



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

PAMELA ZAGANIN MODENA

**ESTRUTURA MATRILINEAR DE POPULAÇÕES *EX SITU* E *IN SITU* DO  
MICO LEÃO PRETO (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) E INSIGHTS  
PARA SEU MANEJO**

São Carlos - SP, 2021

Pamela Zaganin Modena

**ESTRUTURA MATRILINEAR DE POPULAÇÕES *EX SITU* E *IN SITU* DO  
MICO LEÃO PRETO (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) E INSIGHTS  
PARA SEU MANEJO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Conservação da Fauna.

Orientadora: Patrícia Domingues de Freitas

**São Carlos – SP, 2021**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Pamela Zaganin Modena, realizada em 31/08/2021.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas (UFSCar)

Profa. Dra. Alexandra Sanches (UFSCar)

Prof. Dr. Alcides Pissinatti (CPRJ)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.  
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna.

## RESUMO

A espécie *Leontopithecus chrysopygus*, conhecida popularmente como mico-leão-preto (MLP), vem sofrendo com a fragmentação de seu habitat natural, o que limita o fluxo gênico e resulta na diminuição da variabilidade genética e no aumento da endogamia dentro das populações. O estudo genético-populacional e o estabelecimento de parâmetros de diversidade genética, baseados em dados moleculares do DNA mitocondrial permitem a caracterização da estrutura e diversidade genética histórica dentro e entre populações, sendo estas informações importantes para auxiliar o manejo da espécie e manutenção da variação genética tanto em populações de vida-livre quanto de cativeiro. Neste trabalho a estrutura matrilinear de grupos *ex situ* e *in situ* foi avaliada com o objetivo de gerar insights para auxiliar as decisões de manejo e conservação da espécie em longo termo. Adicionalmente, dados de *pedigree* foram analisados para estabelecimento das relações de parentesco entre os animais de cativeiro. A região controle (D-loop) do genoma mitocondrial foi avaliada em 43 MLPs provenientes de cinco populações de vida livre e 32 indivíduos cativos mantidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, SP); 19 indivíduos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e 20 no Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT, Jersey). As sequências geradas foram analisadas utilizando-se diferentes ferramentas computacionais para caracterização da diversidade haplotípica e estrutura genética dos grupos avaliados. A análise de *pedigree* evidenciou valores de parentesco menores na FPZSP que no CPRJ e em DWCT. A análise dos dados mitocondriais evidenciou um total de sete haplótipos, sendo apenas três deles (H1, H2 e H3) compartilhados entre indivíduos de vida-livre e de cativeiro. O valor médio de diversidade haplotípica ( $H_d$ ) foi maior em vida-livre (0,752) que em cativeiro (0,589). A existência de haplótipos exclusivos na FPZSP, além da baixa diversidade haplotípica observada em DWCT e ausência desta no CPRJ, destaca a urgente necessidade de um manejo metapopulacional que objetive preservar uma base mais ampla da diversidade genética matrilinear nestas duas instituições. A presença de um haplótipo exclusivo na FPZSP indica também a necessidade de ampliar as análises nas populações *in situ*. Por outro lado, haplótipos exclusivos foram encontrados em populações *in situ*, indicando que as populações contemporâneas *ex situ* não retêm diversidade matrilinear histórica representativa das populações de vida-livre até o momento avaliadas. Este estudo traz dados importantes que podem auxiliar futuros planos de manejo metapopulacional integrado que visem ações de translocações e reintroduções baseados em genética.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Leontopithecus chrysopygus*, diversidade genética, DNA mitocondrial.

## 1. INTRODUÇÃO

O mico-leão-preto (MLP), *Leontopithecus chrysopygus* (Callithrichidae, Primates), é endêmico da Mata Atlântica do estado de São Paulo, bioma considerado como um dos mais fragmentados do continente americano (REZENDE, 2014). Esta espécie está categorizada como ameaçada de extinção tanto na lista vermelha da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza), quanto no IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente, Governo Federal, Brasil). O MLP já foi considerado extinto no início do século XX, mas na década de 1970 foram encontrados cerca de 200 indivíduos na região de Teodoro Sampaio, no estado de São Paulo, e alguns deles foram levados para o cativeiro, como uma forma de evitar a extinção *in situ* da espécie (COIMBRA-FILHO, 1970; 1996; RIBEIRO *et al.*, 2009; AYALA-BURBANO *et al.*, 2017).

Após a formação dos primeiros grupos *ex situ*, os dados dos animais mantidos em cativeiro passaram a ser registrados no livro genealógico da espécie (*Studbook*) (KLEIMAN & RYLANDS, 2002; AYALA-BURBANO *et al.*, 2020). O *Studbook* do MLP tem auxiliado o manejo da espécie *ex situ*, direcionando acasalamentos a fim de evitar o aumento da endogamia e a perda de diversidade genética. Entretanto, mesmo diante do constante esforço para manejar de forma adequada essa espécie em cativeiro, a idade avançada de alguns animais e o baixo número de casais reprodutores, constituem alguns dos problemas enfrentados pelos gestores que mantêm a espécie sob cuidado humano, principalmente, devido à constante tendência à perda de diversidade genética e consequente depressão por endogamia (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, análises genético-moleculares têm sido implementadas para auxiliar as decisões de manejo em populações de cativeiro (AYALA-BURBANO *et al.*, 2020) e também de vida livre (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017). Níveis adequados de

diversidade genética favorecem a manutenção do potencial evolutivo de uma espécie, permitindo que as populações se adaptem às mudanças ambientais e persistam ao longo do tempo (FRANKHAM, BRISCOE, & BALLOU, 2002). Na natureza, a baixa diversidade genética observada em grupos de MLPs pode ser devido a eventos históricos de gargalos populacionais ocasionados, principalmente, por fatores antropogênicos, como perda e fragmentação de habitat, fatores estes que isolam populações, reduzindo o fluxo gênico e favorecendo a endogamia e estruturação genética (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2005; FRANKHAM, BRISCOE, & BALLOU, 2002). Além disso, os MLPs costumam formar pequenos grupos familiares compostos por três a seis indivíduos, sendo que sua reprodução normalmente está associada a uma única fêmea e, ocasionalmente, a duas, com apenas um macho reprodutor (FAULKES; ARRUDA & MONTEIRO DA CRUZ, 2003), características da espécie que também tendem a manter níveis de variação genética mais reduzidos.

Atualmente, estima-se que existam cerca de 1600 MLPs em vida-livre (REZENDE *et al.*, 2020), distribuídos em 18 populações pertencentes a sete áreas protegidas, sendo estas: Parque Estadual do Morro do Diabo, Floresta Nacional de Capão Bonito, Estação Ecológica Mico Leão Preto, Estação Ecológica Caetetus, Fazenda Mosquito, Reserva Privada Olavo Egydio Setúbal e a Estação Ecológica Angatuba (REZENDE, 2014). Essas populações fazem parte de um programa de manejo conduzido pelo Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ), que abrange programas de reintrodução, translocação e ambientação, além de estudos relacionados ao comportamento e ecologia da espécie (KLEIMAN & RYLANDS, 2002).

Conhecer a diversidade e estrutura genética das populações *in situ* do MLP torna-se uma ferramenta importante para auxiliar estratégias que visem translocações entre áreas manejadas e/ou prioritárias para conservação. Por outro lado, o conhecimento

genético dos grupos *in situ* é relevante para programas que visem a reintrodução de animais na natureza, se necessário. Estudos genéticos no MLP, visando auxiliar estratégias de manejo, em geral, têm utilizado marcadores de microssatélites (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017; 2020), os quais permitem acessar parâmetros de diversidade genética nas populações contemporâneas, que refletem efeitos de recombinação e singamia do genoma nuclear (ALBERTS *et al.*, 2017). Por outro lado, muito pouco se sabe sobre a estrutura matrilinear das populações atuais do MLP, a qual reflete uma diversidade genética mais histórica.

Considerando o contexto apresentado, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a estrutura e diversidade genética matrilinear dentro e entre os grupos de MLPs de cativeiro e de vida-livre, através do sequenciamento e análise da região controle do DNA mitocondrial (D-loop); e analisar dados de *pedigree*, visando fornecer informações úteis para auxiliar as tomadas de decisões para o manejo e conservação da espécie em longo termo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Declarações éticas**

Essa pesquisa foi conduzida conforme os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil), sob os números 9805200815 e 7058110316. Todas as amostras biológicas foram coletadas a partir da obtenção de autorização fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO-ICMBio, Ministério do Meio Ambiente, Governo Federal, Brasil), sob os números 36961-1 e 34862-2. O acesso ao patrimônio genético foi registrado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e

Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN, Ministério do Meio Ambiente, Governo Federal, Brasil), sob número A411359. As autorizações para importação das amostras biológicas do exterior foram emitidas pela Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Flora e Fauna Selvagem (CITES), sob os números EX 14-65, EX 14.70, EX 14-67 e EX 14-66, 14BR015534/DF, 14BR015532/DF, 14BR015538/DF e 14BR015533/DF. Todas as recomendações propostas pela Sociedade Americana de Primatologistas para o Tratamento Ético de Primatas Não Humanos foram seguidas nesse estudo.

## **2.2 Amostragem biológica**

Ao todo, foram utilizadas amostras biológicas de pelos, sangue, fezes, tecidos sólidos e/ou DNA, obtidas de 43 indivíduos de vida-livre e de 71 de cativeiro; com 51 amostras de animais provenientes de cativeiros do Brasil, 20 da Europa e 43 de cinco populações de vida-livre. No Brasil, 32 amostras de cativeiro são provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, São Paulo, SP), 19 do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ, Rio de Janeiro, RJ). Na Europa, as 20 amostras são provenientes do Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT, Jersey, Reino Unido). De vida-livre, nove amostras são provenientes da Fazenda Santa Maria (FSM), 11 do Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD), três de Ponte Branca (PB), nove de Guareí (G) e 11 da Floresta Nacional de Capão Bonito (FNCB). Foram amostrados nove grupos familiares, sendo dois grupos provenientes da FNCB, localizada na região sudoeste do estado de São Paulo, à 200 km de São Paulo, na região do Vale do Serra do Paranapiacaba; dois da FSM, localizada na região de Presidente Epitácio (SP); um grupo do PEMD, situado no extremo Sudoeste do estado de São Paulo; três grupos de Guareí, município



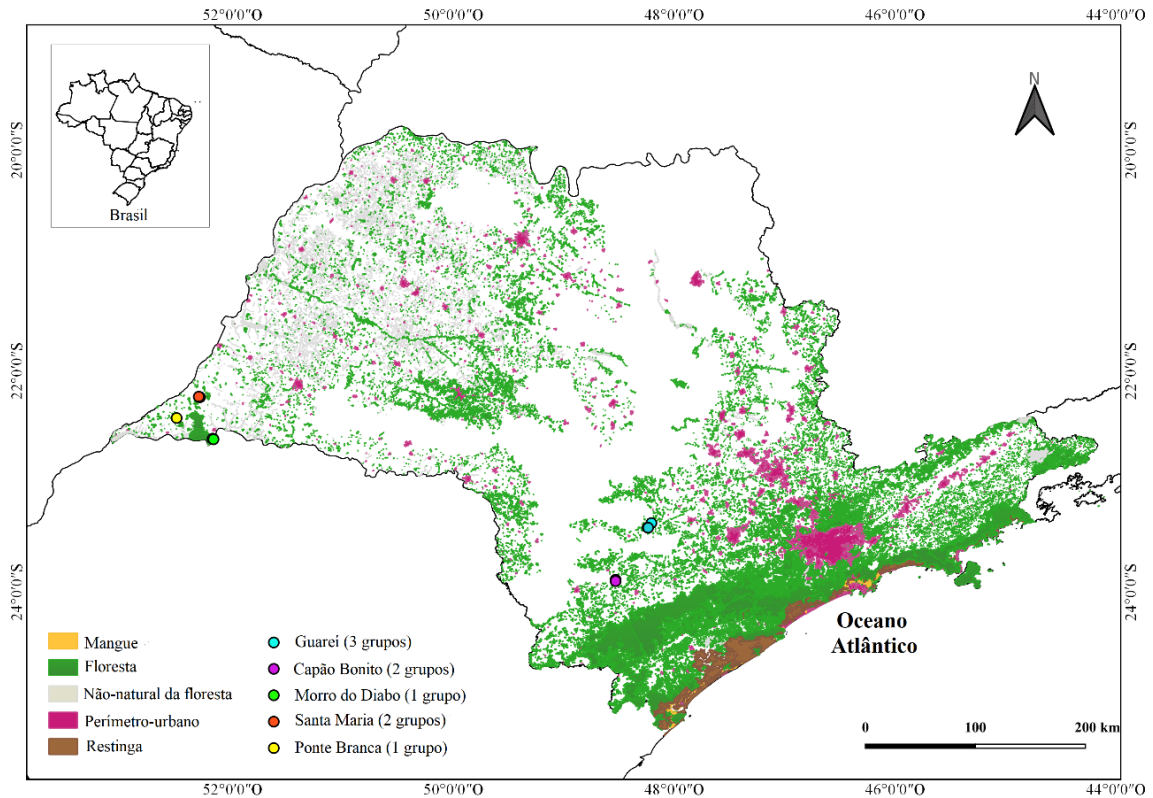
localizado no sul do estado de São Paulo; e um grupo de PB, localizada na Estação Ecológica MLP (Tabela 1; Figura 1).

**Tabela 1.** Locais de coleta, quantidades e tipos de amostras e localização geográfica (S: Sul e O: Oeste) de vida-livre e cativo. (FSM) Fazenda Santa Maria, (PEMD) Parque Estadual do Morro do Diabo, (PB) Ponte Branca, (G) Guareí, (FNCB) Floresta Nacional de Capão Bonito, (FPZSP) Fundação Parque Zoológico de São Paulo, (DWCT) Durrell Wildlife Conservation Trust, (CPRJ) Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.

POPULAÇÃO	NÚMERO DE AMOSTRAS	TIPO DE AMOSTRA	LOCALIZAÇÃO GPS
<b>Vida Livre</b>			
<b>FNCB</b>	11	Sangue, pelos e/ou tecido	grupo 1: S 23°53'19.2", O 48°31'57.6" grupo 2: S 23°54'4.65", O 48°31'57.6"
<b>FSM</b>	9	Sangue e/ou pelos	grupo 1: S 22°14'10.87", O 52°17'48.78"; grupo 2: S 22°13'54.50", O 52°18'28.79"
<b>PEMD</b>	11	Sangue, pelos e/ou fezes	S 22°36'43.93" O 52°10'56.82"
<b>G</b>	9	Pelos, fezes e/ou tecido	grupo 1: S 23°25'4.70" O 48°14'16.74" grupo 2: ---- grupo 3: S 23°22'34.45" O 48°12'29.21"
<b>PB</b>	3	Sangue, pelos e/ou fezes	S 22°25'30.63" O 52°30'30.63"
	<b>43</b>		
<b>Cativo</b>			
<b>FPZSP</b>	32	Sangue, pelo, fezes e/ou DNA	----
<b>DWCT</b>	20	Sangue e pelos	----
<b>CPRJ</b>	19	Sangue	----
	<b>71</b>		

Para coleta das amostras biológicas em cativo, o veterinário, em conjunto com o tratador da espécie no local, capturou manualmente o indivíduo, atraindo o animal ao local adequado para sua contenção, respeitando os padrões éticos e de conduta estabelecidos pela instituição que mantém a espécie em cativo. Na natureza, o veterinário, junto com a equipe de biólogos que estuda e/ou maneja a espécie em vida-livre, localizou as áreas de dormitório e capturou manualmente os animais nos ocos das árvores à noite. Para reduzir o possível estresse causado durante a captura e manipulação

de indivíduos, os MLPs foram anestesiados seguindo os procedimentos estabelecidos pela Sociedade Americana de Primatologistas para o tratamento ético de primatas não-humanos.



**Figura 1.** Mapa adaptado do Estado de São Paulo destacando os grupos pertencentes à Floresta Nacional de Capão Bonito (FNCB) em rosa, Guareí (G) em azul, Fazenda Santa Maria (FSM) em vermelho, Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) em verde e Ponte Branca (PB) em amarelo. **Fonte:** Ayala-Burbano, P.A. e colaboradores (2017), baseado em informações disponíveis no SOS Mata Atlântica.

As amostras de sangue venoso periférico foram coletadas utilizando-se seringas para sucção de aproximadamente 200  $\mu$ L de sangue por indivíduo. Uma vez coletado o sangue, este foi preservado em tubos *Vacutainer* contendo anticoagulante EDTA (3.6 mg), os quais foram posteriormente mantidos a  $-20^{\circ}$  C. Quando não foi possível coletar sangue, amostras de tufo de pelos, com 10 a 20 unidades foram coletadas manualmente de cada indivíduo e, em seguida, armazenadas à temperatura ambiente em envelopes de

plástico contendo sílica. Na impossibilidade de captura do animal, amostras de fezes foram coletadas e acondicionadas em álcool 70% à -20°C. Todas as funções vitais dos animais foram monitoradas durante a coleta de material biológico.

### **2.3 Extração de DNA e amplificação da região D-loop**

A extração de DNA das amostras de sangue e pelo foi feita usando o protocolo fenol-clorofórmio proposto por Sambrook e colaboradores (1989). As amostras de fezes foram extraídas utilizando o *kit 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, USA).

Para amplificação da região D-loop do DNA mitocondrial, inicialmente foram utilizados os *primers* LEONDLF1 (5'-AACTAATTCTACCATCAACACCCAAAGCT-3') e LEONDLR2 (5'-TCATGTCCTGTAACCATTAAGTTGATATCCACT-3') (PEREZ-SWEENEY, 2008). Posteriormente, novos *primers* foram desenhados especificamente para amplificação de amostras de DNA degradadas, uma vez que os *primers* previamente caracterizados para o grupo não apresentaram amplificação bem-sucedida em amostras de menor qualidade. Para o desenho do novo par de *primers* LCrysop F (forward) (5'-CCATCAACACCCAAAGCTGA-3') e LCrysop R (reverse) (5'-CGGAGGTTGGTAGATTAAGAGACC-3'), identificamos previamente a região com sítios polimórficos informativos e analisamos o genoma mitocondrial completo caracterizado para a espécie (FREITAS *et al.*, 2018) no software Geneious v. 6.1.8 (KEARSE *et al.*, 2012) para obtermos fragmentos com apenas cerca de 400 pb.

A reação de amplificação da região D-loop ocorreu sob as seguintes condições: MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Tris-HCl 10 mM, BSA 0,4 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq 1,0 U, primers 10

pmol e DNA 50 ng em um volume final de 12,5 µL. As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas em um termociclador Veriti (Thermal Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) programado com um ciclo inicial de desnaturação a 95 ° C por 6 min, seguido de 35 ciclos a 94 ° C a 1 min, 60 ° C a 45s e 72 ° C a 45s (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2008).

Todos os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose à 1%, corados com GelRed (Uniscience, Osasco, BR) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. As amostras que apresentaram padrão de amplificação satisfatório foram purificadas usando o protocolo proposto por Kusukawa *et al.* (1990) e sequenciadas em sequenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## **2.4 Análises dos dados D-loop**

As sequências oriundas do sequenciamento foram alinhadas por meio da ferramenta CLUSTALW (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1994) e editadas usando-se a plataforma Geneious v. 6.1.8 (KEARSE *et al.*, 2012). Após edição e alinhamento das sequências, foram obtidos os índices de diversidade haplotípica (Hd) (NEI, 1987), diversidade nucleotídica (Pi) (NEI & TAJIMA, 1981), número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências (K); número de haplótipos (h) e o número de sítios polimórficos (S) para cada população de cativo e de vida-livre. Esses índices foram estimados no programa DNA *Sequence Polymorphism*, DNAsp v. 6.10.04 (ROZAS *et al.*, 2017). A estrutura matrilinear dos grupos foi avaliada por meio da construção de rede de haplótipos no programa PopArt (LEIGH & BRYANT, 2015), com base no método de *Median-Joining* (BANDELT *et al.*, 1999).

Os níveis de diferenciação entre os grupos foram calculados através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) a partir da estimativa dos índices de fixação  $F_{st}$ ,  $F_{ct}$  e

F<sub>st</sub> que avaliam a proporção de variação entre os grupos, entre as populações dentro dos grupos e entre populações, respectivamente (EXCOFFIER, SMOUSE & QUATTRO, 1992; EXCOFFIER, LAVAL & SCHNEIDER, 2005). Também calculamos os valores de F<sub>st</sub> par a par para entre os grupos amostrados. Ambas as análises foram realizadas no software Arlequin (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) considerando a significância de  $p < 0,05$ , testada através de 10.000 permutações. Realizamos também uma análise de inferência bayesiana para delimitação de grupos no software BAPS (CORANDER *et al.*, 2008). A opção utilizada foi a *Clustering of Groups of Individuals*, na qual são fornecidos os dados de origem das amostras de cada população como informação *a priori*. Foram testados os valores de K = 1-10, replicados dez vezes. O melhor valor de K foi escolhido a partir do maior valor de  $\log \textit{likelihood} - \log(\textit{ml})$  e maior valor de probabilidade posterior.

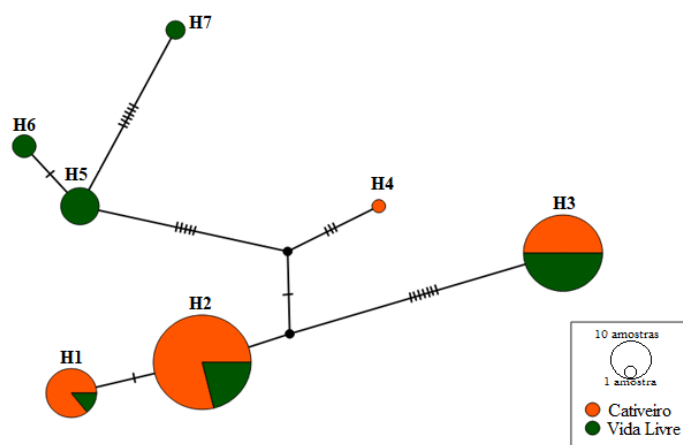
## **2.5 Análise de pedigree (*Studbook*)**

Para estabelecer as relações genealógicas dos MLPs mantidos em cativeiro, dados do *Studbook* das espécies (WORMELL & MARQUES, 2020) foram avaliados, utilizando-se o programa *Pedigree Viewer* versão 6.5 (KINGHORN; KINGHORN, 1994). O valor de parentesco entre os casais reprodutores *ex situ* foi calculado com o programa PMx 1.6.2 (LACY; BALLOU; POLLAK, 2012), medido de 0 a 1, sendo 0 = ausência de relacionamento; 0,5 = relacionamento de irmãos completos; e 0,25 = relacionamento de meio irmãos (LACY, 1989). Portanto, valores mais próximos de 1 indicam que os indivíduos são mais relacionados entre si. Com base nos dados disponíveis no *Studbook*, consideramos também informações relativas ao total de indivíduos gerados por casal reprodutor e a viabilidade das progênes em termos de taxa de sobrevivência.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Estrutura matrilinear

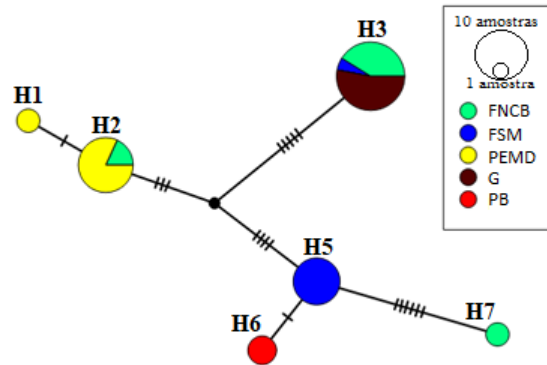
A amplificação da região D-loop com os pares de *primers* LEONDLF1-LEONDLR2 e LCrysopF-LCrysopR gerou fragmentos com tamanhos de 800 e 400 pares de base, respectivamente, sobrepostos entre si. Somente a região de sobreposição contendo os sítios polimórficos foi considerada para as análises posteriores. Ao todo, foram obtidas 114 sequências para 71 indivíduos de cativo e 43 de vida-livre. A análise dos dados evidenciou um total de sete haplótipos, sendo os haplótipos um (H1), dois (H2) e três (H3) compartilhados entre indivíduos de vida-livre e de cativo; o haplótipo quatro (H4) existente apenas em indivíduos de cativo; e os haplótipos cinco (H5), seis (H6) e sete (H7) existentes somente em indivíduos de vida-livre (Figura 2).



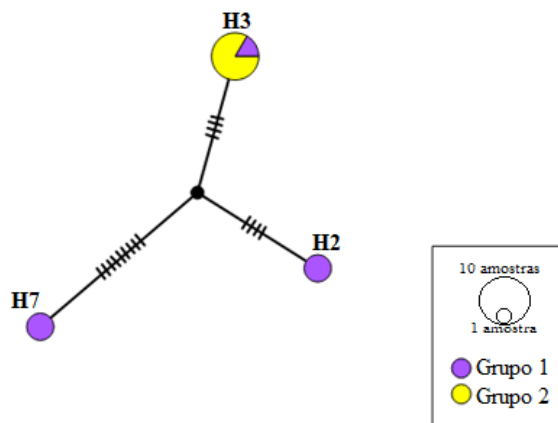
**Figura 2.** Rede de haplótipos apresentando os haplótipos encontrados nos indivíduos de vida-livre (verde) e de cativo (alaranjado).

As redes de haplótipos considerando somente as populações de vida-livre (Figura 3) evidenciaram a existência de haplótipos exclusivos em todas as áreas estudadas apresentam, exceto em Guareí (G). As populações PEMD e FNCB evidenciaram compartilhamento do haplótipo H2, enquanto que H3 foi compartilhado entre FNCB, FSM e G. A população FNCB (11 indivíduos) apresentou os haplótipos H2, H3 e H7, sendo que o grupo 1, composto por cinco indivíduos, apresentou os três haplótipos e o

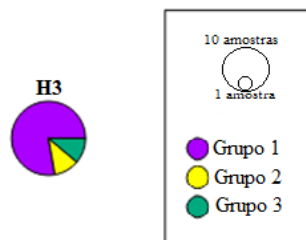
grupo 2, composto por seis indivíduos, evidenciou apenas o haplótipo H3 (Figura 4). Por fim, nos 3 grupos de Guareí (nove indivíduos) foi detectado apenas o haplótipo H3, sendo que os grupos 2 e 3 são compostos por somente um indivíduo cada (Figura 5).



**Figura 3.** Rede de haplótipos das populações de vida-livre. FNCB: Floresta Nacional de Capão Bonito (verde); FSM: Fazenda Santa Maria (azul); PEMD: Parque Estadual do Morro do Diabo (amarelo); G: Guareí (marrom); PB: Ponte Branca (vermelho).

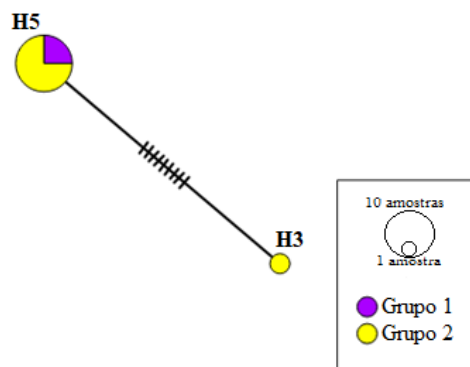


**Figura 4.** Rede de haplótipos dos grupos 1 (lilás) e 2 (amarelo) da população amostrada da FNCB: Floresta Nacional de Capão Bonito.

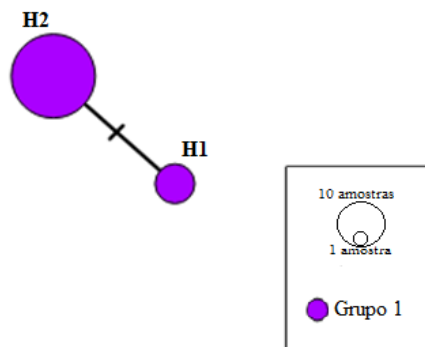


**Figura 5.** Rede de haplótipos dos grupos 1 (lilás), 2 (amarelo) e 3 (verde) da população amostrada de G: Guareí.

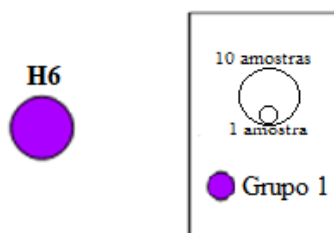
Na FSM (nove indivíduos) foram identificados os haplótipos H3 e H5, sendo evidenciados ambos os haplótipos no grupo 2, composto por apenas dois indivíduos, e somente o haplótipo H5 no grupo 1, composto por sete indivíduos (Figura 6). Já a população do PEMD, composta por um único grupo familiar com 11 indivíduos, evidenciou os haplótipos H1 e H2 (Figura 7); e a população de PB, composta por um único grupo familiar com três indivíduos, evidenciou apenas o haplótipo H6, sendo este um haplótipo exclusivo à esta população (Figura 8).



**Figura 6.** Rede de haplótipos dos grupos 1 (lilás) e 2 (amarelo) da população amostrada da FSM: Fazenda Santa Maria.



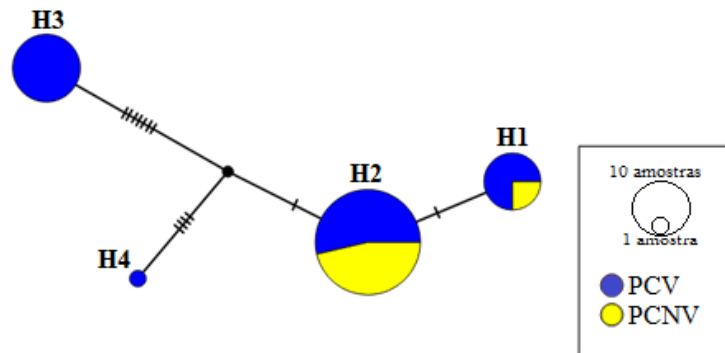
**Figura 7.** Rede de haplótipos do grupo 1 (lilás) da população amostrada do PEMD: Parque Estadual do Morro do Diabo.



**Figura 8.** Rede de haplótipo do grupo 1 (lilás) da população amostrada de PB: Ponte Branca.

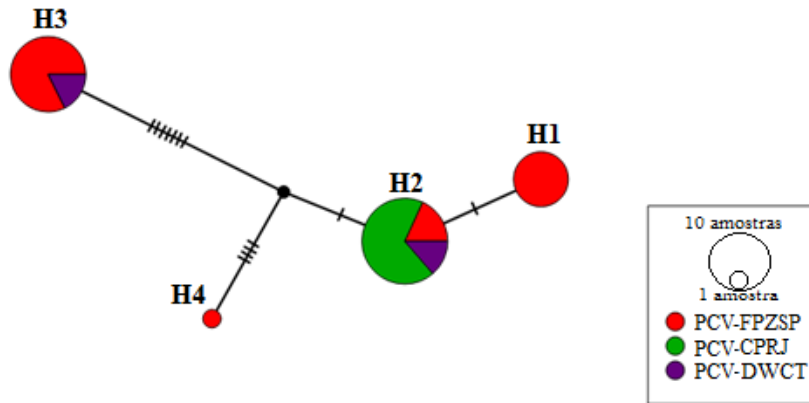


Dentre os indivíduos dos grupos *ex situ*, foram encontrados os haplótipos H1, H2, H3 e H4 em 46 animais que constituem a população cativa atualmente vivente (PCV), e verificados apenas os haplótipos H1 e H2 em 25 animais que já vieram a óbito, representando aqui a população cativa não vivente (PCNV) (Figura 9).



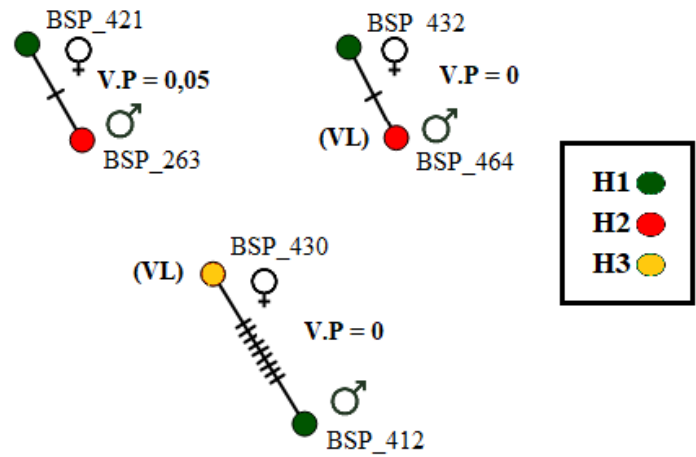
**Figura 9.** Rede de haplótipos das amostras obtidas de cativo. PCV: População Cativa Vivente (azul) e PCNV: População Cativa Não-Vivente (amarelo).

Quando avaliamos os haplótipos entre os diferentes grupos *ex situ* verificamos que H1 e H4 estão presentes somente nos indivíduos da FPZSP, sendo H4 um haplótipo exclusivo do indivíduo BSP\_509, um macho procedente de vida-livre, sem o local exato de sua procedência registrado no *Studbook* da espécie (WORMELL & MARQUES, 2020). Já o haplótipo H2 é compartilhado entre indivíduos das três instituições; e o haplótipo H3 foi encontrado somente em indivíduos da FPZSP e de DWCT (Figura 10). Estes resultados demonstram que todos os haplótipos existentes atualmente em cativo, baseado na ampla amostragem realizada neste estudo para os grupos *ex situ*, estão presentes na FPZSP. Por outro lado, os haplótipos H5, H6 e H7 são exclusivos das populações de vida-livre.

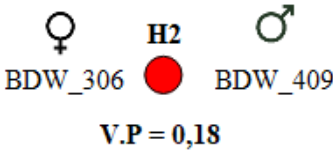


**Figura 10.** Rede de haplótipos das populações viventes amostradas em cativeiro. PCV-FPZSP: População Cativa Vivente-Fundação Parque Zoológico de São Paulo (vermelho); PCV-CPRJ: População Cativa Vivente-Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (verde); PCV-DWCT: População Cativa Vivente-Durrell Wildlife Conservation Trust (roxo).

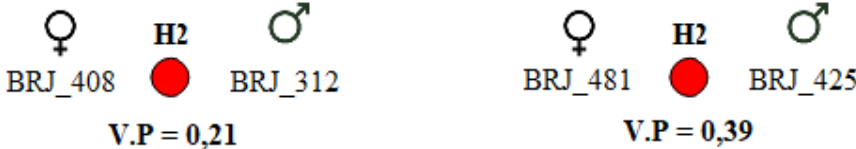
Através do estabelecimento do valor de parentesco (VP), estimamos o grau de relacionamento entre os principais casais reprodutores em cativeiro, sendo observados menores valores de parentesco na FPZSP quando comparados aos observados no CPRJ e em DWCT. Adicionalmente, não foi observado nenhum compartilhamento de haplótipo dentro de cada casal reprodutor da FPZSP (Figura 11). Por outro lado, foi observado somente o haplótipo H2 entre os principais reprodutores do CPRJ (Figura 12) e DWCT (Figura 13), sendo evidenciado maiores valores de VP quando comparados aos da FPZSP. Os dados de *Studbook* revelaram ainda que dois reprodutores da FPZSP (BSP\_464 e BSP\_430) consistem em animais de vida-livre (ambos procedentes do PEMD) não relacionados aos seus respectivos pares, sendo que nestes casais não foi observado compartilhamento de haplótipos entre machos e fêmeas (Figura 11).



**Figura 11.** Principais casais reprodutores da FPZSP (Fundação Parque Zoológico de São Paulo) (BSP). Os haplótipos estão representados pelas cores verde (haplótipo H1), vermelho (haplótipo H2) e amarelo (haplótipo H3); (VL) Vida-Livre (indivíduo silvestre); (VP) Valor de Parentesco.



**Figura 12.** Principal casal reprodutor de DWCT (Durrell Wildlife Conservation Trust) (DWCT). O haplótipo está representado pela cor vermelha (haplótipo H2); (VP) Valor de Parentesco.



**Figura 13.** Principais casais reprodutores do CPRJ (Centro de Primatologia do Rio de Janeiro) (BRJ). Os haplótipos estão representados pela cor vermelha (haplótipo H2); (VP) Valor de Parentesco.

Segundo a versão mais atualizada do *Studbook* da espécie (WORMELL & MARQUES, 2020), os dados para as progênes produzidas revelaram que na FPZSP: o casal BSP\_421 e BSP\_263 produziu apenas três indivíduos no período de 2007 a 2008, sendo que todos permaneceram vivos até o ano de 2020; o casal BSP\_432 e BSP\_464 produziu 18 indivíduos no período de 2011 a 2018, sendo que nove deles permaneceram vivos até 2020; e o casal BSP\_430 e BSP\_412 produziu 17 indivíduos no período de 2010 a 2015, sendo que 11 deles permaneceram vivos até 2020 e seis vieram a óbito antes disso. Em DWCT, o casal BDW\_306 e BDW\_409 produziu apenas dois indivíduos no período de 2010 a 2011, mas ambos vieram a óbito antes de 2020, sendo que um deles nasceu e faleceu no mesmo dia. Por fim, o casal BRJ\_408 e BRJ\_312 do CPRJ produziu 19 indivíduos no período de 2005 a 2016, sendo que quatro deles permaneceram vivos até 2020 e 15 vieram a óbito com menos de um ano de vida; já o casal BRJ\_481 e BRJ\_425, com relação de irmãos completos, produziu quatro indivíduos no ano de 2016, e todos permaneceram vivos até o ano de 2020, entretanto, nenhuma outra prole foi gerada posteriormente por este casal.

### **3.2 Diversidade genética**

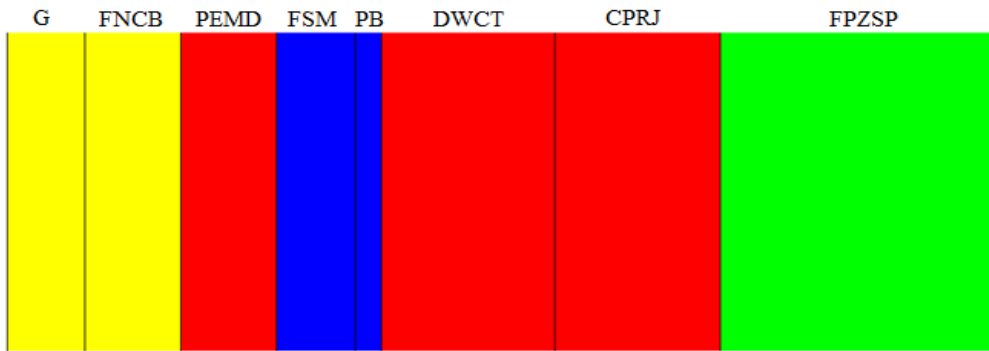
O valor médio de diversidade haplotípica ( $H_d$ ) foi maior em vida-livre (0,752) que em cativeiro (0,589). Entre as populações de vida-livre, a  $H_d$  foi maior na população FNCB (0,582) que em PEMD (0,327) e FSM (0,222). Por outro lado, as populações de PB e G apresentaram ausência de diversidade haplotípica ( $H_d=0$ ) (Tabela 2). Entre as populações de cativeiro, a  $H_d$  foi maior na FPZSP (0,675), em comparação com DWCT (0,353) e com o CPRJ (0,00), o qual apresentou apenas o haplótipo H2, evidenciando, portanto, ausência de diversidade de haplótipos.

**Tabela 2.** Índices de diversidade genética para populações *ex situ* (FPZSP, CPRJ, DWCT) e *in situ* (G, FNCB, PEMD, FSM, PB) do mico-leão-preto. FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro; DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust; G: Guareí; FNCB: Floresta Nacional de Capão Bonito; PEMD: Parque Estadual do Morro do Diabo; FSM: Fazenda Santa Maria; PB: Ponte Branca. (*N*) Número de sequências analisadas, (*S*) número de sítios polimórficos, (*h*) número de haplótipos, (*Hd*) diversidade haplotípica, (*Pi*) diversidade nucleotídica.

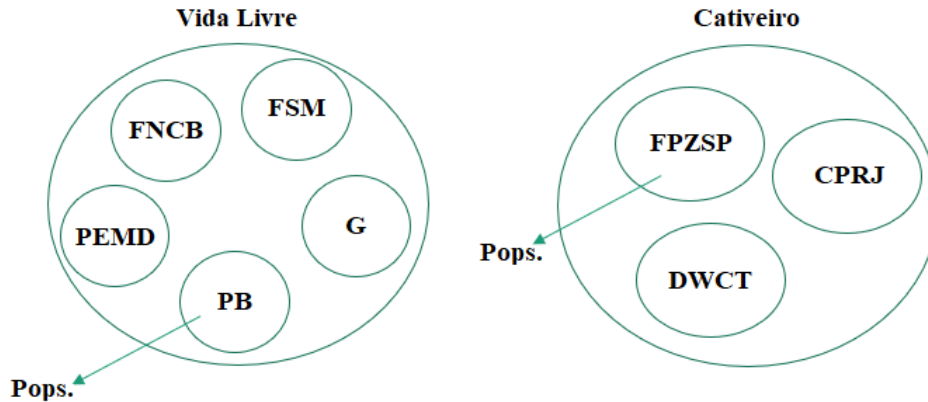
<i>LOCAL</i>	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>Pi</i>
<b>Vida-Livre</b>					
<b>FSM</b>	9	9	2	0,222	0,00631
<b>PEMD</b>	11	1	2	0,327	0,00103
<b>PB</b>	3	0	1	0,000	0,00000
<b>G</b>	9	0	1	0,000	0,00000
<b>FNCB</b>	11	17	3	0,582	0,01985
	<b>43</b>	<b>19</b>	<b>6</b>	<b>0,752*</b>	<b>0,01944</b>
<b>Cativeiro</b>					
<b>FPZSP</b>	32	13	4	0,675	0,01510
<b>DWCT</b>	20	9	2	0,353	0,00709
<b>CPRJ</b>	19	0	1	0,000	0,00000
	<b>71</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>0,589*</b>	<b>0,01062</b>

### 3.3 Diferenciação genética entre populações

A Análise de Clusterização Bayesiana (BAPS) indicou, com valor de probabilidade posterior de 0,78, a existência de quatro grupos genéticos dentro da amostragem avaliada. Esses grupos genéticos são indicados pelas cores amarela (G e FNCB), vermelha (PEMD, DWCT e CPRJ), azul (FSM e PB) e verde (FPZSP) na Figura 14. A análise de variância molecular (AMOVA) permitiu inferir a relação de diferenciação na amostragem de vida-livre e de cativeiro, considerando as cinco populações silvestres (FNCB, FSM, G, PB e PEMD) e as três populações de cativeiro (FPZSP, CPRJ e DWCT) (Figura 15). Uma maior percentagem de variação (47,06) foi encontrada entre as populações dentro de cada amostragem (vida-livre e cativeiro), sendo que os índices de fixação evidenciaram os respectivos valores:  $F_{sc} = 0.50191$ ,  $F_{st} = 0.53300$  e  $F_{ct} = 0.06242$  (Tabela 3).



**Figura 14.** Análise de *clusterização* por Inferência Bayesiana realizada no BAPS para populações *ex situ* (FPZSP, CPRJ, DWCT) e *in situ* (G, FNCB, PEMD, FSM, PB) do mico leão preto. FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro; DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust; G: Guareí; FNCB: Floresta Nacional de Capão Bonito; PEMD: Parque Estadual do Morro do Diabo; FSM: Fazenda Santa Maria; PB: Ponte Branca.

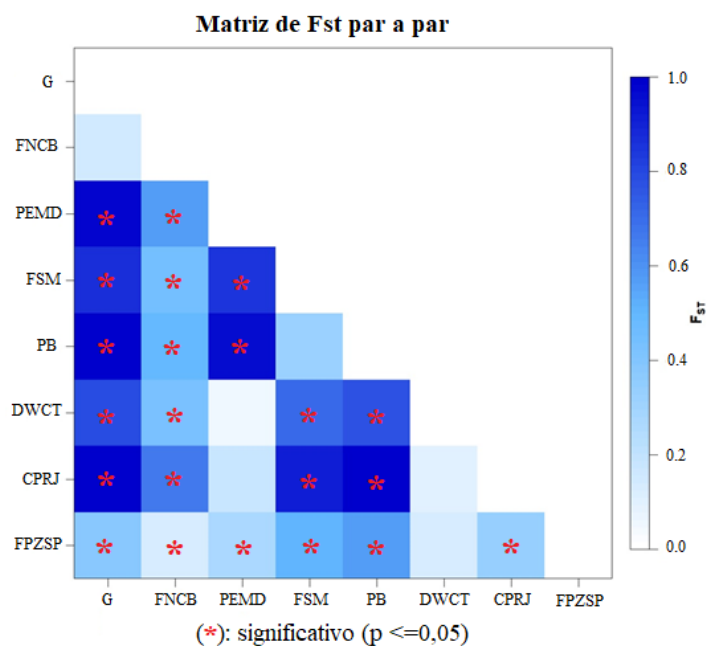


**Figura 15.** Representação da amostragem para indivíduos de populações de vida-livre de cativeiro, e suas respectivas origens. FNCB: Floresta Nacional de Capão Bonito, PEMD: Parque Estadual Morro do Diabo, PB: Ponte Branca, G: Guareí, FSM: Fazenda Santa Maria, FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust, CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.

**Tabela 3.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Leontopithecus chrysopygus* estudadas utilizando-se o marcador mitocondrial D-loop, evidenciando os valores de percentagem da variação dentro e entre as populações.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentagem de variação
Entre Vida-Livre e Cativeiro	1	30.602	0.17227 Va	6.24
Entre populações dentro de Vida-Livre e Cativeiro	6	110.673	1.29884 Vb	47.06
Dentro das populações	106	136.628	1.28895 Vc	46.70
<b>TOTAL</b>	113	277.904	276.006	
Índices de Fixação	<b>Fsc</b>	<b>Fst</b>	<b>Fct</b>	
	0.50191	0.53300	0.06242	

Os maiores valores de Fst, demonstrados na matriz com a cor azul escuro e marcados com asterisco (\*) foram encontrados para os seguintes pares de populações de vida-livre: PEMD e G; PB e G; PB e PEMD. O CPRJ também evidenciou altos índices de diferenciação com as populações de G, FSM e PB. Os valores de Fst não foram significativos entre os pares de populações sem o asterisco (\*) e que estão representadas com tons mais claros de azul: FNCB e G; PB e FSM (*in situ*) e CPRJ e DWCT; FPZSP e DWCT (*ex situ*). DWCT e CPRJ não apresentaram diferenciação com a população do PEMD (Figura 16).



**Figura 16.** Matriz de Fst par a par para populações *ex situ* (FPZSP, CPRJ, DWCT) e *in situ* (G, FNCB, PEMD, FSM, PB) do mico leão preto. FPZSP: Fundação Parque Zoológico de São Paulo; CPRJ: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro; DWCT: Durrell Wildlife Conservation Trust; G: Guareí; FNCB: Floresta Nacional de Capão Bonito; PEMD: Parque Estadual do Morro do Diabo; FSM: Fazenda Santa Maria; PB: Ponte Branca. Valores de Fst mais próximos de 1.0 e com azul mais escuro indicam maior a diferença entre as populações. Valores de Fst mais próximos de 0,0 e com azul mais claro indicam menor diferença entre as populações.

#### 4. DISCUSSÃO

A partir da avaliação da região controle (D-loop) do genoma mitocondrial e da análise de dados do *Studbook* do MLP, este estudo contribui para o entendimento da estrutura genética matrilinear de grupos *ex situ* e sugere que indivíduos com haplótipos diferentes e menor grau de relacionamento tendem a se reproduzir com maior frequência em cativeiro, resultando em proles viáveis.

As análises de *pedigree* evidenciaram a existência de seis casais reprodutores em cativeiro, sendo observados três deles na FPZSP; dois no CPRJ; e um no DWCT. Os valores de parentesco estabelecidos revelaram que, dos três grupos familiares da FPZSP, dois são provenientes de casais reprodutores formados por um descendente de cativeiro e



um indivíduo proveniente da natureza ( $VP = 0$ ), evidenciando ausência de relacionamento entre estes. O terceiro casal também evidenciou baixo valor de parentesco ( $VP = 0,05$ ), apesar de ambos os indivíduos terem nascido em cativeiro. No CPRJ, no entanto, foram observados valores de parentesco mais altos para os indivíduos de ambos os casais reprodutores, sendo observada uma relação de irmãos completos para o casal BRJ\_481 e BRJ\_425 ( $VP = 0,39$ ). Já em DWCT, embora ambos os indivíduos tenham nascido em cativeiro, foi observado um valor de parentesco intermediário ( $VP = 0,18$ ), quando comparado com os valores de parentesco dos casais reprodutores das demais instituições. É importante ressaltar que tanto no CPRJ quanto em DWCT, todos os reprodutores apresentam o mesmo haplótipo H2, evidenciando ausência de diversidade para o marcador mitocondrial aqui analisado. Esses dados mostram que na FPZSP, animais com haplótipos diferenciados e baixo grau de parentesco geraram um maior número total de descendentes ( $NDT = 38$ ) que apresentaram um valor médio para a taxa de sobrevivência (TSM) maior (60%) quando comparado com o CPRJ ( $NDT = 23$  e  $TXM = 35\%$ ) e DWCT ( $NDT = 2$  e  $TXM = 0\%$ ), sugerindo uma maior eficiência de reprodução entre indivíduos com haplótipos distintos e baixos valores de parentesco.

Embora a abordagem empregada aqui não esteja avaliando a diversidade do genoma nuclear, o alto grau de parentesco em alguns casais, além da ausência de diversidade de haplótipos, indica a formação de grupos familiares baseada no cruzamento entre indivíduos geneticamente muito relacionados, fato este que pode conduzir à perda de variantes alélicas e à exposição de alelos recessivos prejudiciais em *loci* relacionados a características de performance relevantes à adaptação e viabilidade, como por exemplo às relacionadas à reprodução (LACY, 1989; AYALA-BURBANO *et al.*, 2017).

Em relação à variação haplotípica nos grupos *ex situ* e *in situ*, o valor médio de diversidade foi maior em vida livre ( $Hd=0,752$ ) do que em cativeiro ( $Hd=0,589$ ), apesar

das populações PB e G terem apresentado pouca ou nenhuma variação. Além disso, a análise comparativa entre os grupos *ex situ* e *in situ* demonstrou uma maior contribuição genética matrilinear de MLPs oriundos da região do PEMD nas populações do CPRJ e de DWCT. Por outro lado, a FPZSP se mostrou diferenciada da do PEMD e das demais populações *ex situ* e *in situ*, evidenciando uma maior diversidade de haplótipos e a presença de um haplótipo exclusivo (H4), ainda não verificado em populações de vida livre. Por outro lado, a ausência nos grupos *ex situ* de três haplótipos (H5, H6 e H7), evidenciados apenas nas populações de vida-livre, indica a necessidade de introdução de novos animais silvestres em cativeiro, objetivando garantir uma maior representatividade da diversidade genética matrilinear encontrada na natureza também em cativeiro, com vistas a ações futuras de manejo voltadas à reintrodução futura de animais de cativeiro em vida-livre.

A existência de haplótipos exclusivos na FPZSP (H1 e H4), em comparação com DWCT e com o CPRJ, e ausência de diversidade haplotípica nesta última, evidencia também a urgente necessidade de um manejo metapopulacional *ex situ* mais eficiente, que vise manter níveis de diversidade genética histórica adequados nas populações de MLPs mantidas nas três principais instituições que manejam a espécie em cativeiro. Por outro lado, a presença de um haplótipo exclusivo na população PB, no qual foram avaliados apenas três indivíduos, revela a relevância deste fragmento em termos de retenção de diversidade genética matrilinear histórica da espécie, especialmente quando se considera sua baixa densidade populacional, estimada em 0,035 (FORERO-SÁNCHEZ, 2020).

Populações *ex situ* desempenham um papel importante na conservação de espécies ameaçadas de extinção, e em alguns casos representam pools genéticos únicos, capazes de restabelecer ou reforçar as populações de vida-livre (BRITT *et al.*, 2004; AYALA-

BURBANO *et al.*, 2020). Sabe-se, no entanto, que em cativeiro há uma tendência constante ao aumento da endogamia, devido ao baixo número de reprodutores e à limitada introdução de animais da natureza para renovar os grupos cativos (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017). Portanto, o monitoramento constante da variabilidade genética e o manejo metapopulacional adequado é essencial para minimizar o risco de extinção em populações *ex situ*, que em geral apresentam tamanhos reduzidos (LACY, 1989; FRANKHAM, 2002; AYALA-BURBANO *et al.*, 2017). Por outro lado, populações de vida-livre também podem apresentar tamanhos populacionais reduzidos resultantes das ações antrópicas, principalmente da fragmentação e perda de habitat, como é o caso do MLP (PB=46, FSM=18, FNCB=74, G=15) (FORERO-SÁNCHEZ, 2020); e a despeito de existirem populações com maiores densidades populacionais estimadas (PEMD=1142), nem sempre os valores de diversidade genética são mais altos, devido a ocorrência de fatores estocásticos como os eventos de gargalos genéticos e efeito fundador, que antecedem uma eventual expansão populacional (LANDE, 1988; FRANKHAM, 2002; 2008; 2010).

No presente trabalho, verificamos valores de diversidade haplotípica comparáveis entre populações vida-livre com tamanhos amostrais diferentes (ver Tabela 2). Além disso, observamos também o compartilhamento de haplótipos entre fragmentos de áreas não conectadas e distantes (por exemplo: PEMD e FNCB), e a ausência destes em fragmentos mais próximos (por exemplo: PEMD e PB). Estes dados revelam a existência de haplótipos ancestrais e sugerem uma conectividade histórica entre estas áreas, com provável fluxo gênico anterior à fragmentação. A análise de estruturação populacional reforça este cenário e também o efeito de deriva e posterior diminuição e/ou interrupção de fluxo gênico como os prováveis fatores responsáveis pela diferenciação genética observada entre algumas populações (ver Figuras 14 e 16). Tais eventos, reconhecidamente, promovem a perda de diversidade genética e aumentam o risco de

extinção em populações com tamanhos reduzidos (LANDE, 1988; FRANKHAM, 2008; 2010).

Em nosso estudo, a análise Bayesiana indicou a existência de três grupos genéticos principais para as cinco populações de vida-livre avaliadas, sendo um deles formado pelas populações G e FNCB, outro pelas populações FSM e PB, e um terceiro pela população PEMD, a qual não se apresentou geneticamente diferenciada dos grupos do CPRJ e de DWCT. Estes dados reforçam a origem dos grupos *ex situ* mantidos nessas instituições, baseada essencialmente em fundadores provindos do PEMD (WORMELL & MARQUES 2020). Por outro lado, a FPZSP se mostrou marcadamente diferenciada de todas as demais populações *ex situ* e *in situ*, podendo este ser resultado de algumas poucas novas introduções de indivíduos silvestres, ocorridas mais recentemente na instituição (MARQUES MC, comunicação pessoal).

Segundo a AMOVA e a matriz de  $F_{st}$  par a par, a maior percentagem de variação foi observada dentro das populações de vida-livre e de cativeiro, do que entre as populações de vida-livre e de cativeiro. De fato, já é sabido que populações isoladas tendem a se divergir geneticamente ao longo das gerações, independentemente de contato anterior ou de sua origem comum (LA HAYE, NEUMANN & KOELEWIJN, 2012; AYALA-BURBANO *et al.*, 2017). Especificamente, a marcada estruturação observada em populações de vida-livre de áreas desconectadas, com indicação de haplótipos ancestrais, que sugerem uma conectividade passada, indica a necessidade de proposição de ações que visem ampliar a conectividade nesses fragmentos. Por outro lado, o fato de algumas populações *ex situ* se agruparem unicamente a uma população de vida-livre, reforça a premência para o estabelecimento de planos de manejo que ampliem a base genética da diversidade matrilinear da metapopulação de cativeiro.

Segundo Ayala-Burbano e colaboradores (2017), análises de marcadores moleculares de microssatélites realizadas em grupos *ex situ*, antes da translocação mais recente, de cinco indivíduos das instituições brasileiras para DWCT, ocorrida em 2017, evidenciaram dois grupos genéticos distintos para a metapopulação *ex situ* de MLP: um deles formado pelo CPRJ e a FPZSP e outro por DWCT. Não foram também observadas diferenças nos valores de diversidade genética de locos nucleares neutros tanto em vida-livre quanto de cativeiro, os quais se mostraram estruturados. No entanto, os nossos dados, baseados em análises mitocondriais, revelaram uma diversidade e estrutura genética diferenciada para alguns grupos *ex situ*, apontando a FPZSP como a instituição que retém a maior diversidade haplotípica em cativeiro, e indicando a urgente necessidade de introdução de novo pool gênico em cativeiro, especialmente no CPRJ, seja pela translocação de animais *ex situ* ou pela introdução de animais de vida-livre.

A primeira estratégia a ser adotada por programas de conservação que pretendem recuperar populações na natureza é o manejo de uma população *in situ*. Entretanto, situações em que as populações silvestres sofrem ameaças em seus locais de origem têm sido frequentes devido às intervenções humanas, que comprometem cada vez mais a sobrevivência das espécies em seu habitat natural, resultando em inúmeras extinções locais (FRANCISCO & SILVEIRA, 2013). Neste sentido, manter espécies em condições *ex situ* pode se constituir em um recurso alternativo para complementar estratégias de conservação *in situ*, e possibilitar a manutenção de populações com *pools* gênicos únicos, que na natureza estariam sob constante risco (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Assim, os animais de cativeiro se tornam uma apólice de seguro, caso uma ou mais populações, ou mesmo uma espécie, venha a ser dizimada da natureza (SEAL, BALLOU & VALLADARES-PADUA, 1991).

As populações *ex situ* podem ser utilizadas para repovoamento de áreas com ocorrência histórica da espécie ou que tiveram os tamanhos populacionais drasticamente reduzidos, como é o caso do MLP. Para tal é necessário, no entanto, que haja um planejamento adequado para que a população em cativeiro seja manejada de modo a reter variabilidade genética representativa das populações de vida-livre, objetivando garantir potencial de adaptação e viabilidade da espécie após a reintrodução. Programas de preparação em cativeiro para habilidades específicas que serão relevantes na natureza, além de acompanhamento e monitoramento dos animais manejados após soltura, são também essenciais para assegurar o sucesso de reintroduções (KLEIMAN, 1989; SEDDON, ARMSTRONG & MALONEY, 2007). Neste sentido, a expansão da população *ex situ* e a revitalização dos plantéis reprodutores são essenciais para que os grupos de cativeiro se constituam em um reservatório genético (MANSOUR & BALLOU, 1994). No entanto, a introdução de novos indivíduos da natureza tem se mostrado uma estratégia pouco praticada, fato este que tem dificultado a implantação de planos de manejo integrado (SEAL, BALLOU & VALLADARES-PADUA, 1990; AYALA-BURBANO *et al.*, 2020).

Para o MLP, de forma geral, o manejo da espécie foi bem-sucedido por um tempo devido ao bom andamento dos comitês que realizavam a articulação entre as instituições envolvidas (zoológicos, órgãos públicos e organizações não governamentais). Entretanto, com o passar dos anos surgiram algumas dificuldades devido à falta de indivíduos necessários para introduzir, além do fato dos grupos de cativeiro apresentarem uma série de problemas relacionados à reprodução, devido ao baixo número de casais reprodutores em condições *ex situ* e a idade avançada dos mesmos, além das altas taxas de mortalidade dos filhotes (VALLADARES-PADUA *et al.*, 2009).

Felizmente, o avanço recente dos estudos genéticos, tanto nos grupos mantidos em cativeiro quanto nas populações de vida-livre está permitindo a caracterização da estrutura e diversidade genética na espécie, através de análises de locos neutros de microssatélites (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017; 2020) e agora neste trabalho, através de análises mitocondriais da região Dloop, a qual revela uma diversidade mais histórica (LIEDIGK *et al.*, 2014) para as populações contemporâneas do MLP aqui analisadas. Acreditamos que a combinação de ambos os dados do genoma nuclear e mitocondrial será relevante para auxiliar tomadas de decisão para efetivação de um futuro manejo metapopulacional integrado para conservação desta espécie, que contemple medidas de translocação e reintrodução baseadas também em genética.

## **5. CONCLUSÕES**

5.1. Foi observada uma menor diversidade de haplótipos em grupos de *L. chrysopygus* de cativeiro, em relação aos de vida-livre. Sendo assim, a diversidade das populações de vida-livre não está sendo representada em cativeiro, como proposto pelo plano de manejo da espécie que visa o estabelecimento de uma metapopulação.

5.2. A existência de haplótipos exclusivos na FPZSP, em comparação com DWCT e com o CPRJ, e a ausência de diversidade nesta instituição, evidencia a urgente necessidade de um manejo metapopulacional *ex situ* mais eficiente.

5.3. A maior representação genética de indivíduos da região do PEMD nos grupos *ex situ* aponta para necessidade de incremento de novos animais de vida-livre em cativeiro, sendo que a seleção desses animais deve se basear em dados genéticos acessados também por marcadores mitocondriais.

5.4. A existência de populações estruturadas em vida livre, com a presença de haplótipos não compartilhados em áreas próximas, e o compartilhamento destes em áreas distantes

desconectadas, sugere um cenário de conectividade histórica com provável fluxo gênico e efeito de deriva, com posterior interrupção de fluxo gênico, provavelmente, ocasionado pela fragmentação.

## 6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos de fomento, FPZSP pela bolsa concedida, FAPESP, CNPq e CAPES pelo financiamento da pesquisa.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. (2017). **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 6 ed, p. 804-808.
- AYALA-BURBANO PA, CALDANO L, GALETTI JR PM, PISSINATTI A, MARQUES MC, WORMELL D, FREITAS PD. (2017). Genetic assessment for the endangered black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), Callitrichidae, Primates. **American Journal of Primatology**, v. 79(12), p. 1-13.
- AYALA-BURBANO, P. A., GALETTI, P. M. J., WORMELL, D., PISSINATTI, A., MARQUES, M. C., FREITAS, P. D. (2020). 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.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P., ROHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 37-48.
- BRITT, A., WELCH, C., KATZ, A., PORTON, I., JUNGE, R., WILLIAMS, C., & HARING, D. (2004). The re-stocking of captive-bred ruffed lemurs (*Varecia variegata variegata*) into the Betampona Reserve, Madagascar: Methodology and recommendations. **Biodiversity and Conservation**, 13, 635–657.
- COIMBRA-FILHO, A. F. (1970). Acerca da redescoberta de *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) e apontamentos sobre sua ecologia. **Revista Brasileira Biologia**, 30, 609–615.
- COIMBRA-FILHO, A. F. (1996). **Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil**. Brasil: Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza.
- CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J.; TANG, J. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 539.



CULLEN, L., BODMER, R. E., & PÁDUA, C. V. (2000). Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. **Biological Conservation**, 95, 49–56.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. (2010). Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 13, p. 564-567.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491.

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

FONSECA, G. A. B. (1985). The vanishing brazilian atlantic forest. **Biological Conservation**, 34, 17–34.

FORERO-SÁNCHEZ, F. (2020). **Análises de Viabilidade Populacional no Planejamento para a Conservação do Mico-Leão-Preto**. Trabalho final apresentado ao Programa de Mestrado Profissional em Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ecologia. IPÊ – INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS.

FRANCISCO, M. R. & SILVEIRA, L. F. Conservação Animal *ex situ*. In: PIRATELLI, A. J. & FRANCISCO, M. R. (2013). **Conservação da Biodiversidade, dos conceitos as ações**. Technical Books editora, p. 117-130.

FRANKHAM, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p.325–333.

FRANKHAM, R. (2010). Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**, v. 143, n. 9, p. 1919–1927.

FRANKHAM R., BRISCOE D. A., & BALLOU J. D. (2002). **Introduction to conservation genetics**. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

FREITAS, P. D., MENDEZ, F. L., CHÁVEZ-CONGRAINS, K., GALETTI, P. M. J., COUTINHO, L. L., PISSINATTI, A., BUSTAMANTE, C. D. (2018). Next-Generation Sequencing of the Complete Mitochondrial Genome of the Endangered Species Black Lion Tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Primates) and Mitogenomic Phylogeny Focusing on the Callitrichidae Family. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 6, p. 1985-1991.

- KEARSE, M. et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649.
- KLEIMAN, D. G. (1989). Reintroduction of Captive Mammals for Conservation. **BioScience**, 39(3), 152–161. doi:10.2307/1311025.
- KLEIMAN D., & RYLANDS A. (2002). **Lion Tamarins: Biology and Conservation**. Washington: Smithsonian Institution Press.
- KINGHORN, B. P.; KINGHORN, S. (1994). **Pedigree Viewer-a graphical utility for browsing pedigreed data sets**. 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Anais...University of Guelph.
- KUSUKAWA, N., UEMORI, T., ASADA, K., KATO, I. (1990). Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. **Biotechniques**, 9(1):66-8, 70, 72.
- LACY, R. C. (1989). Analysis of founder representation in pedigrees: founder equivalents and founder genome equivalents. **Zoo biology**, v. 8, n. 2, p. 111–123.
- LACY, R. C.; BALLOU, J. D.; POLLAK, J. P. (2012). 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.
- LA HAYE, M., NEUMANN, K., & KOELEWIJN, H. (2012). Strong decline of gene diversity in local populations of the highly endangered Common hamster (*Cricetus cricetus*) in the western part of its European range. **Conservation Genetics**, 13(2), 311–322. <http://doi.org/10.1007/s10592-011-0278-x>
- LANDE, R. (1988). Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v. 241, n. 4872, p. 1455-1460.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116.
- LIEDIGK, R., ROOS, C., BRAMEIER, M., & ZINNER, D. (2014). Mitogenomics of the Old World monkey tribe Papionini. **BMC Evolutionary Biology**, 14(1).
- MANSOUR, J. A.; BALLOU, J. D. (1994). Capitalizing the ark: the economic benefit of adding founders to captive populations. **Neotropical Primates**, v. 2, n. suppl, p. 8-11.
- NEI M. (1987). **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York Chichester, West Sussex, pp 177–179.
- NEI, M., TAJIMA, F. (1981). DNA Polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, v. 97, p. 145-163.
- PEREZ-SWEENEY, B. M., VALLADARES-PADUA, C., BURRELL, A. S., DI FIORE, A., SATKOSKI, J., VAN COEVERDEN DE GROOT, P. J., & MELNICK, D. J. (2005).

Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology**, 5(2), 198–201.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; VALLADARES-PADUA, C.; MARTINS, C. S.; MORALES, J. C.; MELNICK, D. J. (2008). Examination of the taxonomy and diversification of *Leontopithecus* using the mitochondrial control region. **International Journal of Primatology**, v. 29, n. 1, p. 245-263.

PRIMACK, RICHARD B.; RODRIGUES, EFRAIM. (2006). **Biologia da conservação**. In: Biologia da conservação.

REZENDE, G. C. (2014). **Mico-leão-preto: a História de Sucesso na Conservação de uma Espécie Ameaçada**. (1 ed) São Paulo: Matrix Editora.

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., METZGER, J., MARTENSEN, A., PONZONI, F., & HIROTA, M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, 142(6), 1141–1153.

ROZAS, J. FERRER-MATA, A., SÁNCHEZ-DeIBARRIO, J. C., GUIRAO-RICO, S., LIBRADO, P., RAMOS-ONSINS, S. E., SÁNCHEZ-GRACIA, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E. F.; MANIATIS, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual**. No. Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press.

SEAL, U. S.; BALLOU, J. D.; VALLADARES-PADUA, C. V. (1990). *Leontopithecus*: Population viability analysis workshop report. **Captive Breeding Specialist Group (SSC/IUCN)**, Apple Valley, MN.

SEAL, U. S.; BALLOU, J. D.; VALLADARES-PÁDUA, C. (1991). *Leontopithecus* Population Viability Analysis. Saint Paul: **Captive Breeding Specialist Group - IUCN**, v. 1. 314p.

SEDDON, P. J., ARMSTRONG, D. P., & MALONEY, R. F. (2007). Developing the Science of Reintroduction Biology. **Conservation Biology**, 21(2), 303–312. doi:10.1111/j.1523-1739.2006.00627. x.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680.

VALLADARES-PADUA, C.B.; MARTINS, C.S.; RUDRAN, R. MANEJO INTEGRADO DE ESPÉCIES AMEAÇADAS. IN: CULLEN JR., L.; RUDRAN, R.

(ORGS.). (2009). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. 2a Ed. Curitiba: Ed. Universidade Federal do Paraná, p. 633-651.

WORMELL, D.; MARQUES, M. C. (2020). **International Studbook for the Black Lion Tamarin, *Leontopithecus chrysopygus*, 2020**. Durrell Wildlife Conservation Trust and São Paulo Zoo.

ZEIGLER, S. L.; DE VLEESCHOUWER, K. M.; RABOY, B. E. (2013). Assessing Extinction Risk in Small Metapopulations of Golden-headed Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) in Bahia State, Brazil. **Biotropica**, v. 45, n. 4, p. 528-535.