiar. Os dados de relacionamento na FSM sugerem também existência de dispersão (uma imigração e uma emigração) de fêmeas, indicando que a dispersão na espécie de fato não é restrita apenas aos machos. Casos de dispersão de ambos os sexos já foram reportados para o gênero, incluindo as espécies *L. chrysopygus*, *L. rosalia* e *L. caissara*, sendo que a emigração tende a acontecer na idade jovem adulta e que os novos grupos são formados próximo ao grupo natal (BAKER; BALES; DIETZ, 2002; CARVALHO; CARVALHO, 1989; NASCIMENTO; NALI; DA FONSECA, 2014). Nossos dados corroboram esses achados e podem auxiliar a compreender melhor a movimentação desses animais e futuramente a avaliar a dispersão efetiva, com contribuição na reprodução.

#### 5.4 Análises integradas *in situ* e *ex situ*

A adoção de estratégias de conservação que integrem os processos de manejo *in situ* e *ex situ* em uma única abordagem tem sido cada vez mais discutida na última década (SCHWARTZ et al., 2017; AYALA et al 2020). Neste contexto, realizar análises comparativas entre as populações de vida livre e de cativeiro, visando avaliar como está distribuída a diversidade genética da espécie, pode ser relevante para assim auxiliar na tomada de decisões para o manejo integrado, e ações que visem a translocação ou reintrodução de animais, bem como a definição de áreas prioritárias para conservação.

No presente trabalho, os dados genéticos demonstraram que há diferenciação entre as populações de vida livre e destas com as de cativeiro, sendo que cada fragmento de vida livre foi alocado em uma população distinta das de cativeiro. A análise de PCoA e os valores de  $F_{st}$  demonstraram também que, os grupos *ex situ* são mais próximos geneticamente dos grupos da FNCB e da FSM. Essa maior relação genética pode ser devido ao fato de que uma fêmea reprodutora atual do cativeiro foi resgatada na região de Buri – SP, próxima à Floresta Nacional de Capão Bonito, e também que os fundadores do cativeiro brasileiro são animais capturados no Parque Estadual do Morro do Diabo, que está localizado próximo à Fazenda Santa Maria (WORMELL, 2014). Esses dois fatos, podem explicar a menor distância genética observada entre esses dois fragmentos e os grupos cativos, comparado ao fragmento de Guareí.

Em relação aos parâmetros de diversidade genética estimados, observamos que a heterozigosidade esperada e os coeficientes de endogamia não demonstraram diferenças significativas entre os grupos de cativeiro e vida livre. No entanto, as análises par a par demonstraram diferenças significativas de riqueza alélica, entre DWCT e Guareí, e também de heterozigosidade observada entre Guareí e os três grupos cativos analisados.

## 6 CONCLUSÃO

O nosso estudo permitiu alcançar os objetivos de trabalho propostos e gerar as seguintes conclusões:

- Utilizando a metodologia proposta nesse trabalho foi possível analisar a diversidade genética dos grupos de cativo, bem como dos grupos de vida livre, possibilitando a comparação dos dados gerados, com os disponíveis na literatura;
- Ao compararmos os dados de diversidade genética produzidos aqui para os grupos *ex situ* atuais, com os dados produzidos para os grupos cativos de 2014, foi possível verificar que houve uma diminuição significativa da riqueza alélica nos grupos da FPZSP e CPRJ, enquanto os outros parâmetros permanecem similares;
- As análises de estruturação genética baseadas nas frequências alélicas demonstraram a existência de uma metapopulação cativa;
- Os grupos *in situ* apresentam diferenças significativas na diversidade genética, no entanto o coeficiente de endogamia foi similar entre os três fragmentos analisados, e se apresenta negativo em todos eles, demonstrando o excesso de heterozigoto e provavelmente evidencia um efeito de comportamento de fuga da endogamia na natureza;
- As análises de estruturação genética baseada nas frequências alélicas das três populações de vida livre analisadas neste estudo evidenciaram forte diferenciação genética entre estas;
- O painel de microssatélites, combinado a dados mitocondriais, se mostrou eficiente para propor relações de parentesco nos grupos de vida livre;
- As análises de parentesco evidenciadas permitiram sugerir uma provável existência de poliandria e poliginia nos grupos de vida livre analisados, bem como a dispersão (por imigração e emigração) de fêmeas e a formação de novo grupo social;
- Alguns parâmetros de diversidade genética como heterozigosidade esperada e coeficiente de endogamia dentro e entre grupos de cativo são similares aos observados dentro e entre grupos de vida livre, sendo que os níveis de heterozigosidade da espécie são baixos, devido, provavelmente, à história de vida da espécie *in situ*, e ao histórico de fundação e manutenção dos grupos *ex situ*;
- A análise comparativa para os dados moleculares dos grupos de cativo permitiu o monitoramento dos níveis de diversidade genética através da mensuração de parâmetros como heterozigosidade, e riqueza e diversidade alélica, sendo estes dados

importante para auxiliar o manejo *ex situ*. A comparação dos dados *ex situ* e *in situ* poderá gerar insights para translocações e reintroduções de animais bem como para determinação de áreas prioritárias à conservação.

## 7. REFERÊNCIAS

ALVES SILVA, E. **Avaliação de um painel de microssatélites para identificação animal / averiguação de paternidade e estrutura genética da população de cavalos de raça Mangalarga Marchador.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

ARAÚJO, A. M. DE. **Paternidade e Diversidade genética de caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA.** [s.l.] Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.

AYALA-BURBANO, P. A. et al. Genetic assessment for the endangered black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), Callitrichidae, Primates. **American Journal of Primatology**, v. 79, n. 12, p. e22719, dez. 2017.

AYALA-BURBANO, P. A. et al. Studbook and molecular analyses for the endangered black-lion-tamarin; an integrative approach for assessing genetic diversity and driving management in captivity. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6781, 22 dez. 2020.

BAKER, A.; BALES, K. L.; DIETZ, J. M. Mating system and group dynamics in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). In: KLEIMAN, DEVRA G; RYLANDS, A. B. (Ed.). . **Lion Tamarins: Biology and Conservation**. 1. ed. [s.l.] Smithsonian Institution Scholarly Press, 2002.

BAKER, A. J.; BALES, K.; DIETZ, J. M. Sistemas de acasalamento e dinâmicas de grupo em micos-leões. **Micos Leões: Biologia e Conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 2008.

BALLOU, J. D. et al. *Leontopithecus* II. The second population and habitat viability assessment for lion tamarins (*Leontopithecus*). **Final Report. Conservation Breeding Specialist Group (SSC/IUCN), Apple Valley, Minnesota, EEUU**, 1998

BALLOU, J. D. et al. A história, o manejo e o papel da conservação de populações de micos-leões em cativeiro. In: KLEIMAN, DEVRA G; RYLANDS, A. B. (Ed.). . **Micos Leões: Biologia e Conservação.** [s.l: s.n.]. p. 136–162.

BALLOU, J. D.; LACY, R. C. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. In: **Population management for survival and recovery.** [s.l.] Columbia University Press New York, 1995. p. 76–111.

BEAUMONT, M. A.; BUFORD, N. W. Microsatellites in conservation genetics. In: **Microsatellites: Evolution and applications.** [s.l.] Oxford University Press, Oxford, 1998. p. 165–182.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas.** [s.l.] Artmed Editora, 2009.



BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–331, 1980.

CALDANO, L. T. P.; MONTICELLI, C.; GALETTI, P. M. J. Demography of the Black Lion Tamarin (*Leontopithecus Chrysopygus*, Mikan) in Capão Bonito National Forest (State of São Paulo). **Neotropical Primates**, v. 23, n. 1, p. 40–41, 2016.

CARVALHO, C. T. DE; CARVALHO, C. F. DE. A organização social dos saúis-pretos, (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan), na reserva em Teodoro Sampaio, São Paulo (Primates Callithricidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, n. 4, p. 707–717, 1989.

COIMBRA-FILHO, A. F. Considerações gerais e situação atual dos micos-leões escuros, *Leontideus chrysomelas* (Kuhl, 1820) e *Leontideus chrysopygus* (Mikan, 1823)(Callitrichidae, Primates). **Rev. Brasil. Biol**, v. 30, n. 2, p. 249–268, 1970.

COIMBRA-FILHO, A. F.; CÂMARA., I. G. Os limites originais do bioma da Mata Atlântica na Região Nordeste do Brasil. **Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza**, p. 86, 1996.

CUNNIFF, R. L.; DEAN, W. With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest. **The Hispanic American Historical Review**, v. 76, n. 3, p. 600, ago. 1996.

DA FONSECA, G. A. B. The vanishing Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**, v. 34, n. 1, p. 17–34, 1985.

DIGBY, L. J.; BARRETO, C. E. Social Organization in a Wild Population of *Callithrix jacchus*. **Folia Primatologica**, v. 61, n. 3, p. 123–134, 1993.

DRUMMOND, A. J. et al. **Geneious version 6.0.6**.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 13 jun. 2012.

FAULKES, C. G.; ARRUDA, M. F.; MONTEIRO DA CRUZ, M. A. O. Matrilínea genetic structure within and among populations of the cooperatively breeding common marmoset, *Callithrix jacchus*. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 4, p. 1101–1108, 2003.

FERNÁNDEZ, B. J.; TORO, M. A. The use of mathematical programming to control inbreeding in selection schemes. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 116, n. 6, p. 447–466, 1999.

FOOSE, T.; BALLOU, J. Population Management: Theory and Practice. **International Zoo Yearbook**, v. 27, p. 26–41, 1988.

FOOSE, T. J.; BALLOU, J. D. Management of small populations. **International Zoo Yearbook**, v. 27, n. 1, p. 26–41, 18 dez. 2007.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics**. [s.l.] Cambridge university press, 2002.

GALBUSERA, P. H. A.; GILLEMOT, S. Polymorphic microsatellite markers for the endangered golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae). **Conservation Genetics**, v. 9, n. 3, p. 731–733, 2008.

GOLDIZEN, A. W. Behavioral Ecology and Sociobiology Facultative polyandry and the role of infant-carrying in wild saddle-back tamarins (*Saguinus fuscicollis*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 20, n. 2, p. 99-109, 1987.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of heredity**, v. 86, n. 6, p. 485–486, 1995.

GRATIVOL, A. D. D.; BALLOU, J. D.; FLEISCHER, R. C. Microsatellite variation within and among recently isolated populations of golden lion tamarins. **Conservation Genetics**, v. 2, n. 1998, p. 1–9, 2001.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. [s.l.] Sinauer associates Sunderland, MA, 1997. v. 116

HEDRICK, P. W.; MILLER, P. Conservation genetics: theory and management of captive populations. In: SANDLUND OT, HINDAR K, B. A. (Ed.). . **Conservation of Biodiversity for Sustainable Development**. [s.l.: s.n.]. p. 70–87.

HOLST, B. et al. Lion Tamarin Population and Habitat Viability Assessment Workshop 2005: Final Report. [s.l.] **IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group**, 2006.

ITO, H. et al. Contrasting results from molecular and pedigree-based population diversity measures in captive zebra highlight challenges facing genetic management of zoo populations. **Zoo Biology**, v. 36, n. 1, p. 87–94, jan. 2017.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 2007.

KINGHORN, B. P.; KINGHORN, S. Pedigree Viewer-a graphical utility for browsing pedigreed data sets. **5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Anais...**University of Guelph, 1994

KLEIMAN, D. G. The Behavior and Conservation of the Golden Lion Tamarin, *Leontopithecus r. rosalia*. **1o Congresso Brasileiro de Primatologia**, p. 35–53, 1983.

KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. . B. **Micos-leões: biologia e conservação**. [s.l.] Editora S. Institution, 2008.

KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Lion Tamarins: Biology and Conservation**. Washington: Smithsonian, 2004. v. 38

LACY, R. C. Analysis of founder representation in pedigrees: founder equivalents and founder genome equivalents. **Zoo biology**, v. 8, n. 2, p. 111–123, 1989.

LACY, R. C.; BALLOU, J. D.; POLLAK, J. P. PMx: software package for demographic and genetic analysis and management of pedigreed populations. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 433–437, 2012.

LIMA, F. et al. On the occurrence of the black-lion-tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*) in Buri, São Paulo, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 11, n. 2, p. 144–145, 2003.

MARSHALL, T. C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular ecology**, v. 7, n. 5, p. 639–655, 1998.

MARTINS, M. M. et al. Genetic Analysis Reveals Population Structuring and a Bottleneck in the Black-Faced Lion Tamarin (*Leontopithecus caissara*). **Folia Primatologica**, v. 82, n. 4–5, p. 197–211, 2011.

MARTINS, M. M.; GALETTI JUNIOR, P. M. Informative microsatellites for genetic population studies of black-faced lion tamarins (*Leontopithecus caissara*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 173–175, 22 dez. 2010.

MEDICI, E. P. et al. Malay Tapir (*Tapirus indicus*): Conservation Workshop. **IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group**, p. 1–103, 2003.

MORAES, A. M. et al. Landscape resistance influences effective dispersal of endangered golden lion tamarins within the Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 224, n. June, p. 178–187, ago. 2018.

NASCIMENTO, A. T. A.; NALI, C.; DA FONSECA, G. A. B. Dispersal, group formation and kinship in the black-faced lion tamarin (*leontopithecus caissara*). **Folia Primatologica**, v. 85, n. 4, p. 216–227, 2014.

PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Resources**, v. 6, n. 1, p. 288–295, 2006.

PEREZ-SWEENEY, B. M. et al. Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 2, p. 198–201, 4 mar. 2005.

PEREZ-SWEENEY, B. M. et al. Examination of the Taxonomy and Diversification of *Leontopithecus* using the Mitochondrial Control Region. **International Journal of Primatology**, v. 29, n. 1, p. 245–263, 5 fev. 2008.

POPE, T. R. Socioecology, Population Fragmentation, and Patterns of Genetic Loss in Endangered Primates. In: **Conservation Genetics**. Boston, MA: Springer US, 1996. p. 119–159.

PRESTI, F. T. **Caracterização da diversidade genética, da estrutura populacional e**

**do parentesco de Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por meio da análise de regiões dos genomas nuclear e mitocondrial.** [s.l.] Tese (Doutorado em Ciências - Biologia/Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2010.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W.; FALUSH, D. Documentation for STRUCTURE software: Version 2. 2003.

R CORE TEAM. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.** URL <http://www.R-project.org/>, 2014.

RALLS, K.; BALLOU, J. D. Genetic Status and Management of California Condors. **The Condor**, v. 106, n. 2, p. 215–228, 1 maio 2004.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, n. 6, p. 1280–1283, 1995.

REZENDE, G. C. **Mico-leão-preto : A história de sucesso na conservação de uma espécie ameaçada.** [s.l.] Matrix Editora, 2015.

REZENDE, G. C, KNOGGE, C., PASSOS, F., LUDWIG, G., OLIVEIRA, L. C., JERUSALINSKY, L. & MITTERMEIER, R. A., 2020. *Leontopithecus chrysopygus* . A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2020: e.T11505A17935400

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, jun. 2009.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223–225, 1989.

ROBERT, A.; COUVET, D.; SARRAZIN, F. Integration of demography and genetics in population restorations. **Ecoscience**, v. 14, n. 4, p. 463–471, 2007.

RUDNICK, J. A.; LACY, R. C. The impact of assumptions about founder relationships on the effectiveness of captive breeding strategies. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 6, p. 1439–1450, dez. 2008.

RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Ex situ population management in the absence of pedigree information. **Molecular ecology**, v. 13, n. 9, p. 2829–2840, 2004.

SADDY, M. C. **Conservação do mico leão preto três tipos de manejo avaliados através da ecologia e comportamento.** [s.l.] Tese (Doutorado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SALDANHA, P. H. **Hereditariedade humana: noções elementares de genética aplicada ao homem.** [s.l.] Edart Livraria Editôra, 1967.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory**

**manual.** [s.l.] Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, fev. 2000.

SCHWARTZ, K. R. et al. Integrating In-Situ and Ex-Situ Data Management Processes for Biodiversity Conservation. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 5, n. OCT, p. 120, 6 out. 2017.

SEAL, U. S.; BALLOU, J. D.; VALLADARES-PÁDUA, C. Leontopithecus: Population Viability Analysis Workshop Report. **Captive Breeding Specialist Group (SSC/IUCN), Apple Valley, MN**, p. 314, 1990.

SONESSON, A. K.; MEUWISSEN, T. H. E. Minimization of rate of inbreeding for small populations with overlapping generations. **Genetics Research**, v. 77, n. 03, p. 285–292, 16 jun. 2001.

SWIFT, M. L. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 37, n. 2, p. 411–412, 1997.

TORO, M. et al. Optimal use of genetic markers in conservation programmes. **Genetics Selection Evolution**, v. 31, n. 3, p. 1–7, 1999.

VALLADARES-PADUA, C. et al. Metapopulation management for the conservation of black lion tamarins. **Lion Tamarins: Biology and Conservation**, n. February 2015, p. 301–314, 2002.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, set. 2004.

VON PELZELN, A. **Brasilische Säugetiere.** [s.l: s.n.].

WAITS, L. P.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 1, p. 249–256, 2001.

WANG, J. Monitoring and managing genetic variation in group breeding populations without individual pedigrees. **Conservation Genetics**, v. 5, n. 6, p. 813–825, 2004.

WORMELL, D. International Studbook for the Black Lion Tamarin *Leontopithecus chrysopygus*. n. December, p. 1–66, 2012.

WORMELL, D., MARQUES, M. C., International Studbook for the Black Lion Tamarin, *Leontopithecus chrysopygus*. 2020.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, p. 395–420, 1965.