

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA
LABORATÓRIO DE BIODIVERSIDADE MOLECULAR E CONSERVAÇÃO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

GISELE OREFICE

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES *EX SITU* DE
LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS (KUHLE, 1820) (PRIMATA, CALLITHRICIDAE)**

SÃO CARLOS, SP
Maio de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA
LABORATÓRIO DE BIODIVERSIDADE MOLECULAR E CONSERVAÇÃO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

GISELE OREFICE

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES *EX SITU* DE
LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS (KUHLMAN, 1820) (PRIMATA, CALLITHRICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Profissional em Conservação da Fauna, sob orientação do Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior.

SÃO CARLOS, SP
Maio de 2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O66c Orefice, Gisele
Caracterização genética de populações ex situ de
Leontopithecus chrysomelas (Kuhl, 1820) (Primata,
Callithricidae) / Gisele Orefice. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
60 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. Conservação. 2. Genética. 3. Primata. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gisele Orefice, realizada em 29/05/2015:

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior
UFSCar

Profa. Dra. Alexandra Sanches
UFSCar

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko
UNESP

A todas as espécies da fauna brasileira que hoje, de alguma forma, estão ameaçadas de extinção por ações humanas de superioridade.

Àqueles que acreditam na igualdade entre as espécies.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, por me aceitar como aluna. Pela paciência, broncas e orientação ao longo desses dois anos.

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo por conceder a bolsa de mestrado e por fornecer as amostras e informações sobre os mico-leões de seu plantel. Agradecimento especial à Bióloga Mara Cristina Marques, pelo auxílio e atenção dedicados sempre que precisei.

Ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ – INEA) também por fornecer as amostras de todos os mico-leões de seu espaço, principalmente ao Prof. Dr. Alcides Pissinatti, por me receber tão bem, pela eficiência e pelos ensinamentos em apenas dois dias de convivência. Além da Dra. Silvia Bahadram Moreira pela colaboração com dados sobre os animais cativos deste local.

Ao Ministério público Federal e Estadual, ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), a Fundação de amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Greater Los Angeles Zoo Association (GLAZA), The Zoological Society of Philadelphia, American Society of Primatologist (ASP) a Conservation International (CI), pela constante cooperação no programa de reprodução de primatas do neotrópico e conservação da biodiversidade brasileira.

As professoras, professores e coordenação do Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna pela contribuição para a minha formação profissional.

A minha amiga e companheira de laboratório Andreia Magro Moraes por me auxiliar desde em detalhes no laboratório, até as análises dos dados deste estudo. Obrigada por mostrar caminhos sempre que eu achava que não ia dar conta, pela paciência, pelo apoio, carinho e principalmente pela amizade. Muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação: Aline B. Silva, Aline G. Nunes, Andriara Silos, Bruno H. Saranholi, Carla Guinart, Carmen H. B. Ruiz, Carolina Machado, Danielly V. Blanck, Fernando Peron, Jorge Luis R. Malaver, Juan P. Torres, Karen Rodriguez, Leonardo P. Niero, Mariana Correa, Paola A. Burbano, Raphael Oliveira, Regina S. Yabe e Rosane Santos, pelo companheirismo e pela ajuda sempre que necessário. Especialmente a Karla V. Chávez Rodríguez de Congrains por toda a ajuda nas análises dos dados deste estudo e na finalização do mesmo. Sem ela eu não teria conseguido, sem dúvida alguma. Obrigada!

As minhas queridas amigas mestrandas: Bruna L. Galletti, Camila Martins, Denise M. Benedicto, Priscilla P. Pardo, Camila Galvão e Yanna Dias pelo apoio, alegrias, risadas,

angustias compartilhadas e, principalmente, por essa grande amizade que ficará para sempre. Muito obrigada, meninas! E Isabela Watanabe, que além de amiga mestranda, companheira de casa e contas, se tornou uma grande amiga-irmã, obrigada!

Aos meus pais Leonice De Gaspari Orefice e Reinaldo Valério Orefice que sempre me apoiaram em cada passo, não medindo esforços para me ajudar a realizar cada sonho que tenho. Obrigada por compreender a minha ausência em diversos momentos. Vocês são tudo para mim.

As minhas amigas não biólogas da minha cidade natal, Patrícia Orefice (amiga e prima), Rachel M. Moço, Anaí Floret e Natalia de Alice, que compreenderam e acreditaram no meu trabalho. Por estarem sempre presentes, mesmo na distancia.

A todos que durante essa trajetória, fizeram parte da minha vida. Muito obrigada!

“Com o nosso amor nós poderíamos salvar o mundo...”
George Harrison

RESUMO

Os programas de reprodução e manejo de espécies ameaçadas em cativeiro atuam como uma salvaguarda contra a possível extinção de espécies na natureza. A espécie modelo deste estudo, *Leontopithecus chrysomelas* ou micos-leão-da-cara-dourada (MLCD), possui populações mantidas em cativeiro com a finalidade de assegurar uma diversidade genética representativa da espécie, pois seu habitat natural vem sofrendo uma gradual perda e fragmentação. A população cativa de MLCD possui um grande número de fundadores, diferente do que normalmente ocorre com outras espécies ameaçadas. A diversidade genética de duas populações cativas de *L. chrysomelas* foi avaliada por meio de 16 locos microssatélites (sete locos homólogos e nove heterólogos). As populações estão mantidas no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e objetivou-se verificar se a diversidade genética dessas populações vem de fato sendo mantida *ex situ* com relação à *in situ*. Além disso, foram investigadas possíveis correlações entre *fitness* e heterozigosidade individual, usando como medida a contribuição individual para o crescimento populacional (Pt), em um determinado intervalo de tempo. Verificamos uma diferenciação genética entre as duas populações analisadas devido à falta de fluxo gênico entre as instituições há algumas gerações. Os resultados indicam que a diversidade genética destas populações cativas é similar à encontrada na população natural REBIO-Una&Ararauna, a qual se concentra na única área florestal sob proteção grande o suficiente para reter uma média ou alta densidade de MLCD e 98% de sua diversidade genética. O efeito da heterozigosidade individual sobre a medida de *fitness* Pt foi verificada somente na população do CPRJ. Esta análise de correlação indica que no CPRJ os indivíduos com maior heterozigosidade estão deixando mais descendentes, o que não acontece na FPZSP. Os resultados de diversidade genética e de correlação entre *fitness* e heterozigosidade individual sugerem que o manejo realizado nas instituições é divergente, no entanto também pode ser devido a outros fatores, como o efeito fundador.

ABSTRACT

Captive programs of breeding and management of threatened species act as a safeguard against a likely extinction of species in the nature. The model species in this study, *Leontopithecus chrysomelas* or golden headed lion tamarin (MLCD), has populations maintained in captivity in order to ensure a representative genetic diversity, since its natural habitat has been undergoing gradual loss and fragmentation. In contrast to which occurs in other threatened species, MLCD's captive population has a large number of founder individuals. The genetic diversity of two captive populations of *L. chrysomelas* was evaluated by using 16 microsatellite loci (seven homologous and nine heterologous loci). The populations are held at Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) and at Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) and we aimed to verify if genetic diversity has been maintained *ex situ* in comparison to *in situ*'s. Besides, we investigated possible correlations between fitness and individual heterozygosity. The fitness measure was the individual contribution for population growth (Pt) in a given time interval. We detected genetic differentiation between the two evaluated institutions due to lack of gene flow for some past generations. Our findings suggest that genetic diversity of these captive populations is similar to one measured in wild population of REBIO-Una&Ararauna, which is found in a single protected forest area that is large enough to retain an average or high density of MLCD and 98% of its genetic diversity. The individual heterozygosity effect on Pt fitness measure was verified just in CPRJ population. This correlation analysis indicates that the individuals from CPRJ with higher heterozygosity are leaving more offspring, which does not happen in FPZSP. The genetic diversity and correlation between fitness and individual heterozygosity results suggest that the management carried out in institutions is divergent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Leontopithecus chrysomelas</i> em meio cativo na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.....	16
Figura 2 – Distribuição geográfica originalde <i>Leontopithecus chrysomelas</i>	18
Figura 3 – Registro genealógico de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> : exemplo do interior de um <i>Studbook</i>	20
Figura 4 – Coleta de material invasivo (sangue) de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.....	26
Figura 5 – Análise de Correspondência Fatorial mostrando a presença de dois grupos: população da FPZSP e população do CPRJ.....	33
Figura 6 – Genealogia de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> em dois cativeiros do Brasil. Relaçãode todos os indivíduos que contribuíram para os grupos familiares atuais.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locos microssatélites que amplificaram com sucesso. Apresenta-se, para cada loco: o nome do primer, as suas sequências (Forward: F e Reverse: R), a fluorescência e a temperatura de alinhamento (T° C) utilizada neste estudo.....	28
Tabela 2 – Valores médio de Pt de acordo com os anos. N = número de indivíduos usados para o cálculo da Pt.....	31
Tabela 3 - Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para dezesseis locos microssatélites.....	34
Tabela 4 - Características dos locos de microssatélites e diversidade genética em <i>Leontopithecus chrysomelas</i> do CPRJ.....	35
Tabela 5 - Características dos locos de microssatélites e diversidade genética em <i>Leontopithecus chrysomelas</i> da FPZSP.....	35
Tabela 6 – Número de indivíduos e Coeficiente de endogamia de heredograma (F) médio, por gerações.....	36
Tabela 7 – Diversidade genética em espécies de <i>Leontopithecus</i>	44
Tabela 8 – Diversidade genética de <i>Leontopithecus chrysomelas</i> de cativos do Brasil e da Europa.....	44
Tabela 9 – Diversidade genética de <i>Leontopithecus chrysomelas ex-situ</i> e <i>in situ</i>	46
Tabela 10 - Valores de heterozigosidade individual em <i>Leontopithecus chrysomelas</i> do CPRJ.....	57
Tabela 11 – Valores de heterozigosidade individual em <i>Leontopithecus chrysomelas</i> da FPZSP.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos A – Regressões lineares entre heterozigosidades individuais e Pt, referentes ao Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.....	40
Gráficos B – Regressões lineares entre heterozigosidades individuais e Pt, referentes a Fundação Parque Zoológico de São Paulo.....	40
Gráfico C – Regressão linear entre Pt e Ln(idade) para o CPRJ.....	41
Gráfico D – Regressão cúbica entre Pt e Ln(idade) para a FPZSP.....	41
Gráfico E – Variação do Pt médio por ano em ambos os cativeiros.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZA – American Zoo and Aquarium Association

CPRJ – Centro de Primatologia do Rio de Janeiro

CPRJ/INEA – Centro de Primatologia do Rio de Janeiro/Instituto Estadual do Meio Ambiente

FPZSP – Fundação Parque Zoológico de São Paulo

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

IRMC – Comitê Internacional de Recuperação e Manejo dos Mico-Leões

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza

MMA – Ministério do Meio Ambiente

REBio Una – Reserva Biológica de Una

SNZP – Smithsonian National Zoological park

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos.

WAPT – Wild Animal Propagation Trust

WAZA - World Association of Zoos and Aquariums (Associação Mundial de Zoológicos e Aquários).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Ecologia de <i>Leontopithecus chrysomelas</i>	16
1.2. Status de conservação do mico-leão-da-cara-dourada na natureza.....	17
1.3. Histórico da população <i>ex situ</i> de <i>L. chrysomelas</i>	18
1.4. Microssatélites: Uma ferramenta para o conhecimento da diversidade genética.....	20
1.5. Correlação fitness-heterozigosidade (HFC).....	22
2. OBJETIVO GERAL	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 População e Localidades <i>ex situ</i>	25
3.2 Obtenção das amostras.....	25
3.3 Extração do DNA.....	26
3.3.1 Amostras de sangue.....	26
3.3.2 Amostras de pelo.....	26
3.4. Amplificação dos locos de microssatélites e genotipagem.....	27
3.5. Análise dos dados.....	29
3.5.1 Diversidade genética.....	29
3.5.2 Análise do studbook e do Coeficiente de Endogamia de Heredograma (F).....	29
3.5.3 Heterozigosidade individual e Correlação Fitness-Heterozigosidade (HFC).....	30
4. RESULTADOS	33
4.1. Estrutura e diversidade genética.....	33
4.2. Análise do Studbook e do Coeficiente de Endogamia de Heredograma (F).....	36
4.3. Heterozigosidade individual (HI) e Correlação <i>Fitness</i> -Heterozigosidade (HFC).....	39
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. APÊNDICE B – Heterozigosidade Individual – CPRJ.....	57
9. APÊNDICE C – Heterozigosidade Individual – FPZSP.....	59

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leontopithecus* (Lesson, 1840) pertencente à família *Callithricidae*, é composto pelos menores primatas do Novo Mundo, com um peso que varia de 100 a 700g, segundo Fleage, 1999. Suas espécies, *Leontopithecus chrysomelas* (KUHL, 1820) – mico-leão-da-cara-dourada (MLCD), *Leontopithecus chrysopygus* (MIKAN, 1823) – mico-leão-preto (MLP), *Leontopithecus rosalia* (LINAEUS, 1766) – mico-leão-dourado (MLD) e *Leontopithecus caissara* (PERSSON & LORINE, 1990) - mico-leão-da-cara-preta (MLCP), são reconhecidas pela aparência em forma de juba leonina formada por longos pelos na região da cabeça, fato que originou a denominação comum de micos-leões (COIMBRA-FILHO, 1977). As espécies de micos-leões são notadamente arborícolas e endêmicas da Mata Atlântica, uma das florestas tropicais mais ameaçadas do planeta (MITTERMEIER *et al.*, 1999; MYERS *et al.*, 2000). Nota-se que a destruição dos ambientes naturais originais fez com que esses animais passassem a habitar também as florestas secundárias disponíveis com diferentes graus de alteração, dependendo da disponibilidade de recursos, mostrando que há uma grande flexibilidade ecológica e etológica neste gênero (COIMBRA-FILHO, 1977; PISSINATTI, 1999; GUDORIZZI, 2008).

A perda e a fragmentação das florestas habitadas pelos micos-leões os colocaram na lista vermelha nacional: “Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção”, como ameaçados de extinção, e internacional: “União Internacional para a Conservação da Natureza” (IUCN, em inglês), também como ameaçados, com exceção de *Leontopithecus caissara*, que se encontra listado como “criticamente ameaçado” (MMA, 2014; IUCN, 2015). As quatro espécies deste gênero são caracterizadas pelo pequeno tamanho populacional e pela baixa densidade nos poucos fragmentos em que persistem na natureza. Segundo Kleyman e Rylands (2008), provavelmente o pequeno tamanho efetivo populacional, associado à crescente fragmentação de seus habitats, tenha importantes consequências na estruturação e no manejo da diversidade genética dos mico-leões.

Uma maneira de assegurar estas populações em meio silvestre, e ajudar a amenizar o risco de extinção, refere-se aos programas de reprodução em cativeiro, os quais, através do manejo reprodutivo ajudam a conservar uma variabilidade genética representativa desses animais (FRANKHAM *et al.*, 2002). A manutenção de espécies em meio cativo atua como uma salvaguarda contra a possível extinção de espécies na natureza.

Assim, três, das quatro espécies de micos-leões, *Leontopithecus chrysomelas*, o *Leontopithecus chrysopygus* e *Leontopithecus rosalia*, são atualmente mantidas em cativeiros

através de programas internacionais de manejo e reprodução, no entanto, seus programas diferem em termos de objetivos e contribuições para a conservação de cada espécie, pois leva em consideração o status de cada uma na natureza e o histórico da população *ex situ*.

1.1. Ecologia de *Leontopithecus chrysomelas*

Leontopithecus chrysomelas (Figura 1) são primatas de pequeno porte, endêmicos da Mata Atlântica (RYLANDS, 1993; DIETZ *et al.*, 1996; HOLST *et al.*, 2006; KIERULFF *et al.*, 2008). Estudos recentes têm mostrado que os sistemas agroflorestais de cacau (cabruças) também são habitats viáveis aos MLCD, por serem capazes de disponibilizar recursos alimentares preferenciais, além de sítios para dormir (PINTO E RYLANDS, 1997; RABOY & DIETZ, 2004b; OLIVEIRA *et al.*, 2010a; OLIVEIRA *et al.*, 2010b). Sua dieta é composta principalmente por frutos maduros e insetos, além de néctares, uma reduzida quantidade de pequenos vertebrados encontrados em bromélias, e mais raramente, por gomas; possuem braços longos e finos e dedos alongados que possibilitam a exploração de microhabitats na busca pelo alimento (RABOY & DIETZ, 2004a).

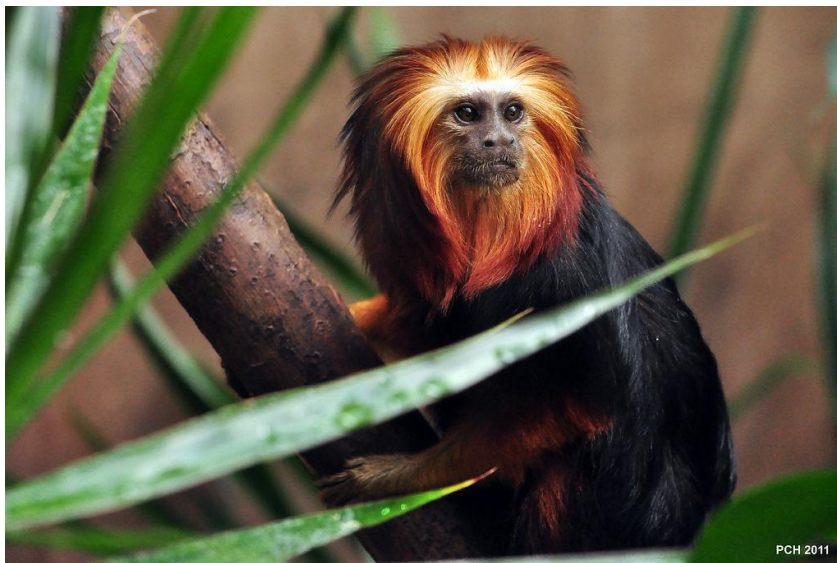


Figura 1 – *Leontopithecus chrysomelas* em meio cativo.
(Fonte: Ludwig & Galbusera, 2011).

São observados grupos sociais com uma média de cinco indivíduos em cabruças, mosaico de florestas e matas maduras, e até 12 membros em mosaicos de florestas, que variam em tamanho e composição (OLIVEIRA *et al.*, 2010b).

Sobre o sistema de acasalamento, as espécies de calitriquideos são na maioria das vezes consideradas monogâmicas – uma única fêmea reprodutiva por grupo, ou poliândricas – mais de

um macho tem a chance de ser o pai da prole; todos os membros do grupo cuidam da prole (BAKER *et al.*, 1993; DIETZ & BAKER, 1993; BAKER & DIETZ, 1996; BAKER *et al.*, 2002; BAKER *et al.*, 2008). A dispersão, segundo pesquisas de campo realizadas com o MLD, mostraram que entre os grupos ela geralmente é realizada por machos migrantes, que repõem os machos reprodutores pré-existentes ou raramente, em situações especiais, se unem ao macho residente (BAKER & DIETZ, 1996). Na ausência de oportunidades de reprodução, os machos subordinados também podem optar por permanecerem no grupo natal, pois esse comportamento oferece a eles maiores benefícios do que a dispersão (BAKER *et al.*, 1993; BAKER *et al.*, 2008). As filhas são subordinadas às suas mães e têm potencial reprodutivo inferior. Os sistemas monogínicos são preferíveis, porém, em habitats saturados com poucos recursos, as oportunidades de reprodução fora do grupo natal podem ser reduzidas.

Apesar de serem generalistas durante o dia, os micos-leões preferem florestas maduras ou cabruças para dormir (RABOY & DIETZ, 2004b). O tipo de vegetação e o nível de perturbação são variáveis significativas para primatas que se alimentam de folhas e frutos (ARROYO-RODRÍGUEZ & MANDUJANO, 2009) e, no caso dos micos, também são importantes por disponibilizar ocos para dormir (DIETZ *et al.*, 1997; RABOY & DIETZ, 2004b; GUIDORIZZI, 2008). Os MLCD são territorialistas e o tamanho médio de seu território varia de 22 há até 197 ha (OLIVEIRA *et al.*, 2010b).

1.2. Status de conservação do mico-leão-da-cara-dourada na natureza

Atualmente, apesar de *L. chrysomelas* estar sofrendo os efeitos negativos da fragmentação, como perda de seus habitats naturais e conversão dos sistemas agroflorestais de cacau (cabruças) em outras culturas agrícolas ou pastagens (PINTO & RYLANDS, 1997; HOLST *et al.*, 2006; KIERULFF *et al.*, 2008; RABOY *et al.* 2010), o mico-leão-da-cara-dourada ainda possui o melhor estado de conservação entre os micos-leões.

Sua estimativa populacional original se estendia do sul da Bahia e ao norte de Minas Gerais, entre o Rio Contas e Rio Jequitinhonha, sendo sua área de ocorrência estimada em 19.043 km² no estado baiano e de 418 km² no estado mineiro (Figura 2) (RYLANDS, 1993; PINTO, 1994; PINTO & RYLANDS, 1997; RYLANDS *et al.*, 2008; KIERULFF *et al.*, 2008). Pinto & Rylands (1997) sugerem que seu tamanho populacional está estimado entre 6.000 a 15.000 indivíduos, numa área de distribuição total de 19.462 km². Entretanto, pesquisas mais recentes de Raboy *et al.* (2010) e Zeigler *et al.* (2010) mostraram que o status de conservação da espécie tem se agravado, sugerindo que o seu tamanho populacional e suas áreas de ocorrência têm sido reduzidos desde a última estimativa feita entre 1991-1993 por Pinto & Rylands (1997),

Entre os anos de 1972 e 1974 Coimbra-Filho e Magnanini estabeleceram especificamente para a conservação e reprodução em cativeiro dos micos-leões, o Banco Biológico da Tijuca, financiado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), pelo Fundo Mundial para a Conservação da Natureza e pelo governo brasileiro, o que com o passar dos anos e o apoio de outras instituições (ex.: AZA, WAPT, SNZP, entre outras), ajudou as espécies de micos-leões – mico-leão-da-cara-dourada, dourado e preto – a obterem apoio e força para manter seus programas internacionais de reprodução em cativeiro (COIMBRA-FILHO E MITTERMEIER, 1977; COIMBRA-FILHO *et al.*, 1986; KLEIMAN & RYLANDS, 2008).

A primeira colônia registrada em cativeiro do Brasil para a manutenção do MLCD foi estabelecida em 1972 no Banco Biológico da Tijuca, e posteriormente transferida para o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro – CPRJ (COIMBRA-FILHO *et al.*, 1986). Devido a uma grande apreensão de exportações ilegais de *L. chrysomelas*, e posterior recuperação da maioria dos animais - transferidos para Instituições do país -, em 1985, foi formado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), um Comitê Internacional de Recuperação e Manejo (IRMC) para a espécie, seguindo as orientações desenvolvidas para o mico-leão-dourado, o qual se tinha mais conhecimento sobre o manejo e reprodução em meio cativo, e devido a esta apreensão e um manejo reprodutivo bem sucedido, a população cativa da espécie se expandiu rapidamente (BALLLOU, 1989; MALLISON, 1987). Além disso, outros animais continuaram sendo confiscados e adicionados à população nas décadas seguintes, aumentando o número de fundadores. O IRMC foi formalmente reconhecido no ano de 1990 como sendo o responsável (junto com o *studbook keeper*) pelo manejo das populações cativas da espécie (MALLISON, 1987).

Os MLCD possuem a base mais substancial de fundadores registrada em qualquer população de cativeiro – aproximadamente 96 fundadores (BALLLOU *et al.*, 1998). O *Studbook* mais recente da espécie registrou, até o ano de 2011, 573 indivíduos de *L. chrysomelas* vivos em cativeiros espalhados por 106 instituições da Europa, América do Norte, Ásia e do Brasil. No Brasil, a Fundação Parque Zoológico de São Paulo e o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro possuem as maiores populações *ex situ* de mico-leão-da-cara-dourada (LUDWIG E GALBUSERA, 2011).

Os *Studbooks* são livros genealógicos que reúnem todos os dados importantes de uma determinada espécie mantida em cativeiro (Figura 3). Os chamados *studbooks keepers*, são os responsáveis por compilar as informações de pedigree e manter o seu conteúdo constantemente atualizado, como por exemplo, a seção de atualização, onde qualquer nascimento, captura, transferência, morte e soltura deve ser mencionado. *Studbooks* contêm basicamente o número de

cada animal em particular, seu sexo e data de nascimento, a identidade (números de registro) de seus pais, local de nascimento e/ou onde e quando ele foi transferido para a instituição, informações de registro próprios da instituição e os seus identificadores (microchips, tatuagens). Por fim, há um glossário de localização, incluindo os nomes, endereços e informações de contato de todas as instituições que já tiveram ou ainda possuem a espécie (WASA, 2015).

Figura 2 – Registro genealógico de *L. chrysomelas*: exemplo do interior de um *Studbook*.

Stud#	Sex	Birth Date	Sire	Dam	Location	Date	LocalID	Event	Name	Transponder
1783	M	????	WILD	WILD	BRAZIL RENABRA RIO PRIM	~ 2000 ~ 2000 25 Sep 2000	NONE 1981	Capture Transfer Transfer		93503000005597
1784	M	4 Jul 1998	1514	1517	HORIZONTE	4 Jul 1998	MM0259	Birth	RUAN	00-01CA-2B44
1785	F	4 Jul 1998	1514	1517	HORIZONTE	4 Jul 1998 21 Sep 2008	MM0258	Birth Death	MIRNA	00-01CA-3A72
1786	F	26 Oct 2000	1638	1639	SAOBERNAR	26 Oct 2000 13 Mar 2001	3801	Birth Death		
1787	F	26 Oct 2000	1638	1639	SAOBERNAR	26 Oct 2000 13 Mar 2001	3802	Birth Death		

Stud# = número do registro do indivíduo; Sex = sexo; Birth Date = data de nascimento; Sire = pai; Dam = mãe; Location = instituição onde o indivíduo se encontra; Date = data de cada evento; Local ID = identificação do indivíduo dentro da instituição; Event = acontecimento; Name = apelido que o indivíduo recebe na instituição; Transponder = número do microchip; M = macho; F = fêmea; Wild = indivíduo oriundo da natureza.

FONTE: International Studbook Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) (Peter Galbusera)

Antigamente os *Studbooks* eram a única ferramenta usada para a gestão e manejo das populações *ex situ*, no entanto, mais recentemente, as informações obtidas através de marcadores moleculares em estudos com espécies cativas têm colaborado também nesta questão (IVY & LACY, 2010).

1.4. Microssatélites: Uma ferramenta para o conhecimento da diversidade genética

A Genética da Conservação se baseia em dados moleculares e na genética de populações para a investigação científica do status de conservação de espécies e/ou populações. Essa se torna uma ferramenta importante na determinação de “o que”, “onde” e “como” conservar a maior diversidade genética com o objetivo de manter o potencial evolutivo de uma espécie ou população e dos ambientes nos quais estes processos evolutivos ocorrem (SCHONEWALD-COX *et al.*, 1983; AVISE, 1994; FRANKHAM *et al.*, 2002; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2004). Assim, uma das principais preocupações da Genética da Conservação é a perda da diversidade genética, bem como os impactos deletérios do tamanho populacional pequeno e da fragmentação populacional nas espécies ameaçadas (CAUGHLEY & GUNN, 1996; FRANKHAM *et al.*, 2002).

Uma maneira de obtenção da diversidade genética é através de marcadores moleculares. Estes são fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos, grupos de indivíduos e espécies geneticamente distintas, ou seja, possuem o acesso à diversidade molecular (AVISE, 1994). Uma etapa importante em análises moleculares aplicadas à conservação é a escolha do marcador e sua adequação aos objetivos propostos. Atualmente, os marcadores moleculares do tipo microssatélites, são os mais adequados para se conhecer a composição genética de uma população. Os microssatélites consistem de segmentos de DNA com unidades repetitivas (1 a 6 pares de bases) organizadas lado a lado (BRUFORD & WAYNE, 1993). Essas regiões são detectadas através da amplificação, utilizando iniciadores (primers) específicos que se ligam às regiões conservadas de delimitação da sequência repetitiva (GOLDSTEIN & SCHLATTERER, 1999; SOLÉ-CAVA, 2001; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2004; AVISE, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Entre outras aplicações, eles são sendo usados para a determinação do tamanho efetivo e da estrutura genética de uma dada população, para a detecção de gargalos e deriva genética, identificação de populações fontes de espécies ameaçadas e para averiguar a ocorrência de fluxo genético (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Sua utilização, especialmente em estudos que envolvem primatas, vem sendo cada vez mais crescente (GRATIVOL *et al.*, 2001; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2005; GOOSSENS *et al.*, 2005; BERGL & VIGILANT, 2007; GALBUSERA & GILLEMOT, 2008; MENESCAL *et al.*, 2009; MILTON *et al.*, 2009; MARTINS & GALETTI JR, 2010).

Os locos microssatélites são polimórficos, com alelos codominantes e de herança Mendeliana, encontrando-se amplamente dispersos em genomas eucarióticos, podendo ocorrer também em genomas procarióticos sob baixas frequências (SCHLOTTERER, 1998). É comum ocorrer mutações nestes marcadores, decorrentes principalmente das alterações no número de repetições, causadas por erros de pareamento devido ao deslizamento das fitas no momento da replicação (TAUTZ, 1993). Estes erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o caráter altamente polimórfico destes locos. Os números de repetições, nível de polimorfismo, assim como o número de marcadores em si, são importantes para determinar a dinâmica do DNA microssatélite e a distância genética. A diversidade genética depende da taxa de mutação e essa, por sua vez, está correlacionada com a diversidade dentro dos microssatélites (GOLDSTEIN & SCHLATTERER, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Além disso, estes locos geralmente apresentam-se seletivamente neutros, obedecendo aos vários dos pressupostos usualmente utilizados em genética de populações. Por apresentarem alelos de tamanho pequeno, permitem a utilização de DNA altamente fragmentado ou em

pequenas quantidades, sendo que a maioria dos microssatélites encontra-se em simples cópia, facilitando a identificação dos alelos sem ambiguidade (SCHLOTTERER, 1998).

Até o momento, existe na literatura apenas um estudo a respeito da diversidade genética em MLCD de cativo, o qual Gallbusera e Gillemot (2008) desenvolveram marcadores moleculares do tipo microssatélites para a espécie. Além deste, há outro trabalho sendo desenvolvido por Moraes *et al.* (dados não publicados), reportando a diversidade genética e estruturação em populações de *L. chrysomelas* em vida-livre.

1.5. Correlação *fitness*-heterozigidade (HFC)

Estudos recentes, com marcadores neutros do tipo microssatélites, relatam uma correlação entre heterozigose e características relacionadas à aptidão do indivíduo - *fitness*, tais como: a sobrevivência (COULSON *et al.* 1998, 1999; ROSSITER *et al.*, 2001; MARKERT *et al.*, 2004; FONZO, DI *et al.*, 2011; VELANDO *et al.*, 2015), o sucesso reprodutivo (MARKERT *et al.*, 2004; SEDDON *et al.*, 2004), o comportamento reprodutivo (HOFFMAN *et al.*, 2007) a resistência a doenças (COLTMAN *et al.*, 1999), entre outros. A disponibilidade de marcadores moleculares altamente polimórficos, como microssatélites, fez a pesquisa sobre este assunto mais viável. A investigação realizada para saber se o *fitness* ou traços relacionados com a aptidão dos indivíduos estão correlacionados com o seu nível de heterozigose, é chamada de correlação *fitness*-heterozigidade (HFC).

Os primeiros estudos em HFC a utilizavam para inferir depressão endogâmica (usando como base a hipótese do efeito geral), correlacionando heterozigidade individual com o coeficiente de endogamia (F), no entanto, vários estudos demonstraram que esta correlação geralmente é fraca. Duas outras hipóteses foram criadas para as HFCs: a primeira é a hipótese do efeito direto, onde prevê que os marcadores utilizados no estudo possuem efeito direto na aptidão e exibem sobredominância (maior heterozigidade = maior aptidão); e a segunda: hipótese do efeito local - presume que os marcadores estão em ligação física com locos sobredominantes ou dominantes que influenciam no *fitness* (HANSSON & WESTERBERG, 2002).

A HFC utiliza a média de heterozigidade individual em um painel de marcadores neutros como medida de diversidade genética. Várias estimativas para medir a heterozigidade individual foram criadas no decorrer dos anos e até o momento existem cinco. As estimativas diferem entre si dependendo dos dados que se pretende analisar e são elas:

- PHt (proporção de locos heterozigotos em um indivíduo): Esta estimativa tem a vantagem de ser muito simples, mas pode ser inadequada quando o número de marcadores

utilizados é pequena, quando os locos diferem em número e frequência de alelos ou quando os genótipos de um indivíduo não são “digitados” em todos os locos (APARICIO et al., 2006);

- Hs_exp (heterozigose padronizada baseada na heterozigosidade média esperada): A padronização faz esta estimativa insensível ao fato de que os indivíduos incluídos na amostra não podem ser todos genotipados no mesmo loco. No entanto, assume uma relação linear entre heterozigosidade num determinado loco e seu número de alelos, podendo subestimar o efeito dos locos mais polimórficos (APARICIO *et al.*, 2006);

- Hs_obs (heterozigose padronizada baseada na heterozigosidade média observada): estimativa altamente conservadora e possui melhor desempenho do que Hs_exp em casos de dados que exibem alelos nulos ou alelo *dropout* (AMOS, 2005);

- IR (parentesco interno): Esta estimativa permite que o compartilhamento de alelos raros conte mais do que os alelos mais comuns (APARICIO et al. 2006) e;

- HL (homozigose por loco): Este estimador foi criado para resolver alguns dos problemas de IR. Leva em conta o fato de que alguns locos são mais informativos do que outros. HL considera a contribuição de cada loco em vez de a contribuição de cada alelo, dado aos locos mais informativos maior peso (APARICIO *et al.*, 2006).

Até o momento, não existem trabalhos com espécies de primatas não humanos que tenham investigado possíveis correlações entre fitness e heterozigosidade.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente as populações *ex situ* de mico-leão-da-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, utilizando marcadores do tipo microssatélites, com a finalidade de subsidiar futuros programas de manejo e reintrodução, já que estes animais podem representar uma apólice de seguro para a espécie. Além de verificar os níveis de heterozigosidade individual em *Leontopithecus chrysomelas* e investigar possíveis correlações entre *fitness*-heterozigosidade.

2.1. Objetivos específicos

- Conhecer a diversidade genética de populações cativas de *Leontopithecus chrysomelas*;
- Estimar o coeficiente de endogamia de heredograma (F), bem como averiguar as relações de parentesco através de um heredograma em indivíduos da população *ex situ* do mico-leão-da-cara-dourada;
- Comparar a diversidade genética encontrada nas populações *ex situ* com dados das populações *in situ* de MLCD reportados na literatura;
- Inferir sobre a relevância da diversidade genética da população em cativeiro para a conservação da espécie;
- Calcular heterozigosidade individual nos animais de populações cativas de MLCD;
- Correlacionar a contribuição individual para o crescimento populacional (Pt), como medida de *fitness* com a heterozigosidade individual verificada nas populações de cativeiro do MLCD.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População e Localidades *Ex situ*

Este estudo foi realizado com as populações *ex situ* de *Leontopithecus chrysomelas* do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) e da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Localizado em uma área de 825 m² de Mata Atlântica, a FPZSP é o maior Zoológico do Brasil e se encontra ao sul da cidade de São Paulo, alojando em seu território o riacho do Ipiranga (FPZSP, 2012). Já o CPRJ dista cerca de 100 quilômetros do Centro da Cidade do Rio de Janeiro e ocupa uma área aproximada de 265 hectares, em contrafortes da serra dos Órgãos, localizado no município de Guapimirim, entre Magé e Cachoeiras de Macacu.

3.2. Obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de sangue e pelo de 55 indivíduos da população de *L. chrysomelas* que reside no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e 49 amostras de pelo de indivíduos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, no ano de 2013. Para as amostras de sangue foram coletados 200 uL com seringas de 3 ml e agulhas de 13x4, 5 mm, através de punção venosa no fêmur (Figura 4). Depois de coletadas as amostras foram transferidas para tubos *ependorfs* com EDTA, devidamente rotulados com as informações do animal e colocados em uma caixa isotérmica para transporte. Já os pelos, juntamente com o bulbo, que é a parte onde se localiza o tecido vivo com DNA, foram arrancados do dorso de cada indivíduo e armazenados em envelope de plástico individualizados e rotulados. As amostras foram coletadas por funcionários devidamente preparados para os procedimentos de contenção e retirada de sangue e pelo destes animais (Figura 3). Depois de coletadas, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).



Figura 3 – Coleta de sangue de *L. Chrysomelas* realizada por Alcides Pissinati, no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro. (Foto: Gisele Orefice)

3.3. Extração do DNA

3.3.1. Amostras de sangue

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada com tampão salino seguindo o protocolo de Aljanabi e Martinez (1997), com modificações, ficando da seguinte maneira: para cada extração foram utilizados 100 μL de sangue, o qual foi centrifugado por 10 minutos, sendo usado para os outros procedimentos apenas o “pellet”. A lise celular foi feita com tampão salino (NaCl 0,4 mM; TRIS-HCl 10mM pH = 8 e EDTA pH = 8 a 0,2 mM), foi adicionado também 30 μL de SDS 20%, seguida de digestão enzimática por 8 μL de proteinase k (0,1mg/mL) e incubado a 55-65° C *overnight*. Depois de centrifugar, foi adicionado sal (NaCl 5M), ao sobrenadante obtido e o DNA foi precipitado pela adição de etanol gelado 100%. Houve mais duas centrifugações com a adição de etanol e o descarte do sobrenadante a fim de purificar as amostras. Por último, o DNA obtido foi secado em uma estufa e diluído com 50 μL de tampão TE, ao qual mantém sua integridade. Após ser feita uma estimativa da concentração em espectrofotômetro e uma verificação de sua qualidade em gel de agarose 1%, o DNA extraído foi novamente diluído em TE, com uma concentração final de 20 ng/ μL , e estocado em freezer a -20° C.

3.3.2. Amostras de pelo

Para a extração de DNA das amostras de pelo foram utilizadas as orientações contidas no protocolo de fenol-clorofórmio de Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações. Assim, foram utilizados, aproximadamente, vinte pelos de cada indivíduo por extração. O procedimento de extração envolveu basicamente a lise das células com tampão de extração (25 μL de SDS al 10%, 5 μL de RNase 0,1 mg/mL, 100 μL de EDTA 0,1M, 2,5 μL de Tris-HCl

0.01 M e 322,5 μ L de água ultra pura (mili-Q)), seguida de digestão enzimática por 30 μ L de proteinase k (0,1mg/mL) incubado por no mínimo 5 horas ou de um dia para o outro, a 56° C. Em seguida, foi adicionado fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, seguido de uma suave agitação por 10 minutos e posterior centrifugação. Ao sobrenadante obtido foi adicionado sal (NaCl 5M) e o DNA foi precipitado pela adição de etanol gelado 100%. Depois houve mais duas centrifugações com a adição de etanol e o descarte do sobrenadante com a finalidade de purificar as amostras. Por fim, o DNA obtido foi secado em uma estufa e passou por diluição com 30 μ L de tampão TE, ao qual mantém sua integridade. Após ser feita uma estimativa da concentração em espectrofotômetro e uma verificação de sua qualidade em gel de agarose 1%, o DNA extraído foi estocado em freezer a -20° C, porém, como a quantidade de DNA obtido das amostras de pelo foi muito baixa, não foi possível realizar a sua quantificação em espectrofotômetro.

3.4. Amplificação dos locos de microssátélites e genotipagem

Dezesseis locos microssátélites foram amplificados utilizando sete *primers* específicos para *Leontopithecus chrysomelas* (GALBUSERA & GILLEMOT, 2008) e nove *primers* heterólogos, específicos para *Leontopithecus chrysopygus* ((PÉREZ *et al.*, 2005) (Tabela 1). Estes *primers* continham uma cauda universal formada por 18 pares de bases a mais na posição 5', permitindo a utilização da metodologia proposta por Schuelke (2000), na qual, em ciclos subsequentes da PCR, um *primer* universal M13 complementar a esta cauda universal e marcado com fluoróforo é incorporado ao produto de PCR. Foram utilizados quatro fluoróforos distintos (FAM, VIC, NED e PET), com a finalidade de ajudar na posterior identificação dos alelos.

Reações com volume final de 10 μ L foram preparadas para as amplificações. Cada uma contendo 5 μ L de GoTaq® PROMEGA (mix preparado contendo quantidades específicas de cloreto de magnésio, Taq e DNTP's), 0.5 μ L de cada primer específico e do primer universal M13, 0.2 μ L BSA (10mg/ml), 0,15 de cloreto de magnésio (50mn/ μ L), 1 μ L de DNA extraído de amostras de sangue e 2 μ L de DNA extraído de amostras de pelo, e finalmente, 2,15 ou 1,15 μ L de água mili-Q. As PCRs foram realizadas em termociclador ® Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), utilizando-se um ciclo inicial de desnaturação a 94° C por 5 minutos, para a desnaturação, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C e um gradiente de temperatura de alinhamento (Tabela 1), específico para cada loco, durante 45 segundos a 72° C. Foram adicionados mais 8 ciclos assim distribuídos: 30s a 94° C, 45s a 53° C (temperatura de alinhamento do marcador M13), 45° a 72° C e finalmente uma etapa de extensão a 72° por 10 minutos.

Tabela 1. Locos microssatélites que amplificaram com sucesso. Apresenta-se, para cada loco: o nome do *primer*, as suas sequências (Forward: F e Reverse: R), a fluorescência e a temperatura de alinhamento (T° C) utilizada neste estudo. *Lchu*- específicos para *L. chrysomelas*; Leon- específicos para *L. chrysopygus*.

Loco	Sequência dos primers (5'-3')	Fluróforo	T°C
<i>Lchu01</i>	F: GCTCAGGTGTTATTTATGTCCAAA R: GTTTCTTGCAACTATCTTGCATGTTCTGC	PET	58°C
<i>Lchu03</i>	F: AAGGCATGATGTATCTTGTCTCA R: GTTTCTTATCTTTCTGTATGTGTCTCCCTGTCT	FAM	58°C
<i>Lchu04</i>	F: TGACCAAAGAAAATGCAAAA R: GTTTCTTGACAGGGTATTTAGCAGGA	VIC	55°C
<i>Lchu05</i>	F: TGATGCTAAAACAGAAGCATTT R: GTTTCTTGTCTGTATGTTACAAAACCT	NED	55°C
<i>Lchu06</i>	F: GCCTTAATTAGCACCAGAACC R: GTTTCTTACCCTCCAAGCCTTCAGTA	PET	55°C
<i>Lchu08</i>	F: CACGGCAATGTGGGAATAA R: GTTTCTTTTCAGTAGTTGGGACTGGGATAA	NED	58°C
<i>Lchu09</i>	F: TTCATTGTAGCATTGTTGGTCAT R: GTTTCTTTTGCCTCCTCATAGTTCCTCAT	VIC	58°C
Leon35c42	F: GTGGAAAGGTTTCAGAATATC R: TGCAGTTGTCCACACTTTA	PET	60°C
Leon30c73	F: GGACCTGATTGAAGCAGTC R: TTCCCTGAGAATCTAATGGAG	NED	60°C
Leon11c72	F: AGGATTACAGGTGCCAC R: TTGCATATTGTGTTCAACTTC	VIC	60°C
Leon3c20	F: CTGTATGTGATCGTTTTACCTG R: AAGGCAATCTAACTAATCAACTC	FAM	60°C
Leon21c75	F: CAGTTGAGGGAACAGGAATTA R: CACTGCACTGACAGAGCAAG	PET	60°C
Leon27c13	F: AAGCGCAGATTTATTGATAGG R: TGCAGGTAAATGATGGTAATG	VIC	60°C
Leon31c97	F: TGGTCCAGAGAAATGATGTC R: GTAATTCCTTGGATTTATGCC	NED	58°C
Leon2	F: CTGCTTCTTGTCCACTTCTTCTC R: GTTTGGGTGGTTGCCAAG	FAM	56°C
Leon15c85	F: CTGATCCTTGAAGCAGCATTG R: GGTAAAGGGTTCGTTCTGTG	VIC	60°C

Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 1%. Os fragmentos amplificados foram genotipados. Os eletroferogramas resultantes da genotipagem foram analisados mediante o programa *Geneious* (KEARSE *et al.*, 2012) e, para se estimar o tamanho molecular correspondente aos alelos de cada indivíduo, foram levados em conta os tamanhos indicados no programa e em dados já descritos na literatura. Os genótipos recolhidos do programa foram transcritos para planilhas no *Excel*, que serviram de base para à formatação dos arquivos de entrada para os diferentes programas usados nas demais análises.

3.5. Análise dos dados

3.5.1. Diversidade genética

Antes das análises de diversidade genética, o software Micro-Checker (VANOOSTERHOUT *et al.*, 2004) foi utilizado com a finalidade de examinar a existência de erros na determinação dos genótipos durante as análises dos eletroferogramas, assim como a amplificação de alelos *dropout* (alelo-preferencial) e a ocorrência de alelos nulos (falta de amplificação de um dos alelos dos indivíduos diploides).

Valores de F_{st} (WRIGHT, 1978) foram obtidos como medida de divergência genética entre as populações cativas estudadas neste trabalho, através do programa GenAlex 6.4.1 (PEAKALL & SMOUSE 2006). Os resultados foram gerados usando a interpolação dos dados nulos ou ausentes, com nível de significância de 0.05 e 10.000 permutações. Também foi feita uma Análise de Correspondência Fatorial (AFC), para obtenção de um gráfico inferindo o grau de separação, ou não, dos grupos, através do programa Genetix 4.02 (BELKHIR *et al.* 2001).

Posteriormente, foi analisada a diversidade genética para cada grupo genético encontrado. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), o qual determina o quão informativo os locos são para as análises de diversidade, foi estimado através do programa computacional Cervus 3.0.3 (KALINOWSKI *et al.* 2007). Foram estimados o número de alelos por loco (N_a), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), usando o programa GenAlex 6.4.1 (PEAKALL & SMOUSE, 2006), e a riqueza alélica (R_a) usando o programa FSTAT (GOUDET, 2001). Os desvios entre as proporções genotípicas esperadas e observadas segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados no programa Genepop (ROUSSET, 2008). O coeficiente de endogamia (F_{is}), bem como os valores de P (p-valor) maior e menor que os esperados, foram calculados no programa FSTAT (GOUDET 2001). Correções para testes múltiplos foram feitas seguindo o procedimento de Bonferroni (RICE, 1989). Riqueza alélica foi calculada também com o auxílio do programa computacional HP-rare (KALINOWSKI *et al.*, 2005).

3.5.2. Análise do studbook e do Coeficiente de Endogamia de Heredograma (F)

A análise do pedigree dos mico-leões-da-cara-dourada foi realizada com o auxílio do pacote Pedigree (COSTER, 2012) da plataforma estatística R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015), o qual utiliza os seguintes argumentos:

- ID: Identificação de cada indivíduo presente no Studbook.
- SIRE: Identificação do pai de cada indivíduo.
- DAM: Identificação da mãe de cada indivíduo.

Através deles calcula o valor do coeficiente de endogamia de heredograma (F) para todos os indivíduos. Todos os animais registrados no *Studbook*, desde o primeiro exemplar introduzido em cativeiro até o último nascido no ano de 2011, foram utilizados no cálculo. Além do F, este pacote também calcula o número de gerações existentes desde o início do programa de reprodução em cativeiro. As informações necessárias para estas análises foram retiradas da versão mais recente do *Studbook* Internacional do Mico-leão-da-Cara-Dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) (LUDWIG E GALBUSERA, 2011).

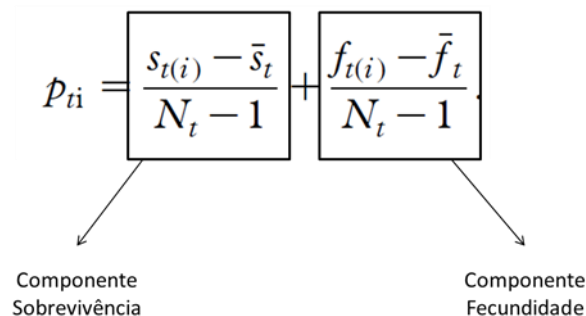
O pacote Kinship2 (THERNEAU et al. 2014), também da plataforma R, foi usado para a construção de um heredograma com os indivíduos amostrados nesse estudo e registrados no *Studbook*. Para isso, foram utilizados os argumentos:

- id: identificação de cada indivíduo presente no *Studbook*.
- father: Identificação do pai de cada indivíduo.
- mother: Identificação da mãe de cada indivíduo.
- sex: sexo de cada indivíduo.

Para a geração deste heredograma foram utilizados apenas os MLCD amostrados neste estudo e os seus antepassados (pais, avós, bisavós, etc) até chegar ao fundador dos grupos cativos estudados, o qual não se sabe a descendência em vida-livre.

3.5.3. Heterozigosidade individual e Correlação Fitness-Heterozigosidade (HFC)

Neste trabalho, utilizou-se como medida de *fitness*, a contribuição individual para o crescimento populacional (P_t), em um determinado intervalo de tempo. A P_t foi estimada através da soma do “componente sobrevivência” com o “componente fecundidade” de cada indivíduo, de acordo com a seguinte Equação 1:

$$P_{ti} = \frac{s_{t(i)} - \bar{s}_t}{N_t - 1} + \frac{f_{t(i)} - \bar{f}_t}{N_t - 1}$$


Componente Sobrevivência Componente Fecundidade

Onde $S_{t(i)}$ e $F_{t(i)}$ são, respectivamente, sobrevivência e nascimento de indivíduos (i) na população, em um determinado tempo (t); e S_t e F_t define a média de sobrevivência e

nascimentos de todos os indivíduos da população no tempo t (PELLETIER et al. 2007 apud FONZO, DI *et al.* 2011). Os dados para o cálculo do P_t foram retirados do *Studbook* mais recente do MLCD (LUDWIG E GALBUSERA, 2011) e foram analisados para os anos de 2002 a 2011, variando o número de indivíduos entre 43 a 52 para o CPRJ e entre 21 a 62 para o FPZSP (Tabela 6). Foram utilizadas as informações de todos os animais que viveram ou/e vivem na Fundação Parque Zoológico de São Paulo e no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro entre os anos de 2002 a 2011. Os dados da contribuição individual para o crescimento populacional (P_t) foram analisados para os anos de 2002 a 2011, variando o número de indivíduos entre 43 a 52 para o CPRJ e entre 21 a 62 para o FPZSP (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médio de P_t de acordo com os anos. N = número de indivíduos usados para o cálculo da P_t .

		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
CPRJ	N	52	47	47	43	46	46	44	44	43	43
	Pt medio	-6,54E-18	-6,35E-18	7,53E-18	7,75E-18	-5,73E-18	5,58E-18	-1,21E-17	1,88E-17	1,65E-17	-1,94E-18
FPZSP	N	62	53	55	26	21	24	32	37	44	50
	Pt medio	4,48E-19	4,32E-18	8,58E-18	-8,01E-18	0,00E+00	1,68E-17	-1,30E-18	6,94E-18	7,55E-05	0,00E+00

Antes do cálculo das heterozigosidades individuais, foi realizado o teste de Spearman, para verificar se a heterozigosidade é estatisticamente independente entre os locos. A variável heterozigosidade/homozigosidade foi analisada como uma variável binária para todos os locos em cada um dos indivíduos genotipados. Os locos não independentes foram eliminados das outras análises.

Para o cálculo das cinco heterozigosidades, PHt (proporção de locos heterozigotos em um indivíduo), Hs_exp (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média esperada), Hs_obs (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média observada), IR (parentesco interno) e HL (homozigose por loco), foi utilizada a função GenHet (COULON, 2010) na plataforma estatística R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015), a qual utiliza os argumentos:

- dat: objeto que contém os genótipos dos indivíduos.
- estimfreq: variável binária que permite ou impossibilita o cálculo das frequências alélicas.
- locname: vetor que contém o nome dos diferentes microsatélites.
- alfuser: vetor que contém as frequências alélicas.

Com a finalidade de conferir se havia diferença significativa nos valores de Pt entre fêmeas e machos utilizou-se o teste de Wilcoxon. Caso fosse encontrada diferença significativa, as análises seriam realizadas separando os sexos, pois o sexo estaria influenciando de forma diferente o *fitness*. Foram feitas regressões lineais e polinomiais para testar a possível Correlação *Fitness*-Heterozigidade utilizando os valores de heterozigidade individual e de Pt. Adicionalmente foi verificado o efeito da idade e de cada ano sobre os valores de Pt através de regressões lineares e polinomiais e do teste de *Kruskal-Wallis*, respectivamente.

Para testar se junto com a heterozigidade o ano e idade afetam o valor de Pt, foi realizada uma regressão múltipla. A heterozigidade individual escolhida para testar o melhor modelo de regressão múltipla foi a HL (homozigose padronizada por loco), pois ela parece ser mais adequada em relação as demais medidas, pois leva em consideração as diferenças nas frequências alélicas. HL é uma medida de homozigose, assim, os valores mais baixos correspondem a uma maior heterozigidade. A escolha do melhor modelo de regressão múltipla foi realizada usando a *Bidirectional Stepwise Regression Process*. Com a finalidade de determinar qual dos componentes do Pt era melhor explicado pelas variáveis estudadas, foram analisados separadamente cada um deles (Equação 1).

Todas as análises estatísticas citadas acima foram efetuadas através da plataforma R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

4. RESULTADOS

4.1. Estrutura e diversidade genética

Foi detectada a presença de alelos nulos nos locos Leon30c73 e Leon15c85 no conjunto de dados do CPRJ e no loco *Lchu1* da FPZSP. Esses locos não foram removidos das análises, pois não influenciaram nos valores do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, nem nos valores médios das demais medidas de diversidade genética.

Valores de F_{st} entre 0.05-0.15; 0.15-0.25 e acima de 0.25 significam, respectivamente, que há uma baixa, moderada e alta diferenciação (WRIGHT, 1978). O valor encontrado para o F_{st} foi significativo ($F_{st}=0.27$), mostrando uma alta diferenciação entre as populações *ex situ* de *L. chrysomelas* do CPRJ e a da FPZSP, portanto as posteriores análises foram realizadas separando os dois grupos cativos. Através da Análise de Correspondência Fatorial foi possível obter um gráfico (Figura 5), o qual corrobora com o resultado obtido de F_{st} , mostrando uma separação entre as duas populações.

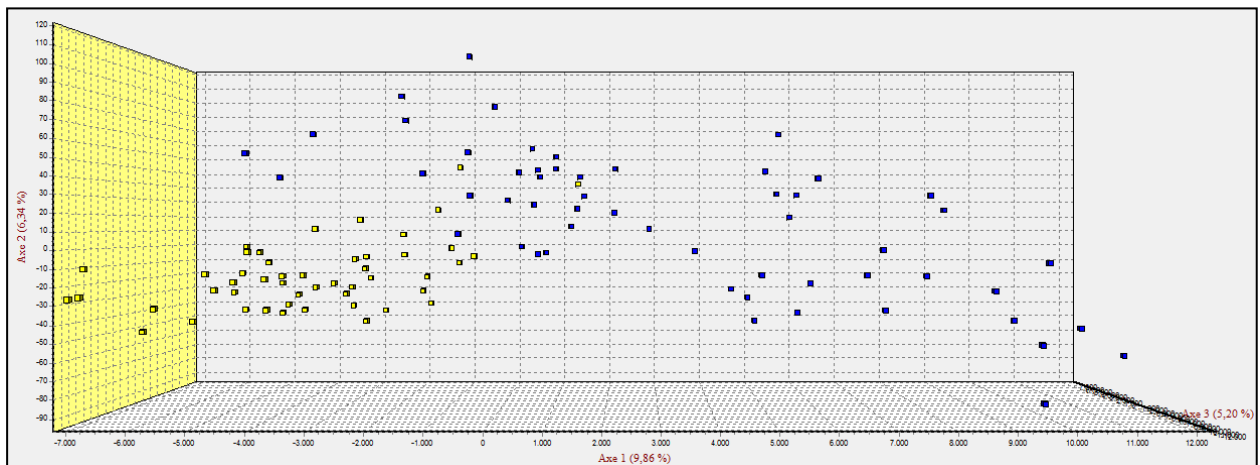


Figura 4 - Análise de Correspondência Fatorial mostrando a presença de dois grupos: população da FPZSP (pontos amarelos) e população do CPRJ (pontos azuis).

De acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0.5 são considerados muito informativos, valores entre 0.25 e 0.50 razoavelmente informativos e inferiores a 0.25 pouco informativos. Foram encontrados valores de PIC superiores a 0.25 na maioria dos locos analisados, sendo que o valor médio de PIC (Tabela 3) indicou que os locos testados foram altamente informativos, com exceção do marcador Leon31c97 que se mostrou pouco informativo com um valor de PIC igual a 0.175 na FPZSP.

Tabela 3 - Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) para dezesseis locos microssatélites.

<i>Locus</i>	PIC FPZSP	PIC CPRJ
<i>Lchu01</i>	0.572	0.525
<i>Lchu03</i>	0.793	0.724
<i>Lchu04</i>	0.420	0.399
<i>Lchu05</i>	0.740	0.701
<i>Lchu09</i>	0.287	0.689
<i>Lchu08</i>	0.740	0.634
<i>Lchu06</i>	0.445	0.645
Leon35c42	0.427	0.657
Leon30c73	0.399	0.672
Leon11c72	0.579	0.567
Leon3c20	0.631	0.640
Leon21c75	0.305	0.472
Leon27c13	0.580	0.486
Leon31c97	0.175	0.747
Leon2	0.550	0.738
Leon15c85	0.352	0.820
MÉDIA	0.500	0.632

Nas duas populações, todos os locos amplificados foram polimórficos. No CPRJ, o número de alelos variou de 3 a 7, a riqueza alélica média foi de 4.99 e a heterozigosidade média observada e esperada foram de $H_o = 0.668$ e $H_e = 0.650$. Já na FPZSP o número de alelos variou de 2 a 7, a riqueza alélica média foi 4.49 e heterozigosidade média observada e esperada com valores de 0.575 e 0.550, respectivamente. Houve evidência de desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg (mesmo depois da correção sequencial de Bonferroni), no loco Leon11c72 nas duas populações avaliadas, e na da FPZSP, além deste, também foi encontrado desvio no loco Leon27c13 que pode ser explicado pelo excesso de heterozigotos verificados nesses locos. Em nenhum dos locos foi encontrado valores significativos do coeficiente de endocruzamento (Fis). O Fis médio foi de -0.021 e -0.038, no CPRJ e na FPZSP, respectivamente, indicando um sistema de exogamia (fuga da endogamia).

Todos os valores de diversidade genética para a população *ex situ* de mico-leão-da-cara-dourada do CPRJ são apresentados na tabela 4 e os da FPZSP na tabela 5.

Tabela 4 – Características dos locos de microssatélites e diversidade genética em *L. chrysomelas* do CPRJ.

<i>Locus</i>	PB	N	Na	Ra	Ho	He	P_{EHW}	F_{IS}	PLarger	P_{Smaller}
<i>Lchu1</i>	210-218	52	3.000	3.000	0.615	0.594	0.4902	-0.027	0.6438	0.4781
<i>Lchu3</i>	316-340	52	6.000	5.994	0.827	0.761	0.2899	-0.076	0.8844	0.2250
<i>Lchu4</i>	396-416	52	6.000	5.579	0.519	0.447	0.1284	-0.152	0.9535	0.1000
<i>Lchu5</i>	264-298	51	6.000	5.824	0.706	0.743	0.2822	0.060	0.2406	0.8313
<i>Lchu9</i>	418-428	52	6.000	5.772	0.846	0.735	0.1186	-0.141	0.9719	0.0531
<i>Lchu8</i>	226-240	53	7.000	6.998	0.660	0.660	-	-0.008	0.4844	0.6594
<i>Lchu6</i>	180-192	53	6.000	5.792	0.623	0.684	0.1059	0.100	0.1313	0.9344
Leon35c42	245-247	54	6.000	5.990	0.593	0.701	0.2538	0.164	0.0063	1.0000
Leon30c73	258-274	55	6.000	5.997	0.582	0.706	0.0473	0.185	0.0219	0.9938
Leon11c72	308-324	55	4.000	4.000	0.982	0.631	0.0000*	-0.550	1.0000	0.0031
Leon3c20	300-314	55	6.000	5.988	0.709	0.674	0.5266	-0.043	0.7656	0.3438
Leon21c75	298-304	55	4.000	3.987	0.527	0.567	0.0663	0.080	0.2750	0.7938
Leon27c13	212-216	55	3.000	3.000	0.600	0.555	0.2559	-0.072	0.7906	0.3281
Leon31c97	316-322	54	4.000	4.000	0.611	0.675	0.4217	0.104	0.1250	0.9281
Leon2	218-224	42	4.000	4.000	0.810	0.687	0.4453	-0.167	0.9688	0.0781
Leon15c85	292-302	53	4.000	4.000	0.472	0.584	0.0572	0.202	0.0313	0.9875
Média			5.063	4.995	0.668	0.650		-0.021		

PB= pares de bases; N= tamanho amostral; Na= número de alelos; Ra= Riqueza alélica; Ho= Heterozigosidade Observada; He= Heterozigosidade Esperada; P_{EHW}= P-valor para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção Sequencial de Bonferroni ($0,0045 < \alpha > 0,05$); Fis= Coeficiente de Endocruzamento; pLarger e pSmaller= P-valor para o coeficiente de endocruzamento. (*) valores de *p* significativo.

Tabela 5 - Características dos locos de microssatélites e diversidade genética em *L. chrysomelas* da FPZSP.

<i>Locus</i>	pb	N	Na	Ra	Ho	He	P_{EHW}	F_{IS}	PLarger	P_{Smaller}
<i>Lchu1</i>	210-218	47	3.000	3.000	0.468	0.645	0.0041	0.285	0.0094	0.9969
<i>Lchu3</i>	316-340	46	6.000	6.000	0.804	0.818	0.5140	0.029	0.3969	0.7625
<i>Lchu4</i>	396-416	46	6.000	5.797	0.413	0.446	0.4216	0.085	0.2344	0.8781
<i>Lchu5</i>	264-298	46	6.000	6.000	0.696	0.771	0.0105	0.109	0.1125	0.9438
<i>Lchu9</i>	420-426	47	4.000	3.999	0.319	0.301	0.4954	-0.049	0.7688	0.4969
<i>Lchu8</i>	224-238	38	7.000	7.000	0.789	0.775	0.7879	-0.005	0.5781	0.5594
<i>Lchu6</i>	180-190	49	4.000	3.773	0.429	0.548	0.1050	0.228	0.0313	0.9844
Leon35c42	245-257	39	7.000	6.948	0.487	0.447	0.2827	-0.076	0.8813	0.2938
Leon30c73	258-274	45	5.000	4.821	0.489	0.447	0.2457	-0.082	0.8438	0.2875
Leon11c72	308-324	45	4.000	4.000	0.889	0.624	0.0000*	-0.415	1.0000	0.0031
Leon3c20	300-314	46	5.000	4.999	0.761	0.683	0.0718	-0.104	0.9219	0.1594
Leon21c75	298-302	47	3.000	2.809	0.447	0.363	0.0594	-0.220	0.9531	0.0688
Leon27c13	210-214	48	3.000	3.000	0.875	0.654	0.0001*	-0.328	1.0000	0.0031
Leon31c97	320-322	46	2.000	2.000	0.174	0.194	0.4165	0.113	0.4094	0.9375
Leon2	218-224	45	6.000	5.838	0.578	0.620	0.0342	0.079	0.2469	0.8375
Leon15c85	292-294	47	2.000	2.000	0.574	0.456	0.0805	-0.251	0.9844	0.0844
Média			4.563	4.499	0.575	0.550		-0.038		

PB= pares de bases; N= tamanho amostral; Na= número de alelos; Ra= Riqueza alélica; Ho= Heterozigosidade Observada; He= Heterozigosidade Esperada; P_{EHW}= P-valor para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção Sequencial de Bonferroni ($0,0045 < \alpha > 0,05$); Fis= Coeficiente de Endocruzamento; pLarger e pSmaller= P-valor para o coeficiente de endocruzamento. (*) valores de *p* significativo.

4.2. Análise do *Studbook* e do Coeficiente de Endogamia de Heredograma (F)

O pacote *pedigree* (COSTER, 2012) usou as informações contidas no mais atual *Studbook* dos MLCD (GALBUSERA, 2011) registrados até o ano de 2011, totalizando um número de 2703 animais. A partir dessa informação, foi possível reconstruir todo o histórico de acasalamentos entre os indivíduos até chegar aos primeiros micos-leões-da-cara-dourada responsáveis em fundar a população *ex situ* da espécie. Os resultados mostram que desde a primeira colônia estabelecida em cativeiro, em 1972, até os dias atuais, existiram nove gerações de MLCD, com 351 fundadores (entende-se por fundador, indivíduos que foram capturados da vida-livre, e que se presume não serem aparentados, representando toda a diversidade genética da população).

Os valores do coeficiente de endogamia de heredograma (F) para as duas primeiras gerações foram iguais a zero. Como citado anteriormente, é levado em consideração que os fundadores não são aparentados, então se assume sempre zero para as primeiras gerações. A partir da terceira geração observou-se uma flutuação no valor desse coeficiente. Aumentou da geração II em diante, porém foi na geração VI que o aumento foi consideravelmente maior, com um valor médio de $F = 0,106$, passando a diminuir novamente nas duas gerações posteriores. (Tabela 6).

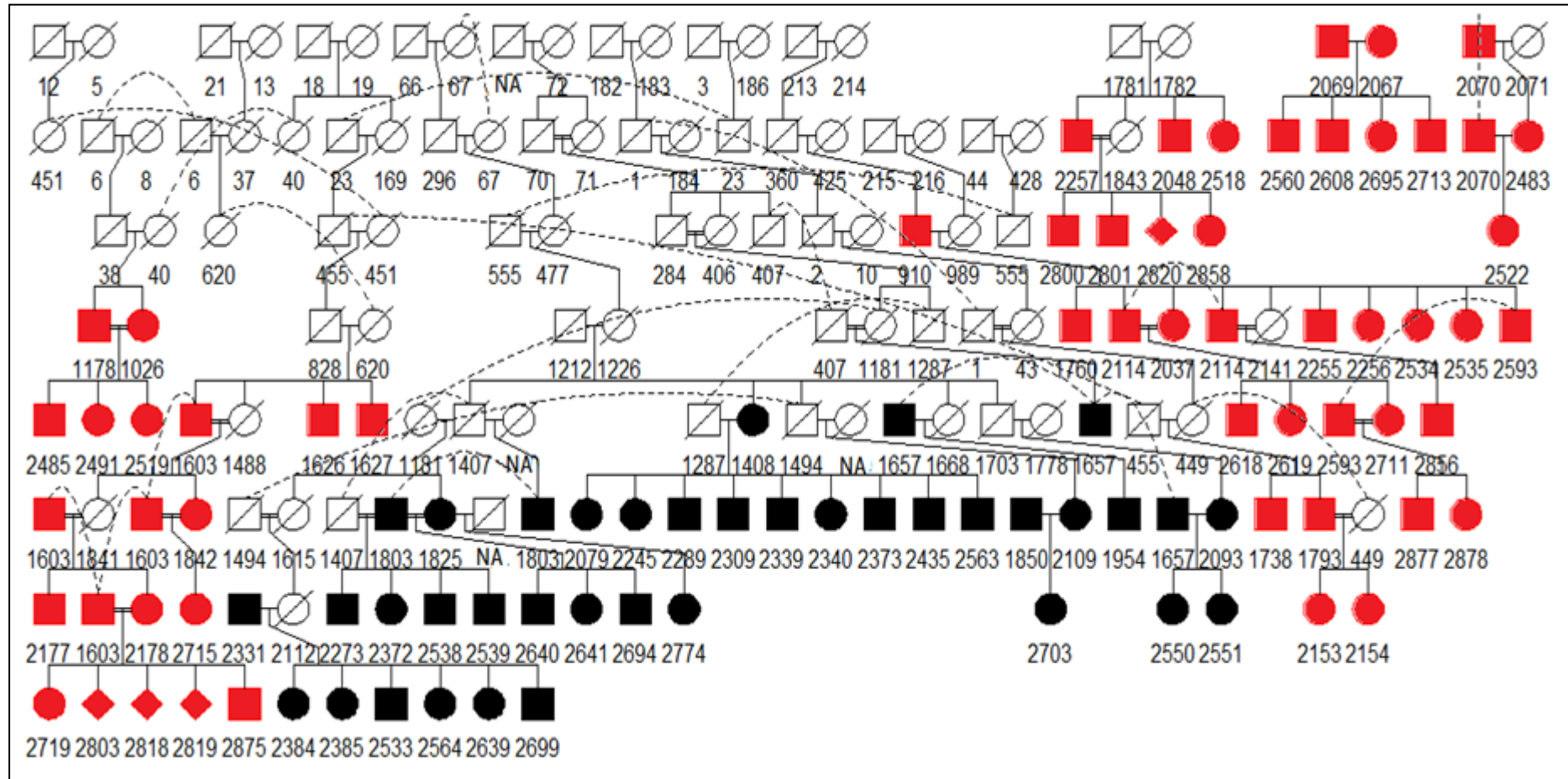
Tabela 6 – Número de indivíduos e Coeficiente de endogamia de heredograma (F) médio, por gerações. *valor do indivíduo.

Geração	Número de indivíduos	F médio
0	351	0
I	503	0
II	457	0,027
III	432	0,035
IV	395	0,030
V	397	0,030
VI	131	0,106
VII	36	0,072
VIII	1	0,031*

Por fim, com heredograma gerado no pacote *kinship2* (THERNEAU *et al.* 2014), através das relações de parentesco entre os indivíduos amostrados neste estudo, é possível verificar a separação de três grupos pequenos familiares mais atuais no CPRJ, com dois deles possuindo fundadores ainda vivos (2069-2067 e 2070-2071, o último indivíduo falecido), e mais

dois grupos maiores, com 12 ancestrais no total (Figura6). Já na FPZSP houve a formação de somente um grande grupo familiar descendente de apenas quatro indivíduos. É possível observar também que, em geral, existiram mais acasalamentos entre aparentados no CPRJ do que na FPZSP e que a razão de nascimentos de macho/fêmea não é semelhante, mostrando mais nascimentos de machos, porém, essa questão ainda precisa ser investigada com mais cuidado em outro estudo.

Figura 5 – Genealogia de *Leontopithecus chrysomelas* em dois cativeiros do Brasil. Relação de todos os indivíduos que contribuiram para os grupos familiares atuais.



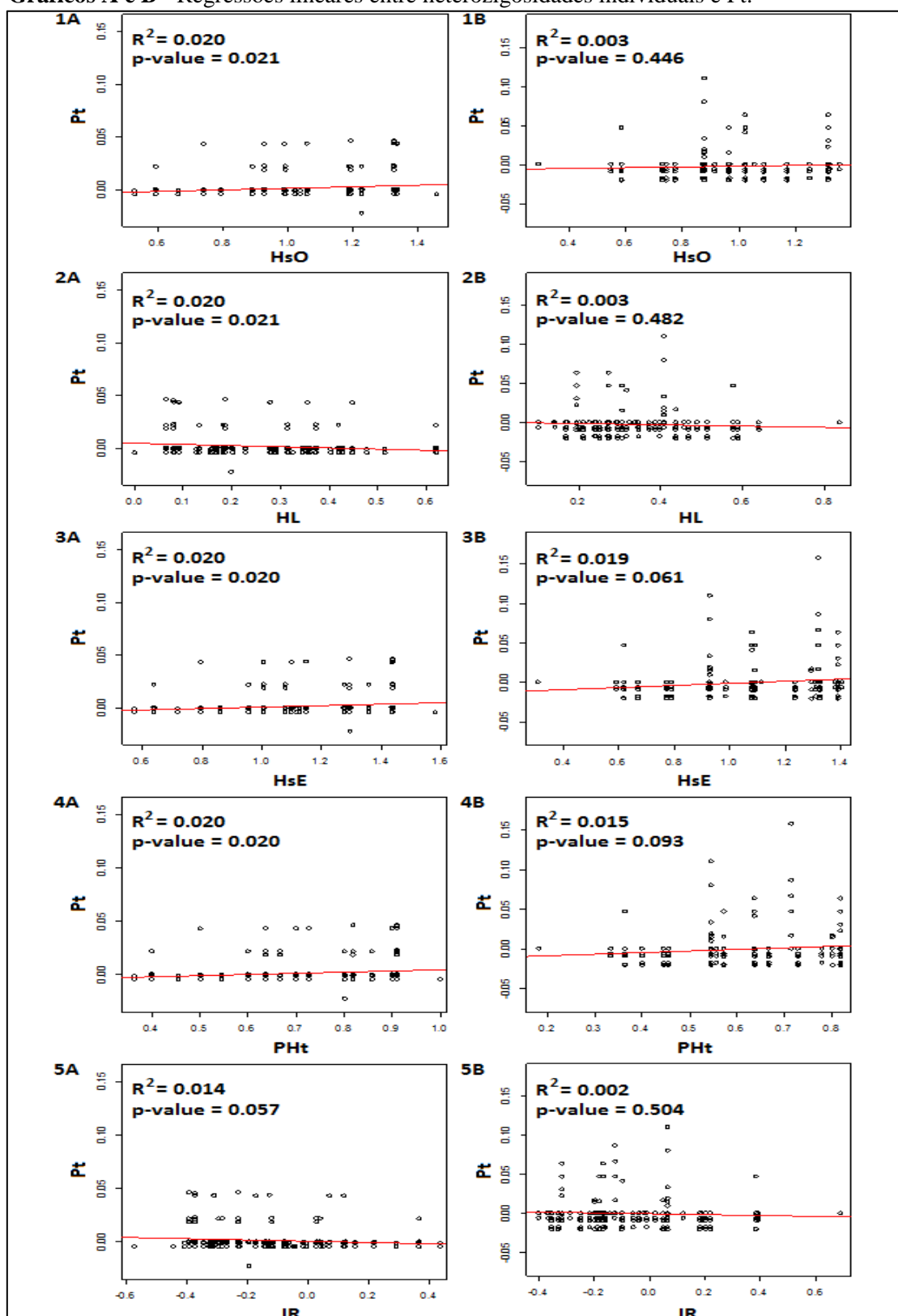
Círculos e quadrados representam fêmeas e machos, respectivamente; losangos representam indivíduos dos quais não se conhece o sexo símbolos com uma linha diagonal indicam os animais que já faleceram; símbolos unidos por uma linha tracejada representam um mesmo indivíduo; casais unidos por uma dupla linha representa acasalamento entre indivíduos aparentados; os números indicam a identificação de cada indivíduo no *Studbook*; símbolos preenchidos com a cor vermelha pertencem a animais do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro e os símbolos preenchidos com a cor preta pertencem a animais da FPZSP.

4.3. Heterozigosidade individual (HI) e Correlação *Fitness*-Heterozigosidade (HFC)

O teste de *Spearman* detectou correlação significativa em diferentes locos propostos, assim foram eliminados das análises os locos: Leon31, Leon30, Leon3, Leon35 e *Lchu6*. A escolha da retirada desses locos foi feita considerando os que possuíam maior número de correlações significativas com outros locos, e pelo grau de significância (Apêndice A). Não foram verificadas diferenças significativas nos valores de Pt entre machos e fêmeas (valor de $p = 0.4632$ para o CPRJ e valor de $p = 0.1766$ para a FPZSP), então as análises posteriores foram realizadas considerando as duas variáveis juntas.

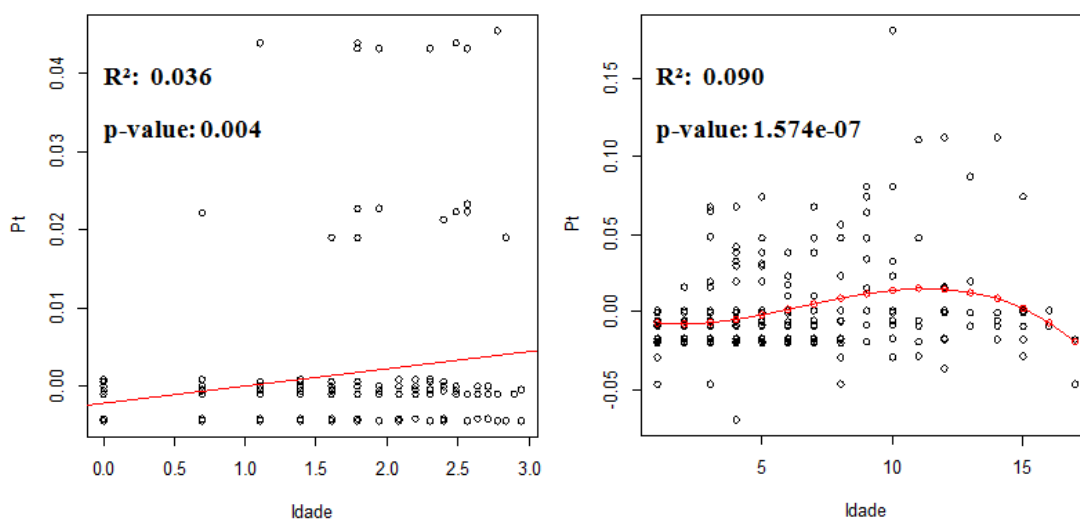
As regressões entre Pt e as cinco diferentes heterozigosidades individuais da população do CPRJ, foram significativas ($p < 0.05$) - exceto entre Pt e IR ($p = 0.057$) -, mostrando que há uma correlação entre heterozigosidade individual e a Pt (Gráficos A). Já para a população da FPZSP, os valores não foram significativos, não havendo, portanto, nenhuma correlação entre essas variáveis (Gráficos B). Os valores das cinco heterozigosidades calculadas para todos os indivíduos cativos desse estudo encontram-se no Apêndice B.

Gráficos A e B - Regressões lineares entre heterozigosidades individuais e Pt.



A e B indicam os gráficos referentes as populações do CPRJ e a FPZSP, respectivamente; **Pt** – contribuição individual para o crescimento populacional; **PHt** (proporção de locos heterozigotos em um indivíduo), **Hs_{exp}** (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média esperada), **Hs_{obs}** (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média observada), **IR** (parentesco interno) e **HL** (homozigose por loco). Pontos em forma de círculo=indivíduos.

Já nas regressões entre Pt e idade verificou-se a existência de uma correlação entre essas duas variáveis tanto na FPZSP, quanto no CPRJ (Gráficos C e D).



Gráficos C e D – Regressão linear e cúbica entre Pt e Ln(idade), para a população do CPRJ e da FPZSP, respectivamente. Os pontos em forma de círculo são os indivíduos.

Ao verificar os valores de Pt ao longo dos anos pode se observar que eles se mantêm constantes para CPRJ, com valores perto do zero, e variam drasticamente para FPZSP (Gráfico E). A variação no valor de Pt no ano 2010 na FPZSP se deve ao aumento do valor do “componente sobrevivência” dos indivíduos nesse ano. Após o teste de Kruskal-Wallis foram encontrados valores de $p < 2.2e-16$ para o CPRJ e $p = 5.21e-12$ para a FPZSP, mostrando que o valor de Pt é significativamente diferente entre os anos, assim, os anos foram considerados na análise de regressão múltipla.

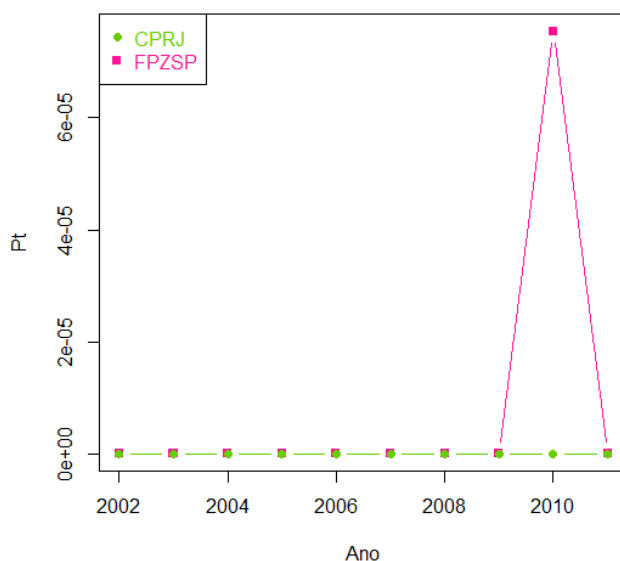


Gráfico E – Variação do Pt médio por ano em ambos os cativeiros.

O modelo predito pela análise de regressão múltipla stepwise para o CPRJ indicou uma significativa associação entre a variável dependente Pt com a idade, HL (como medida de heterozigose/homozigose individual) e o ano ($R^2= 0.13$, p-value= 0.001557). Ao analisar cada um dos componentes do Pt se obteve que o “componente sobrevivência” não mostra associação com nenhuma das variáveis estudadas, mas o “componente fecundidade” apresenta uma significativa associação com a idade e HL ($R^2= 0.05$, p-value= 0.004062). No entanto para a FPZSP, a única variável que mostrou estar associada com o Pt foi a idade dos indivíduos ($R^2=0.06$, p-value= 3.979e-06). Separando os componentes do Pt também não foi encontrada associação com o “componente sobrevivência” e as variáveis estudadas, mas o componente fecundidade apresenta uma significativa associação entre a variável Pt com a idade ($R^2=0.17$, p-value= 6.125e-09).

5. DISCUSSÃO

O valor obtido para o F_{st} encontrou uma alta diferenciação entre as duas populações cativas analisadas, mostrando que não há fluxo gênico entre elas. Informações contidas no heredograma gerado neste estudo mostram que à cinco gerações não ocorrem trocas de indivíduos contribuintes para a prole atual entre as instituições CPRJ e FPZSP, ou seja, atualmente não existe fluxo gênico entre essas populações, o que também influenciou nos resultados de estruturação (Figura 5).

Segundo a ACF alguns indivíduos do CPRJ estão mais próximos geneticamente, também da população da FPZSP, no entanto, esta análise pode não estar sendo muito informativa, pois a variação explicada por ela é muito baixa, podendo não ser significativa (por exemplo: o eixo x explicou somente 9,86%) (Figura 4). Porém, observa-se também, que os indivíduos da FPZSP estão mais relacionados entre si, e que há uma separação individual maior nos animais do CPRJ, o que foi comprovado pelo heredograma, onde foram encontrados cinco grupos descendentes de ancestrais diferentes no CPRJ. Além disso, alguns fundadores podem ter vindos da mesma área, o que explicaria a aproximação maior observada entre alguns indivíduos nas duas instituições.

Considerando a informação molecular, os mico-leões-da-cara-dourada parecem estar mantendo a diversidade genética mesmo *ex situ*. Os dezesseis microssatélites escolhidos para este estudo foram informativos e a maioria exibiu níveis altos de conteúdo de informação polimórfica na população do CPRJ ($PIC=0,63$), e na população da FPZSP ($PIC=0,50$), com exceção do loco Leon31c97 que se mostrou pouco informativo.

A diversidade genética, bem como o número de alelos (N_a) encontrados nos MLCD amostrados em cativeiros do Brasil, foram maiores do que os valores encontrados em trabalhos realizados com as outras espécies de micos-leões (Tabela 7), porém isso pode ser explicado pelo maior número de amostras e/ou número de locos analisados, ou mesmo pelo fato de *L. caissara*, *L. rosalia* e *L. chrysopygus* possuírem uma área de vida menor e mais fragmentada e, conseqüentemente, um tamanho populacional menor em vida-livre se comparada com a dos MLCD. Ademais, vale ressaltar, que cada espécie possui uma história evolutiva diferente, o que em si, já explica a diferença nos valores de diversidade genética.

Tabela 7 – Diversidade genética em espécies de *Leontopithecus*.

Espécie	Locos	Amostras	Na	He	Referência
<i>L. rosalia</i> (vida livre)	4	57	2.8	0.54	Grativol <i>et al.</i> (2001)
<i>L. chrysopygus</i> (vida livre)	9	14	2.1	0.29	Perez-Sweeney <i>et al.</i> (2005)
<i>L. caissara</i> (vida livre)	9	52	2.6	0.45	Martins <i>et al.</i> (2011)
<i>L. chrysomelas</i> (cativeiro EEP)	9	29	3.7	0.59	Galbusera and Gillemot, 2008
<i>L. chrysomelas</i> (vida livre)	11	63	3.4	0.54	Moraes <i>et al.</i> (dados não publicados)
<i>L. chrysomelas</i> (CPRJ)	16	55	5.1	0.65	Este estudo
<i>L. chrysomelas</i> (FPZSP)	16	49	4.6	0.55	Este estudo

Locos= número de locos usados em cada estudo; Na= número de alelos e He= Heterozigosidade Esperada.

Galbusera e Gillemot (2008) verificaram a diversidade genética em vinte e nove indivíduos cativos de *L. chrysomelas* da Europa, usando nove locos microssatélites homólogos para a espécie. Comparando os resultados encontrados neste estudo com os do presente trabalho (cativeiros do Brasil), se verifica um número de alelos médio menor (Na=4) do que o encontrado no nosso estudo (Na=, CPRJ=5 e Na=5, FPZSP) (Tabela 8). A He média foi menor se comparadas com a população do CPRJ (He=0.7), porém igual a encontrada na FPZSP (He=0.6). Entretanto, é importante ressaltar, que Galbusera e Gillemot (2008) utilizaram um número amostral menor, e talvez com o aumento de indivíduos analisados, aumente-se também a diversidade genética. O menor número de fundadores no cativeiro europeu também pode ser uma explicação para a menor diversidade encontrada neste local.

Tabela 8 – Diversidade genética de MLCD de cativeiros do Brasil e da Europa.

Locos	CPRJ				FPZSP				EUR			
	N	Na	Ho	He	N	Na	Ho	He	N	Na	Ho	He
<i>Lchu1</i>	52	3	0.6	0,6	47	3	0,5	0,6	29	3	0,8	0,6
<i>Lchu3</i>	52	6	0.8	0,8	46	6	0,8	0,8	29	6	0,6	0,7
<i>Lchu4</i>	52	6	0.5	0,4	46	6	0,4	0,4	29	3	0,3	0,6
<i>Lchu5</i>	51	6	0.7	0,7	46	6	0,7	0,8	29	5	0,9	0,8
<i>Lchu6</i>	53	6	0.6	0,7	49	4	0,4	0,5	29	3	0,6	0,6
<i>Lchu8</i>	53	7	0.7	0,7	38	7	0,8	0,8	29	5	0,7	0,7
<i>Lchu9</i>	52	6	0.8	0,7	47	4	0,3	0,3	29	3	0,4	0,4
Média	52	5	0,7	0,7	46	5	0,6	0,6	-	4	0,6	0,6

N= tamanho amostral; Na= número de alelos; Ho= Heterozigosidade Observada; He= Heterozigosidade Esperada e EUR= população cativa da Europa.

No estudo de Moraes *et al.* (não publicado), 63 indivíduos de *L. chrysomelas* de vida livre de cinco regiões de sua distribuição (Ararauna, REBIO-Una, Teimoso, Ilhéus – região leste, e Fazenda Barro Branco, região sudoeste) foram analisados quanto à diversidade genética, utilizando onze marcadores moleculares microssatélites, sete homólogos para a espécie e quatro heterólogos. Escolhemos a REBIO-Una e Ararauna - consideradas juntas no

referido trabalho, por ser a mesma população genética - para compararmos a diversidade genética de cativeiro com a de vida livre, pois, além do N amostral médio ser o mais similar ao nosso, é, atualmente, a única área florestal sob proteção grande o suficiente para reter uma média ou alta densidade de MLCD e 98% de diversidade genética (ZEIGLER et al., 2010). Com a finalidade de comparar os dados de diversidade genética reportados neste estudo para as populações *ex situ* de dois cativeiros no Brasil com os dados disponíveis em Moraes et al. (não publicado) para populações *in situ* de *L. chrysomelas*, foi feita uma análise separada, utilizando apenas os onze locos microssatélites usados no estudo com os animais de vida livre e utilizando os resultados para riqueza alélica (Ra) gerados pelo programa HP-rare (KALINOWSKI et al., 2005), o qual equaliza o número de amostras entre as populações, através de uma rarefação.

Levando em consideração a média de heterozigosidade esperada (H_e) e a riqueza alélica (Ra), a diversidade genética das populações cativas do CPRJ e da FPZSP é similar com a encontrada na população natural (Tabela 9). Observa-se um número de alelos médio igual nas três populações, porém a maioria dos locos - *Lchu3*, *Lchu4*, *Lchu6*, *Lchu8*, *Lchu9* e *Leon30c73* - apresentaram um N_a maior *ex situ* e somente os locos *Lchu5*, *Leon2* e *Leon21c75* expressaram um N_a maior na população *in situ*. Foram encontrados no mínimo sete alelos a mais nas populações cativas, o que significa que elas podem ter alelos privados com relação à de vida livre, ou/e pode estar representando regiões não amostradas nessa pesquisa, como a região sudoeste de distribuição da espécie, a qual, segundo Moraes et al. (dados não publicado) possui um alto potencial genético para a conservação de MLCD. Contudo, estudos que comprovem a origem da diversidade genética das populações cativas ainda devem ser realizados a fim de elucidar de fato essa questão.

Tabela 9 – Diversidade genética de *L. chrysomelas* *ex-situ* e *in-situ*.

Locos	CPRJ					FPZSP					[REBIO&ARARAUNA]				
	N	Na	Ho	He	Ra	N	Na	Ho	He	Ra	N	Na	Ho	He	Ra
<i>Lchu1</i>	52	3	0,6	0,6	1,6	47	3	0,5	0,6	1,7	50	3	0,6	0,5	1,5
<i>Lchu3</i>	52	6	0,8	0,8	1,8	46	6	0,8	0,8	1,8	49	5	0,6	0,7	1,7
<i>Lchu4</i>	52	6	0,5	0,4	1,5	46	6	0,4	0,4	1,5	49	4	0,5	0,5	1,5
<i>Lchu5</i>	51	6	0,7	0,7	1,8	46	6	0,7	0,8	1,8	50	7	0,5	0,8	1,8
<i>Lchu6</i>	53	6	0,6	0,7	1,7	49	4	0,4	0,5	1,6	50	5	0,5	0,6	1,6
<i>Lchu8</i>	53	7	0,7	0,7	1,7	38	7	0,8	0,8	1,8	50	6	0,4	0,5	1,5
<i>Lchu9</i>	52	6	0,8	0,7	1,7	47	4	0,3	0,3	1,3	50	5	0,3	0,4	1,4
Leon2	42	4	0,8	0,7	1,7	45	6	0,6	0,6	1,6	40	7	0,8	0,7	1,8
Leon21c75	55	4	0,5	0,6	1,6	47	3	0,4	0,4	1,4	47	5	0,6	0,6	1,6
Leon27c13	55	3	0,6	0,6	1,6	48	3	0,9	0,7	1,7	45	3	0,3	0,4	1,4
Leon30c73	55	6	0,6	0,7	1,7	45	5	0,5	0,4	1,5	49	5	0,7	0,6	0,4
Média	52	5	0,7	0,6	1,7	46	5	0,6	0,6	1,6	48	5	0,5	0,6	1,6

N= tamanho amostral; Na= número de alelos; Ra= Riqueza alélica; Ho= Heterozigosidade Observada; He= Heterozigosidade Esperada.

A revisão dos dados de *Studbook* da espécie confirma que as populações cativas de MLCD foram formadas por um número muito elevado de fundadores, diferente do que acontece na maioria dos programas de reprodução em cativeiro de espécies ameaçadas de extinção, e isso, provavelmente, está relacionado com a alta diversidade genética encontrada nesse estudo em comparação ao encontrado em vida-livre (Tabela 9). Quando se iniciou o programa de reprodução em cativeiro para os *L. chrysomelas*, já havia um considerável conhecimento a respeito da reprodução em micos-leões (através do *L. rosalia*), e como foram sendo adicionados muitos animais, a população de MLCD nos cativeiros com experiência no manejo reprodutivo de *Leontopithecus*, aumentou rapidamente (BALLOU *et al.*, 1998; MALISSON, 1984; LEUS & DE VLEEESCHOWER, 2001). Além disso, o coeficiente de endogamia de heredograma (F) vem sendo mantido com o passar das gerações (Tabela 5) e apesar do heredograma mostrar vários acasalamentos entre aparentados (Figura 5), os dados moleculares mostraram valores negativos para o *Fis* médio (há excesso de heterozigotos), indicando pouco relacionamento entre os mico-leões-da-cara-dourada que foram utilizados para acasalar e produzir a maior parte da prole atual.

A formação no heredograma de somente um grande grupo familiar descendente de apenas quatro indivíduos para a FPZSP sugere que eles provavelmente vieram da mesma área, pois, através do *Studbook* foi possível verificar que esses quatro ancestrais foram apreendidos e transferidos para o Zoológico na mesma data.

As análises de HFC no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro indicaram que há uma correlação entre heterozigosidade individual e a contribuição individual para o crescimento

populacional (como medida de *fitness*), ou seja, de acordo com esses locos, o nível de heterozigotos em cada indivíduo, está influenciando no crescimento desta população. Apenas a heterozigosidade individual IR (relacionamento interno), não deu correlação alguma. Aparicio et al. (2006) explica que IR superestima homozigose em indivíduos portadores de alelos raros, além disso, as frequências alélicas são tratadas de forma assimétrica, sendo o valor máximo (1) obtido apenas quando todos os locos forem homozigóticos, independentemente de suas frequências alélicas, e o valor mínimo (-1) é obtido apenas quando o indivíduo for heterozigoto para todos os locos. Já para a população da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, não foi encontrado correlação heterozigosidade individual-Pt. Esses dados indicam que o manejo nas duas instituições esta sendo realizado de forma divergente. No CPRJ eles estão conseguindo com que os indivíduos mais heterozigotos se reproduzam e deixem descendentes, o que na FPZSP, parece não ocorrer, pois indivíduos menos heterozigotos, tiveram mais filhotes que alguns indivíduos mais heterozigotos, o que pode explicar a falta de correlação encontrada nessas duas variáveis. No entanto, vale ressaltar, que isto pode estar acontecendo simplesmente devido ao efeito fundador, comum em populações cativas ou pode ser também o resultado do manejo genético nas instituições que, geralmente, leva em consideração apenas os dados do *Studbook*, devido à falta de informação molecular.

A existência de correlação entre Pt e idade, nas duas instituições amostradas, vai de encontro ao esperado em populações naturais, onde espera-se um aumento na reprodução proporcional ao aumento da idade, e uma diminuição com o passar dos anos.

Não foram verificadas excessivas variações na contribuição individual para o crescimento populacional ao longo dos anos investigados nesse estudo para o CPRJ, mas na FPZSP, os valores de Pt aumentaram extremamente no ano de 2010, indicando que houve algum acontecimento dentro dessa instituição no referido ano, que desencadeou um aumento na sobrevivência (fecundidade se manteve igual) de indivíduos de MLCD. Houve um grande número de nascimentos nos anos anteriores ao de 2010, e segundo Marques, M. C. (informação verbal)¹, os grupos familiares que se encontravam juntos no mesmo recinto estavam muito grandes, além de uma alta média de gêmeos e trigêmeos por nascimento, o que também influencia um maior cuidado parental, já que há mais irmãos para ajudar na criação dos filhotes, somado a uma dieta balanceada – que ajuda a manter uma maior reprodutividade -, foram fatores que contribuíram para o aumento da sobrevivência de indivíduos na FPZSP no referido ano. Nos anos posteriores os jovens começaram a atingir a maturidade e houve a dispersão dos grupos (por expulsão de indivíduos através de agressões físicas), assim, os que podiam ser mantidos, ficaram juntos, e os outros foram separados (diminuindo o número de

animais por grupos familiares), além de que em 2012 foi feito um controle populacional através da colocação de implantes hormonais (contraceptivos) em fêmeas, o que provavelmente tornou a população mais estável (MARQUES, M. C., informação verbal)².

Na FPZSP, as regressões múltiplas, realizadas com a finalidade de inclusão do ano e para a obtenção de uma explicação mais apurada das outras variáveis, corroborou com as regressões anteriores, bem como a influência do ano, onde o modelo proposto para a regressão múltipla ($Pt \sim Idade$), não o considerou, provavelmente devido ao considerável aumento na Pt em 2010. O modelo proposto para regressões múltiplas no CPRJ ($Pt \sim Idade + HL + Ano$), também contribuiu para os resultados das outras regressões, mostrando que nessa população a Pt está associada as três variáveis analisadas neste estudo. Por fim, a separação dos componentes da Pt , indicou que as variáveis correlacionadas a essa medida de fitness, está associada a “componente fecundidade” (número de filhos por ano, de cada indivíduo), não encontrando nenhuma relação com o “componente sobrevivência”.

6. CONCLUSÃO

- As duas populações de cativeiro analisadas de mico-leão-da-cara-dourada parecem estar mantendo a diversidade genética oriunda da natureza. Nota-se uma diversidade genética similar entre essas populações *ex situ* e a população *in situ* comparada e maior que a encontrada em outras populações cativas da Europa.
- As populações de cativeiro já estão geneticamente diferenciadas ($F_{st} = 0,27$), talvez pelo manejo independente mantido entre as instituições ou efeito fundador dessas populações.
- As análises dos dados contidos no *Studbook* da espécie (coeficiente de endogamia de heredograma (F) e heredograma), ajudaram a elucidar algumas questões referentes à diversidade genética, bem como, conhecer mais profundamente o histórico da população de cativeiro mundial e local (do presente estudo).
- O efeito da heterozigosidade individual sobre a medida de *fitness* Pt foi verificada somente na população do CPRJ, indicando que neste meio cativo os indivíduos progenitores com maior heterozigosidade estão deixando mais descendentes, ao contrário do observado na FPZSP.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, 25: 4692–4693.

AMOS, W.; WORTHINGTON, W.; J.; FULLARD, K.; BURG, T.M.; CROXALL, J.P.; BLOCH, D.; COULSON, T. (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 268: 2021–2027.

APARICIO, J.M.; ORTEGO, J.; CORDERO, P.J. (2006) What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? **Molecular Ecology**, 15: 4659–4665.

ARROYO-RODRIGUES & MANDUJANO (2009). Conceptualization and measurement of habitat fragmentation from the Primates' perspective. **International Journal of Primatology**, 30: 497-514.

AVISE, J.C. (2004). **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. 2^a ed. Sinauer Sunderland, 684p.

BAKER, A.J. & DIETZ, J.M. (1996) Immigration in wild groups of golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of Primatology**, 38: 47-56.

BAKER, A.J, BALES K, DIETZ J.M. (2002). Mating system and group dynamics in lion tamarins. In: Kleiman D.G., Rylands A.B. (eds). **Lion tamarins: biology and conservation**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, p188–212.

BAKER, A.J., BALES, K. & DIETZ J.M. (2008). Sistemas de acasalamento e dinâmicas de grupo em micos-leões. In: Kleiman, D.G. & Rylands, A.B. (eds) **Micos-leões: Biologia e conservação**. Brasília: MMA, p251 – 284.

BAKER, A.J., DIETZ, J.M. & KLEIMAN, D.G. (1993). Behavioral evidence for monopolization of paternity in multi-male groups of golden lion tamarins. **Animal Behavior**, 46: 1091-1103

BALLOU, (1989). Emergence of the captive population of goldenn-headed Lion tamarins *Leontopithecus chrysomelas*. **Dodo, Journal of the Jersey Wildlife Preservation Trust**, 26:70-77.

BALLOU JD, LACY RC (1995) Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. In: Population Management for Survival and Recovery: Analytical Methods and Strategies in Small Population Conservation (eds. Ballou JD, Gilpin M, Foose TJ), pp. 76–111. **Columbia University Press**, New York.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. (2001) **Genetix 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

BERGL, R.A. & VIGILANT, L. (2007) Genetic analysis reveals population structure and recent migration within the highly fragmented range of the Cross River gorilla (*Gorilla gorilla Diehl*). **Molecular Ecology**, 16: 501-516.

BOTSTEIN, D. et al. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of human Genetics**, 32: 314.

BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. **Current Opinion Genetics and Development**, 3: 939-943.

CAUGHLEY, G.; GUNN, A. (1996). **Conservation Biology in Theory and Practice**. Cambridge: Blackwell Science, 459.

CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B. & THOMAS, L. (Eds.), Califórnia: Benjamin/Cummings Publishing Company, 51-65.

COIMBRA-FILHO, A.F. & MITTERMEIER, R.A. (1977). Conservation of the Brazilian lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). p. 59-94. In: H.S.H. Prince Rainier III of Monaco & Bourne, G.H. (eds). **Primate Conservation**. Academic Press.

COIMBRA-FILHO, A.F., PISSINATTI, A., & ROCHA e SILVA, R. (1986). O acervo do Museu de Primatologia (CPRJ/FEEMA). In DE MELLO, M.T (ed.), **A Primatologia no Brasil-2**, PP. 505- 14. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Primatologia.

COLTMAN, D.W.; PILKINGTON, J.G.; SMITH, J.A.; PEMBERTON, J.M. (1999). Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. **Evolution**, 53: 1259–1267.

COSTER, A (2012). Pedigree: Pedigree functions. R package version 1.4. <http://CRAN.R-project.org/package=pedigree>

COULON, A. (2010). Genhet: An easy-to-use R function to estimate individual heterozygosity. **Molecular Ecology Resources**, 10: 167–169.

COULSON, T. N., PEMBERTON, J. M., ALBON, S. D., BEAUMONT, M., MARSHALL, T. C., SLATE, J., GUINNESS, F.E.; CLUTTON-BROCK, T. H. (1998). Microsatellites reveal heterosis in red deer. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 265: 489–495.

DIETZ, J.M. & BAKER, A.J. (1993). Polygyny and female reproductive success in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **Animal Behavior**, 46: 1067-1078.

DIETZ, J.M., SOUZA, S.N. & BILLERBECK, R. (1996). Population dynamics of goldenheaded lion tamarins *Leontopithecus chrysomelas* in Una Reserve, Brazil. **Dodo, Journal of the Wildlife Preservation Trusts** 32: 115-122

DIETZ, J.M., PERES, C.A. & PINDER, L. (1997). Foraging ecology and use of space in wild golden Lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of Primatology**, 41: 289-305.

FONZO, M. M. I. DI *et al.* (2011). The population growth consequences of variation in individual heterozygosity. **PLoS ONE**, 6.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. (2002). **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press, Cambridg, UK.

GALBUSERA, P.H.A. & GILLEMOT, S. (2008). Polymorphic microsatellite markers for the endangered golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae). **Conservation Genetic**, 9: 731-733.

GOLDSTEIN, D.B. & SCHLATTERER, C. (1999). **Microsatellites: Evolution and Applications**. 1 ed. New York, USA: Oxford University. 368p.

GOOSSENS, B., CHIKHI, L., JALIL, M.F., ANCRENAZ, M., LACKMAN-ANCRENAZ, I., MOHAMED, M., ANDAU, P. & BRUFORD, M.W. (2005). Patterns of genetic and migration in increasingly fragmented and declining orangutan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. **Molecular Ecology**, 14: 441-456.

GOUDET J. (2001). FSTAT (version 2.9.3), a program to estimate and test gene diversities and fixation indices: < www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm > Acesso em: Março, 2015.

GRATIVOL, A.D., BALLOU, J.D. & FLEISCHER, R.C. (2001). Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**, 2: 1-9.

GUIDORIZZI, C. (2008). **Ecologia e comportamento do mico-leão-da-cara-dourada, *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820) (Primates, Callitrichidae), em um fragmento de floresta semidecidual em Itororó, Bahia, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Ilhéus – BA, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, 113p.

HANSSON, B.; WESTERBERG, L. (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. **Molecular Ecology**, 11: 2467–2474.

HOFFMAN, J. I. *et al.* (2007). Female fur seals show active choice for males that are heterozygous and unrelated. **Nature**, 445: 912–914.

HOLST B, MEDICI E.P., MARINI-FILHO O.J., KLEIMAN D, LEUS K, PISSINATTI A, VIVEKANANDA G, BALLOU J.D., TRAYLOR-HOLZER K, RABOY B, PASSOS F, VLEESCHOUWER K, MONTENEGRO M.M. (eds) (2006) **Lion tamarin population and habitat viability assessment workshop 2005, final report**. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, 208p.

IVY, J.A.; LACY, R.C. (2010). Using molecular methods to improve the genetic management of captive breeding programs for threatened species. In: DEWOODY, J.A.; BICKHAM, J.W.; MICHLER, C.H.; NICHOLS, K.M.; RHODES Jr, O.E.; WOESTE, K.E. (Ed.). **Molecular approaches in natural resource conservation and management**. Cambridge University Press, New York, 267-295.

KALINOWSKI, S.T. *et al.* (2005). Program Note HP-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness, **Molecular Ecology Notes**, 5: 187-189.

KALINOWSKI, S.T.; WAGNER, A.P.; TAPER, M.L. (2006). ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, 6: 576-579.

KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES-HAVAS S, CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C, THIERER T, ASHTON B,

MENTJIES P, & DRUMMOND A (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28: 1647-1649.

KIERULFF, M. C. M. et al. (2012). The Golden lion tamarin *Leontopithecus rosalia*: A conservation success story. **International Zoo Yearbook**, 46: 36–45.

KIERULFF, M.C.M., RYLANDS, A.B., MENDES, S.L. & DE OLIVEIRA, M.M. (2008) *Leontopithecus chrysomelas*. In: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2014.1: < www.iucnredlist.org >. Acesso em: Dezembro, 2014.

KLEIMAN, D.G.; RYLANDS, A.B. (2008) **Mico-leões: Biologia e Conservação**. Brasília: MMA. 568p.

LUDWIG, K.; GALBUSERA, P. **International Studbook - Golden-headed Lion Tamarin**. Antwerp, Belgium: [s.n.].

MALISSON, J. J. C. (1987). International efforts to secure a viable population of the golden-headed lion tamarin. **Primate Conservation**, 8: 124-125.

MARKERT, J.A.; GRANT P.R.; GRANT, B.R.; KELLER, L. F.; COOMBS, J.L.; PRETEN, K. (2004). Neutral locus heterozygosity, inbreeding, and survival in Darwin's ground finches (*Geospiza fortis* and *G. scandens*). **Heredity**, 92: 306-315.

MARTINS, M.M. & GALLETTI JR, P.M. (2011). Informative microsatellites for genetic population studies of black-faced lion tamarins (*Leontopithecus caissara*). **Genetic and Molecular Biology**, 34: 173-175.

MENESCAL, L.A., GONÇALVES, E.C., SILVA, A., FERRARI, S. F. & SCHNEIDER, M.P. (2009). Genetic Diversity of Red-Bellied Titis (*Callicebus moloch*) from Eastern Amazonia Based on Microsatellite Markers. **Biochemical Genetics**, 47: 235–240.

MILTON, K., LOZIER, J.D. & LACEY, E. A. (2009). Genetic structure an isolated population of mantled howler monkeys (*Allouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. **Conservation Genetics**, 10: 347-358.

MITTERMEIER, R.A., COIMBRA-FILHO, A.F., KIERULFF, RYLANDS, A.B., MENDES, S.L., PISSINATTI, A. & ALMEIDA, L.M. (2007) Monkeys of the Atlantic Forest of Eastern Brazil Pocket Identification Guide. Conservation International Tropical Pocket Guide Series. Vol.3. **Conservation International**. Arlington, VA.

MITTERMEIER, R.A., FONSECA G.A.B., RYLANDS, A.B., & MITTERMEIER, C.G. (1999). Atlantic Forest. In: MITTERMEIER, R.A.; MYERS, N.; ROBLES GIL, P.; & MITTERMEIER, C.G. (eds.). **Hotspots: The earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Mexico City: Cemex, p. 136-147.

MORAES, A.M.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C.R.; DE VLEESCHOUWER, K.M.; RABOY, B. E.; OLIVEIRA, C. L.; DIETZ, D.; GALBUSERA, P.H.A. Genetic structure of an endangered endemic primate (*Leontopithecus chrysomelas*) from Atlantic Forest. Rio de Janeiro, trabalho não publicado.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, G., FONSECA G.A.B. & KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853–858.

OLIVEIRA, E.J., PÁDUA, J.G., ZUCCHI, M.I., VENCovsky R. & VIEIRA, M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 294-307.

OLIVEIRA, L.C., HANKERSON, S.J. & DIETZ, B.E. (2010a). Key tree species for the goldenheaded Lion tamarin and implications for shade-cocoa management in southern Bahia, Brazil. **Animal Conservation**, 2: 1-11.

OLIVEIRA, L.C., NEVES, L.G., RABOY, B.E. & DIETZ, J.M (2010b). Abundance of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) affects group characteristics and use of space by golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) in Cabruca Agroforest. **Environment Management**, 48: 248-262.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. (2006). GenAlex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for taching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6: 288-295.

PEREZ-SWEENEY, B.M., RODRIGUES, F.P. & MELNICK (2004). Metodologias utilizadas em genética da conservação. CULLEN JR., L.; RUDRAN, R. & VALLADARES-PADUA. **Métodos de Estudo em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre**. Curitiba: UFPR. p. 343 – 380.

PEREZ-SWEENEY, B.M., VALLADARES-PADUA, C., BURREL, A.S., FIORE, A. DI, SATKOSKI, J., GROOT, P.J.V.C., BOAG, P.T. & MELNICK, D.J. (2005). Dinucleotide microsatellite designed goes a critically endangered primate, the black lion tamarin. **Molecular Ecology**, 5: 198-201.

PINTO, L.P.S. & RYLANDS A.B. (1997). Geographic distribution of the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*: implications for its management and conservation. **Folia Primatologica**, 68: 3-5.

PISSINATI, A. (1999). Morfologia e morfometria de aorta torácica e estereologia do miocárdio de infantis e adultos de *Leontopithecus* (Lesson, 1840), *Callitrichidae – Primates*. 1999. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. Press. p. 11 - 12.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

RABOY, B & DIETZ, J (2004b). The use of degraded and shade cocoa forest by endangered golden-headed lion tamarins *Leontopithecus chrysomelas*. **Oryx**, 38(1): 75-83.

RABOY, B.E., NEVES, L.G., ZEIGLER S., SARAIVA, N.A., CARDOSO, N., SANTOS, G.R. DOS, BALLOU, J.D. & LEIMGRUBER, P. (2010). Strength of habitat and landscape metrics in predicting golden-headed Lion tamarin presence or absence in Forest patches in southern Bahia, Brazil. **Biotropica** 42: 388-397.

RABOY, B.E., NEVES, L.G., ZEIGLER S., SARAIVA, N.A., CARDOSO, N., SANTOS, G.R. DOS, BALLOU, J.D. & LEIMGRUBER, P. (2010). Strength of habitat and landscape metrics in predicting golden-headed Lion tamarin presence or absence in Forest patches in southern Bahia, Brazil. **Biotropica** 42(3): 388-397.

RHODES, O.E.; LATCH, E.K. (2010) Wildlife reintroductions: conceptual development and application of theory. In: Molecular insights into natural resource conservation and management (eds DeWoody JA, Bickham JW, Michler C, Nichols K, Rhodes OE, Woeste K). **Cambridge University Press**.

ROSSITER, S.J., JONES, G., RANSOME, R.D., BARRATT E.M. (2001) Outbreeding increase offspring survival in wild greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 268: 1055–1061.

ROUSSET, F. (2003). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, 138: 81-93.

RYLANDS, A.B. (1993). Marmosets and tamarins: Systematics, Behavior and Ecology. USA: **Oxford University Press**. 416p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. **Quartely Review of Biology**, 76: 348-349.

SCHLOTHERER, C. (1998). Microsatellites. In: **Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach**. HOELZEL, A.R. (Ed.) 2^a ed. New York: Oxford University Press Inc., p. 237-261.

SCHONEWALD-COX, C. (et al.) In: **Genetics and conservation**. SCHONEWALD-COX, C. M.; SCHROTH, G. & HARVEY, C.A. (2007). Biodiversity conservation in cocoa production landscapes: an overview. **Biodiversity Conservation**, 16: 2237-2244.

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

SEDDON, N., AMOS, W.; MULDER, R.A.; TOBIAS, J.A. (2004) Male heterozygosity predicts territory size, song structure and reproductive success in a cooperatively breeding bird. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 271: 1823–1829.

SOLÉ-CAVA, A. (2001). Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R. (ed.), **Biologia Molecular e Evolução**. 1^aed. Ribeirão Preto, SP: Holos, Editora Ltda-ME. p. 172-192.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Acesso em: Maio, 2015.

THERNEAU, T.; ATKINSON, E.; SINNWELL, J.; SCHAID, D.; MCDONNELL, S (2014). kinship2: Pedigree functions. R package version 1.6.0. <http://CRAN.R-project.org/package=kinship2>

VANOOSTERHOUT, C. et al. (2004).). Micro-checker: *software* for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 24: 535-538.

VELANDO, A.; BARROS, Á.; MORAN, P. (2015). Heterozygosity-fitness correlations in a declining seabird population. **Molecular Ecology**, 24: 1007–1018.

WAZA. International Studbooks. Disponível em: <
<http://www.waza.org/en/site/conservation/international-studbooks> >. Acesso em: Maio, 2015.

ZEIGLER, S.L., FAGAN, W. F., DEFRIES, R. & RABOY, B.E. (2010). Identifying important forest patches for the long-term persistence of the endangered golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*). **Tropical Conservation Science**, 3: 63-77.

APÊNDICE A – Heterozigosidade Individual – CPRJ

Tabela 10 – Valores de heterozigosidade individual nos *L. chrysomelas* do CPRJ.

<i>Studbook</i>	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL
1603	0,733	1,114	1,132	-0,121	0,273
2178	0,563	0,843	0,865	0,141	0,437
2719	0,375	0,562	0,577	0,389	0,613
2803	0,500	0,749	0,769	0,211	0,515
2818	0,286	0,436	0,444	0,531	0,695
2819	0,563	0,843	0,865	0,094	0,407
2875	0,667	1,013	1,029	-0,067	0,333
910	0,875	1,311	1,345	-0,283	0,119
2255	0,750	1,123	1,153	-0,182	0,257
1793	0,625	0,936	0,961	0,038	0,385
2153	0,750	1,123	1,153	-0,124	0,265
2154	0,563	0,843	0,865	0,175	0,429
2593	0,733	1,114	1,132	-0,108	0,232
2711	0,563	0,843	0,865	0,174	0,417
2800	0,625	0,936	0,961	-0,010	0,362
2801	0,563	0,843	0,865	0,123	0,398
2878	0,688	1,030	1,057	0,025	0,290
2483	0,917	1,373	1,399	-0,337	0,074
2522	0,688	1,030	1,057	0,024	0,303
2257	0,667	1,013	1,029	-0,089	0,289
1843	0,533	0,784	0,815	0,087	0,463
2858	0,786	1,185	1,220	-0,276	0,216
2069	0,875	1,311	1,345	-0,297	0,111
2067	0,867	1,291	1,336	-0,278	0,133
2608	0,667	1,013	1,029	-0,049	0,332
2713	0,875	1,311	1,345	-0,329	0,109
2560	0,667	1,013	1,029	-0,024	0,323
2114	0,769	1,169	1,201	-0,201	0,210
2141	0,688	1,030	1,057	0,017	0,286
2618	0,500	0,749	0,769	0,291	0,483
2619	0,563	0,843	0,865	0,184	0,411
1178	0,333	0,506	0,514	0,450	0,684
1026	0,667	1,013	1,029	-0,081	0,329

Studbook= número de identificação dos indivíduos de *L. chrysomelas* no *Studbook* atual da espécie; PHt= (proporção de locos heterozigotos em um indivíduo); Hs_obs= (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média observada); Hs_exp= (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média esperada); IR (parentesco interno) e HL (homozigose por loco).

Tabela 10 – Valores de heterozigosidade individual nos *L. chrysomelas* do CPRJ.

<i>Studbook</i>	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL
2485	0,733	1,103	1,138	-0,108	0,251
2209	0,625	0,936	0,961	0,015	0,371
2534	0,938	1,404	1,442	-0,305	0,055
2518	0,833	1,248	1,272	-0,298	0,158
2256	0,813	1,217	1,249	-0,276	0,171
2491	0,750	1,123	1,145	-0,156	0,264
2715	0,500	0,749	0,769	0,162	0,511
2037	0,625	0,936	0,961	0,050	0,382
2177	0,750	1,123	1,153	-0,144	0,217
1760	0,563	0,843	0,865	0,120	0,406
1783	0,813	1,217	1,249	-0,266	0,175
2048	0,688	1,030	1,057	-0,091	0,297
1627	0,500	0,749	0,769	0,169	0,523
2695	0,938	1,404	1,442	-0,408	0,066
2856	0,688	1,030	1,057	-0,027	0,308
2519	0,563	0,843	0,865	0,114	0,454
2820	0,750	1,123	1,153	-0,182	0,243
2535	0,733	1,114	1,132	-0,112	0,257
1626	0,667	1,013	1,029	0,082	0,295
1738	0,750	1,123	1,153	-0,161	0,245
2070	0,467	0,709	0,720	0,225	0,552
2877	0,500	0,756	0,778	0,173	0,502

Studbook= número de identificação dos indivíduos de *L. chrysomelas* no *Studbook* atual da espécie; PHt= (proporção de locos heterozigotos em um indivíduo); Hs_obs= (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média observada); Hs_exp= (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média esperada); IR (parentesco interno) e HL (homozigose por loco).

APÊNDICE B – Heterozigosidade Individual – FPZSP

Tabela 12 – Valores de heterozigosidade individual nos *L. chrysomelas* da FPZSP.

<i>Studbook</i>	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL
2699	0,563	1,060	0,938	0,212	0,401
2435	0,438	0,825	0,730	0,251	0,531
1915	0,750	1,413	1,251	-0,188	0,190
2309	0,500	0,942	0,834	0,136	0,443
2331	0,500	0,942	0,834	0,296	0,502
1954	0,438	0,825	0,730	0,330	0,554
1850	0,688	1,296	1,147	-0,005	0,262
1408	0,438	0,825	0,730	0,208	0,504
1657	0,438	0,825	0,730	0,266	0,525
1803	0,625	1,178	1,042	-0,123	0,289
1825	0,813	1,531	1,355	-0,323	0,170
2093	0,438	0,825	0,730	0,262	0,507
2385	0,500	0,942	0,834	0,199	0,472
2539	0,313	0,589	0,521	0,497	0,664
2550	0,500	0,942	0,834	0,121	0,456
2551	0,438	0,825	0,730	0,216	0,491
2639	0,688	1,296	1,147	-0,105	0,268
2640	0,750	1,413	1,251	-0,317	0,180
2641	0,500	0,942	0,834	0,085	0,454
2694	0,625	1,178	1,042	-0,113	0,310
2704	0,563	1,060	0,938	-0,047	0,335
2705	0,500	0,942	0,834	0,035	0,421
2760	0,563	1,060	0,938	0,025	0,416
2761	0,563	1,060	0,938	0,061	0,363
2774	0,500	0,942	0,834	0,109	0,484
2848	0,750	1,413	1,251	-0,279	0,215
2384	0,313	0,589	0,521	0,512	0,647
2697	0,625	1,178	1,042	-0,036	0,301
2564	0,500	0,942	0,834	0,276	0,513
2385	0,625	1,178	1,042	-0,059	0,323
2079	0,438	0,825	0,730	0,216	0,568
2109	0,563	1,060	0,938	0,012	0,436
2245	0,313	0,589	0,521	0,506	0,736

Studbook= número de identificação dos indivíduos de *L. chrysomelas* no *Studbook* atual da espécie; PHt= (proporção de locos heterozigotos em um indivíduo); Hs_obs= (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média observada); Hs_exp= (heterozigosidade padronizada baseada na heterozigosidade média esperada); IR (parentesco interno) e HL (homozigose por loco).

Tabela 12 – Valores de heterozigidade individual nos *L. chrysomelas* da FPZSP.

<i>Studbook</i>	PHt	Hs_obs	Hs_exp	IR	HL
2273	0,438	0,825	0,730	0,208	0,523
2289	0,125	0,236	0,208	0,828	0,830
2339	0,375	0,707	0,625	0,419	0,609
2340	0,563	1,060	0,938	0,058	0,405
2372	0,500	0,942	0,834	0,053	0,428
2373	0,563	1,060	0,938	0,037	0,402
2533	0,563	1,060	0,938	0,025	0,423
2538	0,563	1,060	0,938	0,084	0,367
2563	0,750	1,413	1,251	-0,280	0,210
2645	0,438	0,825	0,730	0,150	0,486
2703	0,563	1,060	0,938	0,064	0,394
2710	0,688	1,296	1,147	-0,082	0,308
2722	0,625	1,178	1,042	-0,017	0,322
2723	0,688	1,296	1,147	-0,098	0,307
2846	0,438	0,825	0,730	0,254	0,568
2717	0,375	0,707	0,625	0,363	0,626

Studbook= número de identificação dos indivíduos de *L. chrysomelas* no *Studbook* atual da espécie; PHt= (proporção de locos heterozigotos em um indivíduo); Hs_obs= (heterozigidade padronizada baseada na heterozigidade média observada); Hs_exp= (heterozigidade padronizada baseada na heterozigidade média esperada); IR (parentesco interno) e HL (homozigose por loco).