

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Censo populacional e avaliação da variabilidade genética das populações de
mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) na Floresta
Nacional de Capão Bonito- SP**

Lucas Tadeu Peloggia Caldano

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

São Carlos, SP
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Censo populacional e avaliação da variabilidade genética das populações de
mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) na Floresta
Nacional de Capão Bonito- SP**

Lucas Tadeu Peloggia Caldano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: **Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior**

São Carlos, SP
2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C145cp Caldano, Lucas Tadeu Peloggia.
 Censo populacional e avaliação da variabilidade genética
das populações de mico-leão-preto (*Leontopithecus
chrysopygus* Mikan, 1823) na Floresta Nacional de Capão
Bonito- SP / Lucas Tadeu Peloggia Caldano. -- São Carlos :
UFSCar, 2014.
 62 f.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

 1. Conservação. 2. Primatas. 3. Censo populacional. 4.
 Sítios de pernoite. I. Título.

CDD: 574.5247 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

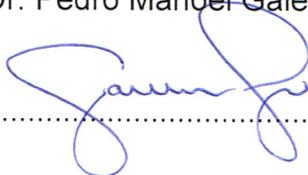
**“Avaliação da variabilidade das populações de mico-leão-preto
(*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) na Floresta Nacional de
Capão Bonito-SP”**

Dissertação de Mestrado de

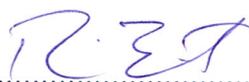
LUCAS TADEU PELOGGIA CALDANO

Banca Examinadora

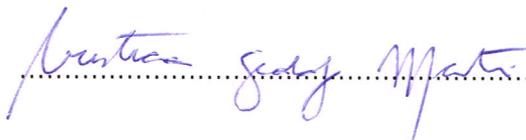
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior



Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito



Profa. Dra. Cristiana Saddy Martins



Dedico esse trabalho aos meus pais, Luis Antônio e Maria Regina, as minhas irmãs, Renata e Regiane e minha namorada Isabela. Dedico também a um grande amigo que partiu para o Oriente Eterno, Cícero José da Silva Filho profundo conhecedor dos micos leões pretos como poucos e que infelizmente finalizou o seu ciclo aqui na Terra.

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer ao Professor Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, pela oportunidade de poder participar do seu laboratório e poder desenvolver e estudar esses Primatas incríveis e carentes de estudos, principalmente genéticos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida, colaborando com desenvolvimento da pesquisa.

Ao CNPq, pelo auxílio Financeiro.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pelo auxílio de campo e a todos funcionários e estagiários que fizeram parte de alguma forma deste projeto, principalmente ao Biólogo Cauê Monticelli e ao Médico Veterinário Rodrigo Pinho Gomes Lopez (GRILO).

Ao IPE, Instituto de Pesquisas Ecológicas, juntamente com o Christopher Knooge coordenador do projeto mico-leão-preto do IPÊ, que gentilmente liberaram os auxiliares de campo Cícero José da Silva Filho (Cicinho) e o José Wilson Alves (Wilsinho), que além de vastas experiências de campo na coleta desses animais, nos proporcionaram várias horas de alegrias, risos, descontrações e amizade e principalmente conhecimento e vivência de campo.

Ao ICMBio, Floresta Nacional de Capão Bonito, em especial a Verônica Silva Veloso (Chefe da Flona) e a Marli Ramos (Sub-Chefe da Flona) e a todos os funcionários pela hospitalidade e convivência e relatos cedidos.

Agradeço a TODOS os amigos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação pelas experiências trocadas, dúvidas esclarecidas, horas de companhia e descontrações e grandes amizades feitas para toda a vida.

Agradeço a minha namorada Isabela, que sempre soube me apoiar e estar comigo em todos os momentos dando força e me apoiando em todas as decisões.

Por último agradeço aos meus Pais, por acreditarem e confiarem em mim e não mediram esforços para me ajudar e auxiliar em decisões.

Obrigado!!

Resumo

O gênero *Leontopithecus* é constituído pelas espécies de primatas de maior porte dentro da família Callitrichidae e sua distribuição está restrita aos remanescentes de Mata Atlântica brasileira. O mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) é um primata endêmico da Mata Atlântica do estado de São Paulo, e que se encontra criticamente ameaçado de extinção, uma vez que seu habitat vem sendo significativamente reduzido a pequenas áreas de mata nativa. A destruição e fragmentação do seu habitat natural pode aumentar o isolamento entre os fragmentos e elevar substancialmente os riscos de extinção da espécie devido à perda da variabilidade genética e consequente redução do seu potencial adaptativo/evolutivo. É importante ter uma ideia do número mínimo populacional existente, principalmente em se tratar de uma espécie ameaçada de extinção. Informações dessa categoria juntamente com as informações genéticas poderão servir para a elaboração de estratégias conservacionistas para a espécie. Para isso foi realizado um esforço amostral de cinco campanhas, com duração de 1 mês por campanha, percorrendo todas as áreas em potencial habitat para a espécie dentro da Floresta Nacional de Capão Bonito-SP, com auxílio de um *playback*, contando os grupos e o número de indivíduos por grupo a fim de realizar um censo populacional da área. Identificamos ao final do censo 35 indivíduos, distribuídos em sete grupos. Desses animais obtivemos sucesso de captura de 10 animais, representando dois grupos de indivíduos, dos quais foram extraídas amostras para os estudos genéticos. Para as análises genéticas foram utilizados 20 *loci* de marcadores moleculares microssatélites. A diversidade genética encontrada foi baixa, revelando um número de alelos médio de 2,42. O parentesco revelou que os indivíduos de um grupo não tem relação com o outro grupo. Embora o número absoluto de animais geneticamente analisados seja baixo, os resultados podem ser representativos da população da Floresta Nacional de Capão Bonito, considerando o censo populacional. Dessa forma, este trabalho reúne informações que colaboram com o aumento do conhecimento sobre aspectos genéticos e ecológicos do mico-leão-preto, e que juntamente com outros trabalhos pode fornecer dados importantes para a conservação da espécie.

Palavras-Chave: Conservação. Primatas. Censo populacional. Sítios de pernoite.

Abstract

The genus *Leontopithecus* consists of primate species with the largest size within the family Callitrichidae and their distribution is restricted to the remaining Brazilian Atlantic Forest. The black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*) is an endemic primate from the Atlantic Forest in the São Paulo state, and currently is critically endangered since his habitat has been significantly reduced to small areas of native forest. The destruction and fragmentation of its natural habitat and the reduction of food resources may increase the isolation among fragments and substantially raise the risk of species extinction due to loss of genetic variability and consequent reduction of its adaptive/evolutionary potential. It is of paramount importance to have an estimation of the current population minimum size, especially if a species is classified as endangered. Information about the abovementioned subject associated with genetic information could be used for the development of conservation strategies of the species. Therefore, we traversed all areas of potential habitat for the species within the Floresta Nacional de Capão Bonito-SP using a playback, counting the number of groups and of individuals per group in order to conduct a census in the area. It was identified 35 individuals at the end of the census, which were divided into seven groups. These animals were successfully capture 10 animals representing two groups of individuals, of which samples were taken for genetic studies. For genetic analysis microsatellite markers were used. Genetic diversity was low, revealing an average of 2.42 alleles. Kinship revealed that individuals in a group have no relation to another group. Although the absolute number of genetically analyzed is low, the results may be representative of the population of Floresta Nacional de Capão Bonito, considering the total population census. Thus, this work brings together information that contribute to increase the knowledge about genetic and ecological aspects of the black lion tamarin, which coupled with other studies can provide important information for the conservation of the species.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de <i>L. chrysopygus</i> encontrados na Floresta Nacional de Capão Bonito	24
Tabela 2: Número de pernoites em cada tipo de sítios de quatro grupos da Floresta Nacional de Capão Bonito	26
Tabela 3: Sequências de <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primer's</i> de microsatélite específico para <i>Leontopithecus chrysopygus</i> com as temperaturas de anelamento. (PEREZ SWEENEY et al., 2005).....	38
Tabela 4: Sequências de <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primer's</i> de microsatélite descritos para <i>Leontopithecus chrysomelas</i> (GALBUSERA; GILLEMOT, 2008) e <i>Leontopithecus rosalia</i> (GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER; 2001)	39
Tabela 5: Informações sobre os indivíduos dos dois grupos capturados	42
Tabela 6: Informações dos <i>loci</i> de microsatélite utilizados nas análises	44
Tabela 7: Características dos <i>loci</i> de microsatélite e dados de diversidade genética.....	45
Tabela 8: Relação de parentesco entre os indivíduos do grupo 1.....	46
Tabela 9: Relação de parentesco entre os indivíduos do grupo 2.....	46
Tabela 10: Relação de parentesco entre os indivíduos dos dois grupos.....	47

Lista de Figuras

- Figura 1:** Cobertura original e remanescentes de Mata Atlântica. (Adaptado de: São Paulo, Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar, 2006)..... 11
- Figura 2:** Indivíduo de *Leontopithecus chrysopygus* na Floresta Nacional de Capão Bonito). 12
- Figura 3:** Distribuição original e atual do gênero *Leontopithecus*..... 13
- Figura 4:** Foto de um indivíduo na Floresta Nacional de Capão Bonito..... 14
- Figura 5:** Fotos de plantações dentro da Floresta Nacional de Capão Bonito. A) foto tirada da plantação de Araucária e B) foto tirada da plantação de Pinus 16
- Figura 6:** Mapa da distribuição original (sombreado) e atual (pontos) da espécie *Leontopithecus chrysopygus*. 16
- Figura 7:** Mapa do Estado de São Paulo mostrando a área de distribuição do mico-leão-preto. Os números indicam as áreas de ocorrência das populações atualmente conhecidas. (Programa de conservação do mico-leão-preto/IPE).19
- Figura 8:** Mapa da vegetação da Floresta Nacional de Capão Bonito 21
- Figura 9:** Utilização do *playback*. 22
- Figura 10:** Fotos na Floresta Nacional de Capão Bonito de sítios de pernoite de *L. chrysopygus*. A) Emaranhado de cipó onde o grupo Pirambeira 1 já estava alocado para passar a noite. B) Inserção de oco de coqueiro onde o grupo da ponte passou a noite C) Oco de árvore onde o grupo do paredão foi capturado D) Emaranhado na copa de uma araucária onde o grupo Pirambeira 1 estava alocado para passar a noite..... 25
- Figura 11:** Fotos do rio Apiaí Mirim com pontos de travessia para os micos leões preto. A) Foto de uma travessia do grupo do Paredão. B) Foto tirada de vários pontos de travessia do grupo da ponte 27
- Figura 12 :** Foto de uma árvore com um oco em potencial dormitório para a espécie *Leontopithecus chrysopygus*.. 32
- Figura 13:** Fotos mostrando a utilização do rádio colar. A) indivíduo da espécie *Leontopithecus chrysopygus* com rádio colar. B) Foto de um rádio colar 33
- Figura 14:** Foto com o aparelho de termógrafo, evidenciando a variação de calor em um oco em uma árvore..... 34

- Figura 15:** Fotos da ceva com frutas. A) Frutas colocadas na plataforma. B) Foto da ceva elevada na altura das árvores..... 34
- Figura 16:** Foto dos procedimentos realizados com os indivíduos de *Leontopithecis chrysopygus* pelos Biólogos e Médicos Veterinários da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.. 35
- Figura 17:** Reação de amplificação usando a “cauda” universal e o primer M13 marcado com fluoróforo (Adaptado de Schuelke, 2000). (A e B) são os primers para amplificação do fragmento de interesse. (C) é o primer M13 marcado com o fluóroforo. (D) é amostra de DNA incorporado com o primer forward contendo a “cauda” de 18 pb complementar ao primer M13. (E e F) é o ciclo específico do M13, onde ele é incorporado ao produto de PCR. 40
- Figura 18:** Foto de dentro do oco no momento da captura 43

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	10
2. Capítulo 1: Censo demográfico do mico-leão-preto na Floresta Nacional de Capão Bonito (SP)	18
2.1 Introdução	18
2.2 Objetivos	20
2.2.1 Objetivos específicos	20
2.3 Material e métodos	20
2.3.1 Área de estudo.....	20
2.3.2 Censo demográfico	22
2.3.3 Caracterização dos sítios de pernoite	23
2.4 Resultados	23
2.4.1 Sítios de pernoite	25
2.5 Discussão	26
3. Capítulo 2: Diversidade genética e relações de parentesco em grupos de Leontopithecus chrysopygus na Floresta Nacional de Capão Bonito	29
3.1 Introdução	29
3.2 Objetivos	31
3.2.1 Objetivos específicos	31
3.3 Material e métodos	31
3.3.1 Obtenção das amostras	31
3.3.1.1 <i>Captura</i>	31
3.3.1.2 <i>Coleta de sangue</i>	35
3.3.1.3 <i>Coleta de pelos</i>	36
3.3.2. Extração de DNA	36
3.3.2.1 <i>Extração de DNA de sangue</i>	36
3.3.2.2 <i>Extração de DNA de pelos</i>	37
3.3.3. Amplificação dos loci	38
3.3.4 Análises populacionais.....	41
3.3.5 Análises de parentesco.....	42
3.4 Resultados	42
3.4.1 Amostragem.....	42
3.4.2 Diversidade genética	44
3.4.3 Análises entre os dois grupos	45
3.4.3 Níveis de parentesco	46
3.5 Discussão	48
4. Conclusão	51
5. Bibliografia	53

1. Introdução Geral

A Mata Atlântica originalmente estendia-se por toda a costa brasileira, do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte, abrangendo também o centro do país e parte do território argentino e paraguaio (PERES, 2010). Atualmente é considerada um *hotspot* mundial para a conservação (MYERS, 1988; PRESSEY et al., 1993) devido á elevada biodiversidade, boa parte endêmica, e por ser um dos biomas mais ameaçados do planeta.

Segundo Ribeiro et al., (2009) atualmente restam cerca de 12% a 16% dos 150 milhões de hectares de sua cobertura original. O maior remanescente está localizado na Serra do Mar, nos estados de São Paulo e sul do Rio de Janeiro, representando 7% do que ainda resta de sua cobertura atual. Além disso, a maior parte do que resta de mata nativa encontra-se em fragmentos menores que 250 hectares e apenas 9,3% desses remanescentes estão dentro de Unidades de Conservação (Figura 1).

No estado de São Paulo, segundo Dean (2004) a destruição da Mata Atlântica foi recente. No ano de 1962 os remanescentes desse bioma representavam cerca de 29% da sua cobertura original, mas atualmente sua extensão encontra-se reduzida a 13,94% (NALON; MATTOS; FRANCO, 2008). Esses fragmentos ainda abrigam inúmeras espécies ameaçadas de extinção, sendo algumas endêmicas da Mata Atlântica e do estado de São Paulo, como é o exemplo do mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*), alvo deste estudo (Figura 2).

A perda e fragmentação do habitat são consideradas as principais ameaças para a maioria das espécies (CHIVIAN, 2002; CZECH; KRAUSMAN; DEVERS, 2000) podendo causar o impedimento do fluxo gênico (FRANKHAM, 1996) e a perda da variabilidade genética (HELLER; OKELLO; SIEGISMUND, 2010), o que pode acarretar a extinção de espécies (SPIELMAN, 2004).

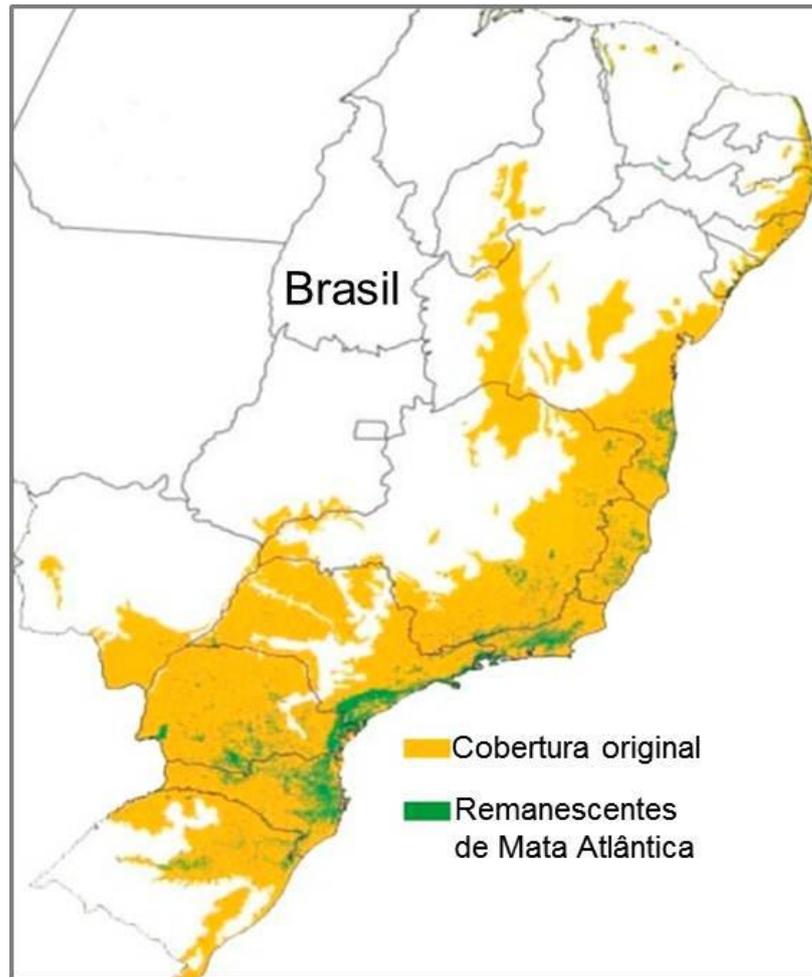


Figura 1: Cobertura original e Remanescentes de Mata Atlântica. (Adaptado de: São Paulo, Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar, 2006).

Calcula-se que as ações antrópicas sejam responsáveis pela extinção de 5% a 20% das espécies (LAWTON; MAY, 1995), elevando a taxa de extinção de 100 a 1.000 vezes mais que em situações sem a intervenção humana (PIMM et al., 1996). Dados similares podem ser evidenciados com os mamíferos, cuja destruição do habitat é considerada o principal fator de ameaça para 88,4% das espécies do grupo (IBAMA; MMA, 2008).

Espécies endêmicas são as mais vulneráveis em biomas gravemente ameaçados como é o caso da Mata Atlântica. Rylands e Rodriguez-Luna (2000), relataram o endemismo marcante em primatas e destacaram que das 24 espécies encontradas na Mata Atlântica, 21 não ocorrem em nenhum outro lugar.



Figura 2: Indivíduo de *Leontopithecus chrysopygus* na Floresta Nacional de Capão Bonito (Foto: Carlos Nader).

Dentre as espécies de primatas, destaca-se o gênero *Leontopithecus* o qual é constituído por quatro espécies morfologicamente distintas, todas endêmicas de Mata Atlântica. Embora os limites políticos do estado não tenham significado na distribuição da espécie, curiosamente cada uma é endêmica de um estado do país, segundo o livro da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MACHADO; MARTINS; DRUMOND, 2005).

A espécie *Leontopithecus rosalia* (mico-leão-dourado) é endêmico do estado do Rio de Janeiro, *Leontopithecus chrysomelas* (mico-leão-de-cara-dourada) no sudeste da Bahia, *Leontopithecus caissara* (mico-leão-de-cara-preta) endêmico do Paraná e o *Leontopithecus chrysopygus* (mico-leão-preto) endêmico do estado de São Paulo (Figura 3).

Os mico-leões brasileiros sem dúvida são capazes de atrair o interesse da sociedade para apoiar a sua conservação e conseqüentemente conservar o ambiente que a espécie está inserida. Assim, essas espécies são consideradas "Espécies Bandeiras" devido à aparência e aos comportamentos carismáticos

inerentes, e que podem atrair fundos e atenção para grandes causas ambientais. (DIETZ et al., 1994b).

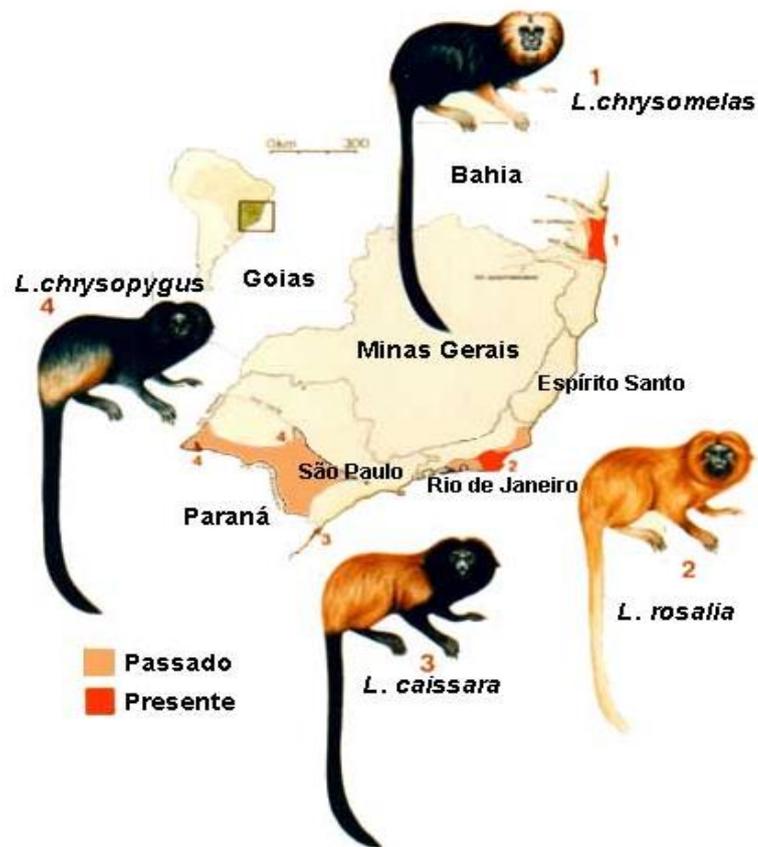


Figura 3: Distribuição original e atual do gênero *Leontopithecus*. Mapa por Stephen D. Nash/ Conservation International

O mico-leão-preto foi descrito em 1822 na região de Sorocaba- SP e sua área de distribuição original incluía as partes baixas da Mata Atlântica do interior entre os rios Tietê e Paranapanema (KLEIMAN; RYLANDS, 2002). Essa espécie está entre as mais ameaçadas do mundo (SEAL; BALLOU; VALLADARES-PADUA, 1990, PHVA 2005), classificada como em perigo de extinção segundo a União Internacional Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN 2012) e no livro vermelho de animais ameaçados de extinção (IBAMA 2008) encontra-se criticamente ameaçado de extinção.

É um primata de pequeno porte e que possui hábito diurno (RYLANDS, 1993), pesa aproximadamente 600g (adulto), tem um comprimento da cabeça ao corpo de 32 cm, e a cauda possui cerca de 35 cm (KLEIMAN, et al., 1988; VALLADARES-PADUA, 1993). Essa espécie não apresenta dimorfismo sexual e sua cor é

predominantemente preta com uma linha dourada ou avermelhada sobre a metade inferior (distal).

Como característica da espécie e do gênero, a face é quase nua, rodeada por uma juba (KLEIMAN; HOAGE; GREEN, 1988). Os micos-leões-pretos são frugí-insetívoros, (DIETZ; PERES; PINDER, 1997), com a dieta da espécie constituída essencialmente por néctar, pequenos animais e frutos pequenos, macios e doces com muita poupa. Frutos grandes são ocasionalmente consumidos, alguns dos quais são dispersos pelo próprio mico-leão-preto (DIETZ; PERES; PINDER, 1997; PASSOS; KEUROGHLIAN, 1999; RYLANDS, 1989b, 1993) (Figura 4).

É uma espécie que se comporta como um exímio predador de invertebrados e pequenos vertebrados, necessitando de diferentes micro-habitats para forrageio (COIMBRA FILHO, 1981).

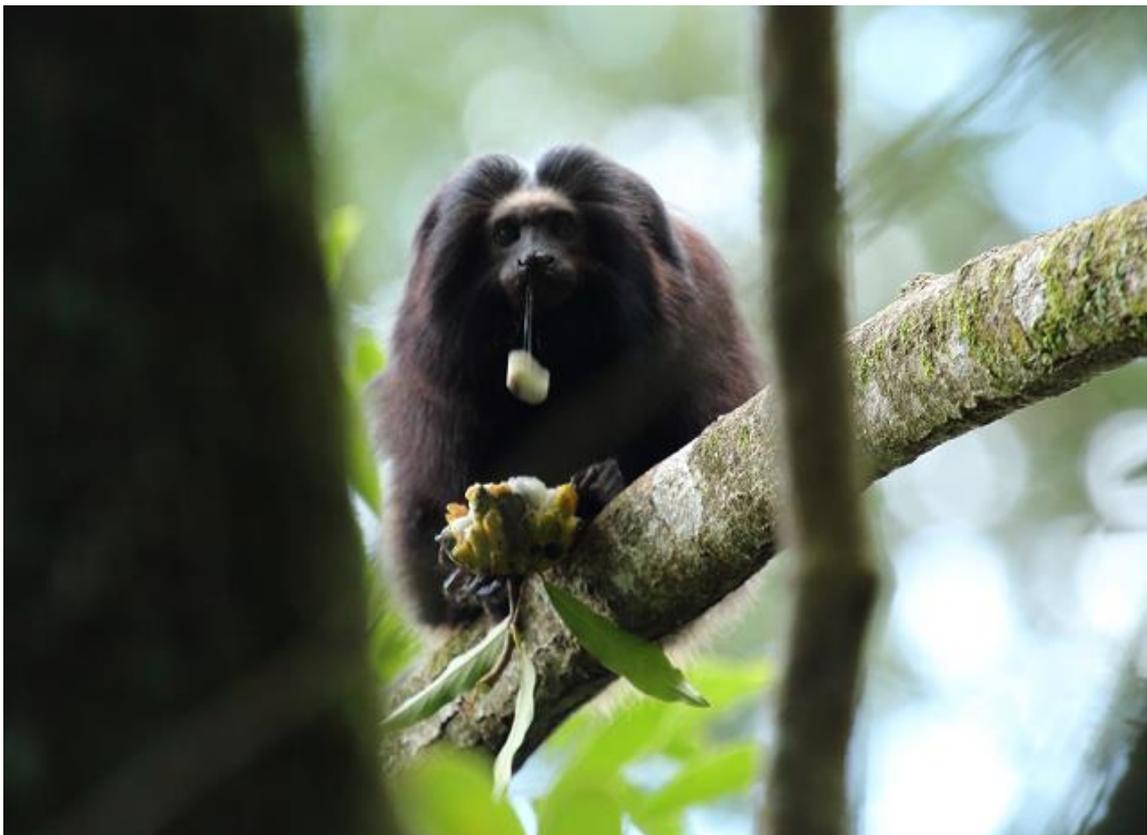


Figura 4: Foto tirada de um indivíduo na Floresta Nacional de Capão Bonito. Foto: Daniel Fernandes Perrella

A espécie foi considerada extinta em 1905, estando por 65 anos desaparecida (COIMBRA FILHO, 1970b, 1976a). Sua redescoberta se deu no Parque Estadual do Morro do Diabo em Teodoro Sampaio- SP em 1970b (COIMBRA FILHO, 1970), onde foram localizadas pequenas populações pelo pesquisador brasileiro Aldemar Coimbra Filho. A espécie habita fragmentos nas regiões sudoeste e oeste do estado de São Paulo (SEAL; BALLOU; VALLADARES-PADUA, 1990).

Valladares-Padua (1987) encontrou novas populações de mico-leão-preto em propriedades particulares, tais como a Fazenda Tucano, Fazenda Rosanella, Fazenda Ponte Branca, Fazenda Ribeirão Bonito no pontal do Paranapanema e na Fazenda Rio Claro em Lençóis Paulista.

A partir de 2002, foi realizado um levantamento de campo no município de Buri-SP, localizado no sudeste do estado de São Paulo, onde dois grupos foram encontrados em uma mata ciliar do rio Apiaí-Guaçu. Posteriormente foram encontrados mais grupos na região de Capão Bonito-SP (LIMA et al., 2003; RÖHE; ANTUNES; TÓFOLI, 2003), onde está situada a Floresta Nacional de Capão Bonito.

Criada em 1944, a princípio com denominação de Parque Florestal Getúlio Vargas, a Floresta Nacional de Capão Bonito (FLONA Capão Bonito) tem uma área total de 3.615,10 hectares. Localiza-se na região sudoeste do estado de São Paulo, a 200 km da capital paulista, na região do Vale da Serra do Paranapiacaba, na parte oeste do Município de Capão Bonito e na parte leste do Município de Buri, apresentando florestas ripárias, localizada na bacia do Rio Apiaí-Guaçu.

Essas formações vegetais são extremamente importantes em termos ecológicos, pois circundam córregos, grandes rios, lagos e corpos d'água, e desse modo, configuram recursos essenciais para a sobrevivência da fauna das regiões da Mata Atlântica, uma vez que provêm refúgio, água e alimento. Essas florestas funcionam como corredores de penetração no cerrado para espécies de animais provenientes da Mata Atlântica, levando a uma importante permuta genética (fluxo gênico) (REDFORD; FONSECA, 1986).

Além das matas ciliares, a cobertura vegetal da Floresta Nacional de Capão Bonito é predominantemente constituída por reflorestamento com espécies nativas (ex: *Araucaria angustifolia*) e exóticas (ex: *Pinus elliottii*) (Figura 5).



Figura 5: Fotos de plantações dentro da Floresta Nacional de Capão Bonito. A) foto tirada da plantação de Araucária e B) foto tirada da plantação de *Pinus*.

Ao se analisar o mapa do estado de São Paulo, nota-se uma faixa do extremo oeste do estado, onde está localizado o Pontal do Paranapanema, até o sudoeste do Estado, onde se localiza os fragmentos de mata na região de Capão Bonito, que é considerado perto do limite sudeste da área geográfica do mico-leão-preto (COIMBRA FILHO, 1976b)(Figura 6).

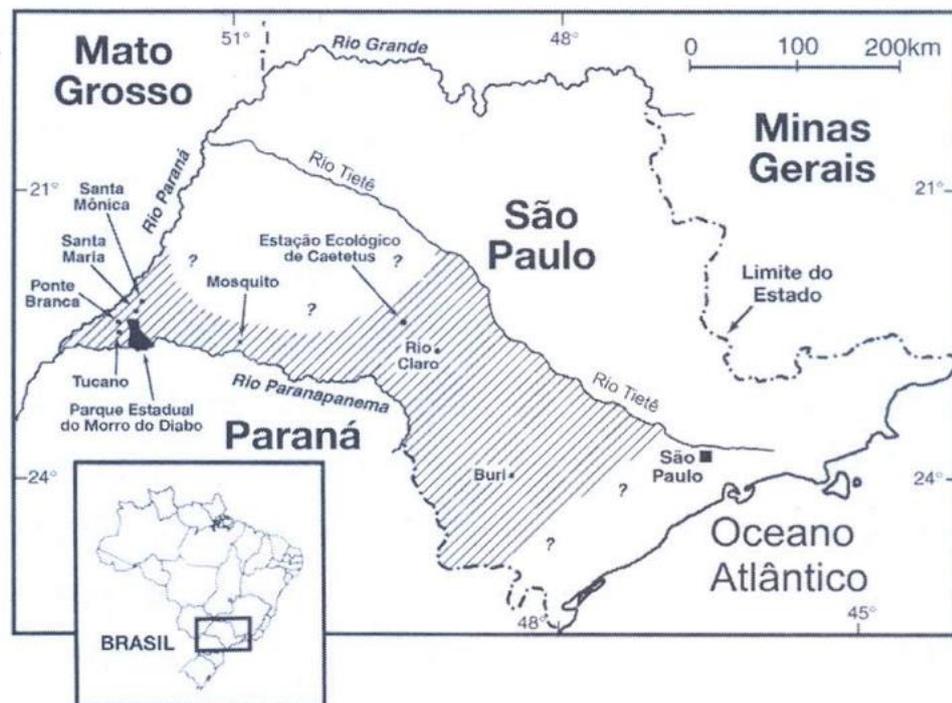


Figura 6: Mapa da distribuição original (sombreado) e atual (pontos) da espécie *Leontopithecus chrysopygus*. Mapa por Stephen D. Nash/ Conservation International.

A realização dos censos são importante para verificar o *status* da espécie na natureza, principalmente para saber se a população está aumentando, se o número de grupos está aumentando e se novas áreas de ocorrência original da espécie estão sendo ocupadas.

O número populacional passou por algumas atualizações ao longo dos anos e novas populações de mico-leão-preto vêm sendo redescobertas nas áreas de ocorrência original da espécie, onde havia sido dada como extinta (PHVA briefing book 2005; PARANHOS; ROPER, 2006; VALLADARES-PADUA; CULLEN JUNIOR, 1994).

Pouco se conhece sobre a variação genética desses animais. Os trabalhos realizados com os *L. chrysopygus* reportam uma baixa variação genética do gênero *Leotopithecus*, (FORMAN et al. 1986; PEREZ-SWEENEY, 2005; VALLADARES-PADUA, 1987), portanto estudos genéticos nas demais populações são necessários para melhor compreensão da distribuição da variação genética total dessa espécie, para o estabelecimento de estratégias conservacionistas e que possibilitem a manutenção das populações e das relações ecológicas dependentes da presença dessa espécie.

2. Capítulo 1: Censo demográfico do mico-leão-preto na Floresta Nacional de Capão Bonito (SP)

2.1. Introdução

A Mata Atlântica abriga a maior parte da nossa fauna ameaçada (68,9%) (IBAMA; MMA, 2008). Dentre as 276 espécies de mamíferos que ocorrem nesse bioma, estão também as espécies de primatas como *Leontopithecus chrysopygus*, *Callithrix aurita*, *Allouata guariba*, *Brachyteles hypoxanthus*. O território brasileiro possui grande diversidade de *habitat*, fato que favoreceu a sua extraordinária riqueza primatológica, aliás, a mais significativa dentre todas as unidades políticas mundiais (COIMBRA FILHO; MITTERMEIER, 1973).

Porém, esses ecossistemas florestais estão muito degradados ou praticamente extintos o que, em parte, causa o desaparecimento da fauna primatológica (COIMBRA FILHO et al., 1983). A maior parte do que resta de mata nativa está espalhada em pequenos fragmentos (menores que 250 ha) que representam 42% da cobertura atual da Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2009)

O mico-leão-preto é um desses primatas que cada vez mais vem sofrendo com a destruição de seu *habitat*. Por ser endêmico do estado mais populoso do país (São Paulo), sofreu com a destruição acelerada de seu *habitat*, que deu lugar a pastagens e plantações. O maior dos remanescentes de Mata Atlântica está situado na serra do mar e os micos-leões-pretos são restrito às florestas de planície (RYLANDS et al., 2008).

Originalmente a espécie ocorria na margem norte do rio Paranapanema, ao oeste até o rio Paraná e entre o alto rio Paranapanema e o rio Tietê no Estado de São Paulo (COIMBRA FILHO, 1976a, 1976b; HERSHKOVITZ, 1977; KLEIMAN; RYLANDS, 2002). Atualmente a espécie está desaparecida na maior parte de sua ocorrência original (HOLST et al. 2006; RÖHE; ANTUNES; TÓFOLI. 2003), sobrevivendo em oito regiões no estado de São Paulo (LIMA et al., 2003) (Figura 7).

A quantidade e qualidade de *habitat* disponível são alguns dos fatores que mais afetam a abundância e distribuição de uma espécie, influenciando na disponibilidade de recursos (comida, nutrientes, abrigo, local para procriação) e a diversidade de interações existentes (SOULÉ et al., 1986).

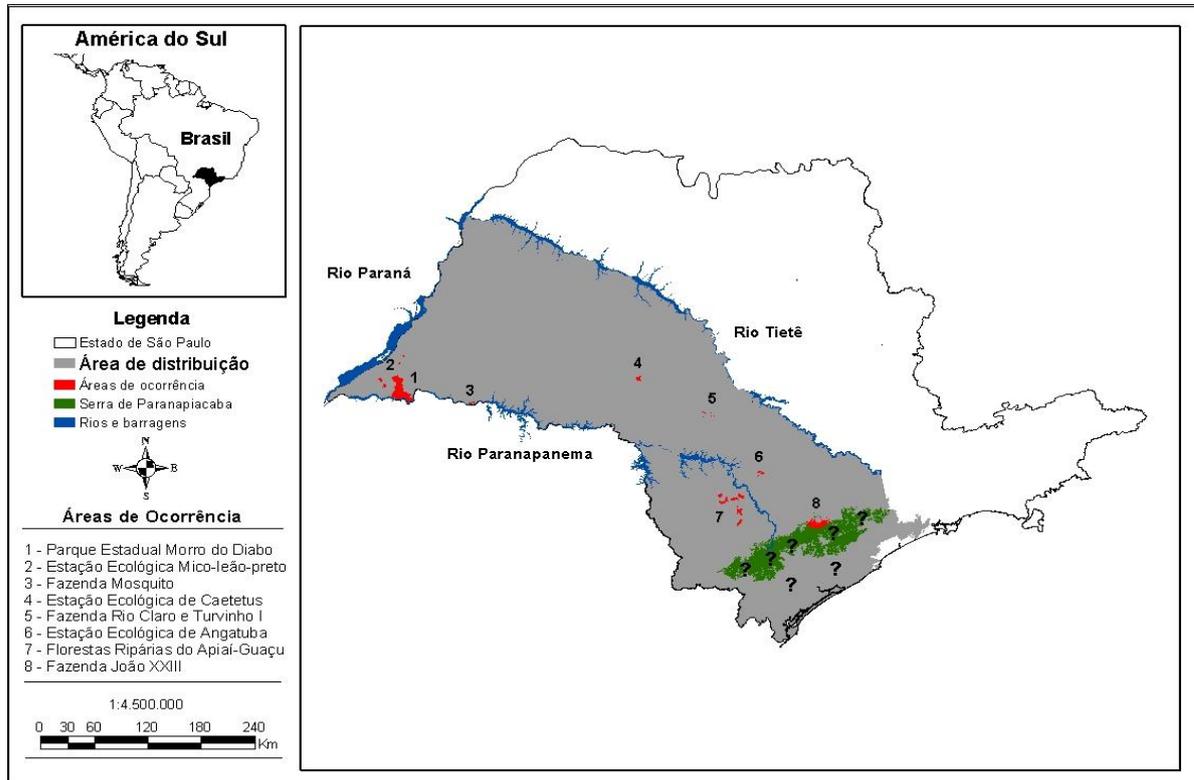


Figura 7: Mapa do Estado de São Paulo mostrando a área de distribuição do mico-leão-preto. Os números indicam as áreas de ocorrência das populações atualmente conhecidas. (Programa de conservação do mico-leão-preto/IPE).

Após o redescobrimto da espécie, Coimbra-Filho; Mittermeier, (1977) estimavam apenas 200 indivíduos de mico-leão-preto na natureza, em apenas uma região do estado, no Parque Estadual Morro do Diabo. Após 13 anos, em 1990, as estimativas eram de aproximadamente 900 indivíduos, localizados em sete regiões, das quais duas estão localizadas na região central do estado, a Estação Ecológica dos Caetetus e uma fazenda no município de Lençóis Paulista (VALLADARES-PADUA; CULLEN JUNIOR, 1994).

Em 2003, uma pequena população foi encontrada na região de Buri/Capão Bonito, que é considerada o limite sul de distribuição da espécie, encontrada nas matas ciliares dos rios Apiaí-Mirim e Apiaí-Guaçu (LIMA et al. 2003; RÖHE; ANTUNES; TÓFOLI, 2003). Em 2005, a análise de viabilidade populacional (PHVA briefing book), apresentou a estimativa de 12 indivíduos distribuídos em três grupos dentro da Flona de Capão Bonito.

Paranhos; Roper, (2006), em um estudo de estimativa populacional de mico-leão-preto no Parque Estadual Morro do Diabo, estimou a população em 1209 indivíduos.

Os esforços realizados para estimar o censo populacional de uma espécie são fundamentais para se elaborar estratégias conservacionistas adequadas, essas informações possibilita estabelecer números mínimos de animais existentes e populações mínimas viáveis (CULLEN JUNIOR; RUDRAN, 2003). Informações desse tipo são necessárias para o conhecimento da população e seu monitoramento ao longo do tempo, principalmente tratando-se de espécies ameaçadas de extinção.

Porém algumas dessas estimativas podem estar superestimando ou subestimando o tamanho populacional da espécie em alguns fragmentos, já que a metodologia utilizada leva em consideração a capacidade de suporte do fragmento, ou seja, a densidade x área do fragmento para estimar o tamanho populacional da área.

O presente trabalho pretende realizar o censo demográfico populacional da Floresta Nacional de Capão Bonito contando diretamente os indivíduos e os grupos.

2.2. Objetivo Geral:

Realizar o censo demográfico da população da Floresta Nacional de Capão Bonito (SP), por meio da contagem direta dos grupos e dos indivíduos e contribuir com os esforços de conservação da espécie.

2.2.1. Objetivos específicos:

- Identificar o tamanho dos grupos;
- Identificar e caracterizar os sítios de pernoite;

2.3. Material e métodos

2.3.1. Área de estudo

A Floresta Nacional de Capão Bonito está localizada entre os municípios de Capão Bonito e Buri, na região do Vale da Serra do Paranapiacaba, no sudoeste do estado de São Paulo, aproximadamente a 230 km da capital.

Foi criada em 1944 com objetivo de ser uma unidade de conservação de uso sustentável, tendo como foco básico o uso múltiplo da terra com ênfase na produção

e extração de madeira. Possui uma extensão de 4.344,33 hectares, sendo constituída de 23% de plantações de araucária (*Araucaria angustifolia*), 58% de pinheiros (*Pinus* sp), 6% de matas ciliares e 13% de outras culturas (Figura 8).

A Floresta Nacional de Capão Bonito conta com dois rios de maior destaque, o rio Paranapitanga e o rio Apiaí Mirim, o primeiro localizado na divisa leste da propriedade e o segundo margeando a borda oeste, além de abrigar nascentes de água, córregos e açudes.

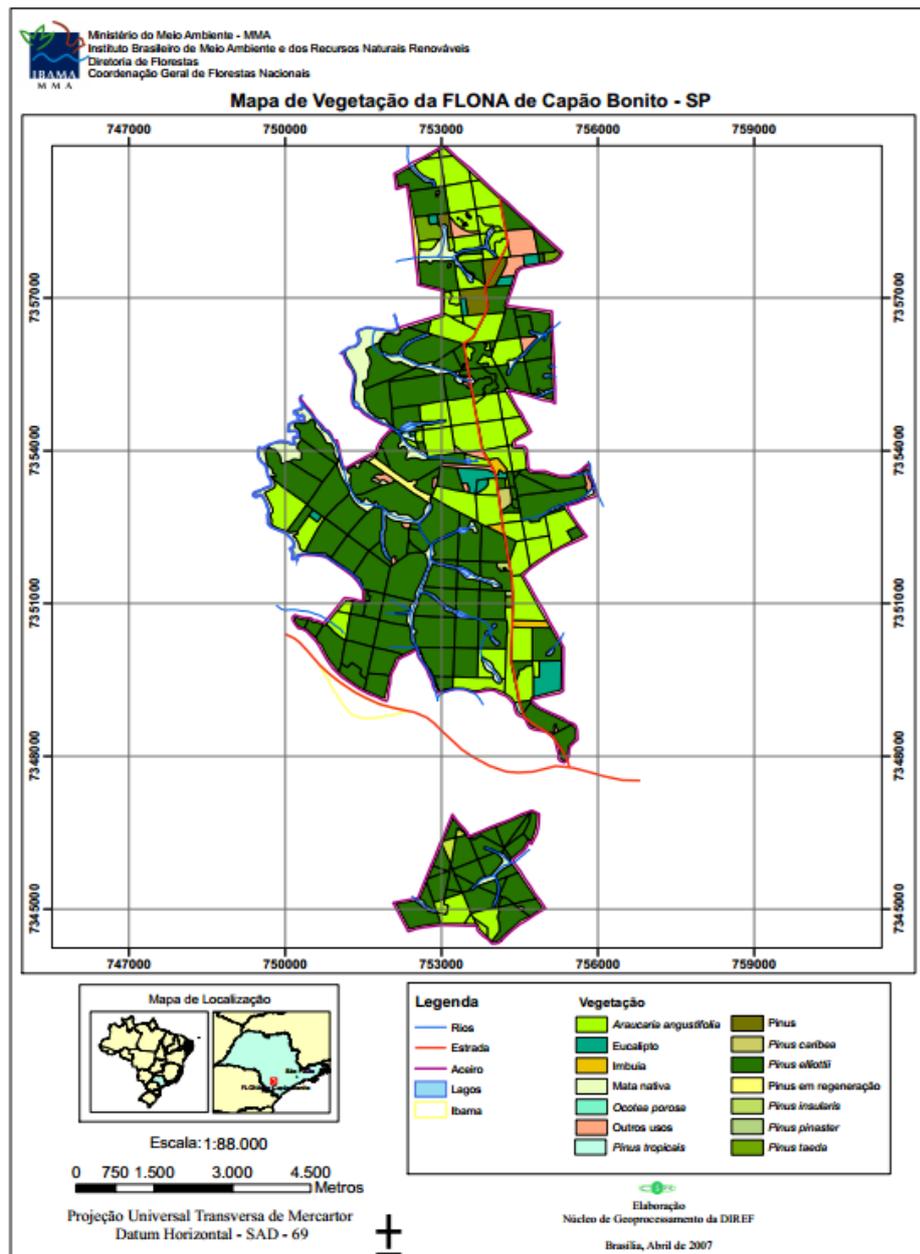


Figura 8: Mapa da vegetação da Floresta Nacional de Capão Bonito.

A região é considerada o limite sul de distribuição da espécie *L. chrysopygus*, encontrada em pequenos fragmentos de mata e ao longo das matas ciliares do rio Apiaí-Mirim (COIMBRA FILHO, 1976; RYLANDS; KIERULFF; PINTO. 2002).

2.3.2. Censo demográfico

Percorremos todas as áreas de potencial habitat para a espécie dentro da FLONA de Capão Bonito, a fim de realizar um levantamento populacional, a contagem dos grupos existentes juntamente com as áreas de vida de cada grupo e o número de indivíduos por grupo. As áreas percorridas foram as matas ciliares dos rios Apiaí Mirim e Paranapitanga e as mata ciliares de pequenos córregos.

Para aumentar as chances de avistar os grupos de micos-leões-pretos, foi realizada uma varredura nas áreas de mata nativa, utilizando um aparelho de *playback* com a vocalização da espécie alvo (Figura 9) (MORAIS JUNIOR, 2005). A vocalização emitida pelo aparelho atinge um raio de 100 metros e tem o intuito de atrair o grupo da área para proteger seu território, uma vez que os *Leontopithecus* são territorialistas, permitindo que a equipe aviste o grupo e possa realizar a contagem.

Para isso foram realizadas cinco campanhas com duração de um mês, as observações de campo foram realizadas durante o dia inteiro.



Figura 9: Utilização do *playback*. Foto Carlos Nader.

Após a localização de cada grupo eram anotadas as seguintes informações, número de indivíduos, presença de infantes (indivíduo dependente da mãe, sendo carregado na barriga ou nas costas, todo o tempo ou a maior parte) e mês do encontro.

Após o encontro, os indivíduos eram seguidos pelos membros da equipe até o final das atividades diárias, algumas vezes até o lugar de pernoite, a fim de habituar o grupo com a presença da equipe. Desse modo era possível acompanhar as atividades do grupo sem que os mesmos se sentissem ameaçados e fugissem da equipe.

2.3.3. Caracterização dos sítios de pernoite

Ocos de árvores são locais predominantemente de abrigos noturnos para todas as espécies de micos-leões (KIERULFF et al. 2008). Os micos leões pretos utilizam especialmente esses abrigos, mas também podem utilizar outras estruturas para passar a noite (MAMEDE, 1997).

Registramos as informações dos sítios de pernoite como (oco de árvore, emaranhado de cipó, inserção da folha na copa de coqueiro, amontoado de folhas na copa de araucárias), se estava seco e altura na árvore.

2.4. Resultados

Apesar dos relatos de moradores da região, nenhum dos grupos foi visto nas áreas das matas ciliares do rio Paranapitanga.

Também não foi visto nenhum grupo andando pelas plantações de *Pinus* sp. Estas plantações não têm a característica de formarem sub-bosque, diferentemente das plantações de *Araucaria angustifera*, onde foram avistados os micos-leões-pretos. Esses animais utilizavam suas copas e sub-bosques para se locomover e passar a noite. Os micos leões pretos utilizavam as araucárias nas bordas das matas, na divisa com a mata nativa, não se adentrando muito nessas plantações.

Nos 6% remanescentes de área nativa encontrada na FLONA de Capão Bonito, foram identificados sete grupos de *L. chrysopygus* (Tabela 1), sendo que cinco grupos (Paredão, Ponte, Pirambeira 2, Manso, Bambu) estavam nas margens

do rio Apiaí Mirim e sua área de vida se estendia pelas duas margens do rio. Os outros dois grupos (Pirambeira 1 e o grupo dos porcos) encontravam-se em mata ciliar de pequenos córregos.

Tabela 1: Grupos de *L. chrysopygus* encontrados na Floresta Nacional de Capão Bonito.

Campanhas	Grupos						
	Paredão	Ponte	Pirambeira 1	Pirambeira 2	Manso	Bambu	Porcos
Nov (2012)	6 (2)		9 (2)	5 (2)	5	6 (2)	5
Dez (2012)			9 (2)		5		
Mar (2013)		2			5		
Jul (2013)			7	5/4 (2/1*)	5		
Nov (2013)			8 (1)	4 (1)		5 (2)	
FINAL	6	2	8	4	5	5	5

Números de indivíduos por campanha, entre parenteses estão os números de infantes que formavam os grupos. O FINAL é referente ao último dia de visita ao grupo.

*Perda de um infante.

Os infantes foram frequentemente encontrados nos grupos visitados nas campanhas de Novembro. Porém no mês de Julho de 2013 foram avistados dois infantes no grupo da Pirambeira 2, sendo que já haviam se reproduzido no mês de novembro de 2012. Este grupo apresentou duas reproduções no ano.

2.4.1. Sítios de pernoite

Os micos-leões utilizaram para sítios de pernoite, ninhos abandonados, emaranhados de cipó (Figura 10.A), inserção de folhas de coqueiro (Figura 10.B), ocos em árvores (Figura 10.C), emaranhados de folhas e cipós em copas de araucária (Figura 10.D).

Ocos das árvores são locais predominantemente utilizados como abrigos noturnos para todas as espécies de micos-leões (KIERULFF et al. 2008). Um oco para que seja utilizado, é necessário que caiba o grupo todo, que não entre água das chuvas e que não esteja habitado por outro animal ou inseto. Emaranhados nas copas de Araucária, possivelmente são ninhos abandonados de outros animais.



Figura 10: Fotos tiradas na Floresta Nacional de Capão Bonito de sítios de pernoite de *L. chrysopygus*. A) Emaranhado de cipó onde o grupo Pirambeira 1 já estava alocado para passar a noite. B) Inserção de oco de coqueiro onde o grupo da ponte passou a noite C) Oco de árvore onde o grupo do paredão foi capturado D) Emaranhado na copa de uma araucária onde o grupo Pirambeira 1 estava alocado para passar a noite.

Os emaranhados de cipó são cipós interlaçados com os galhos das árvores e folhas, localizados mais frequentemente nas copas das árvores. As inserções de folhas dos coqueiros formam espaços vazios na inserção das folhas nas copas dos coqueiros (MAMEDE, et al. 1997).

Nossa equipe conseguiu identificar sítios de pernoite de quatro grupos, totalizando 13 sítios de pernoite (Tabela 2), sendo sete sítios em emaranhados de cipó, dois em copas de araucária, três em oco de árvore e um em inserção de folhas de coqueiro. Não foram vistos os grupos repetindo sítios de pernoite.

Tabela 2: Número de pernoites em cada tipo de sítios de quatro grupos da Floresta Nacional de Capão Bonito.

Sítios de pernoite	Grupos			
	Paredão	Ponte	Pirambeira 1	Manso
Cipós		1	4	2
Araucária			2	
Ocos	1			2
Coqueiros		1		
TOTAL	1	2	6	4

2.5. Discussão

No rio Paranapitanga, percorremos as matas ciliares em busca dos micos-leões-pretos. Os relatos feitos pelos moradores do local são de que esses primatas existem nessa área, mas não são avistados com frequência.

O censo realizado identificou 35 indivíduos distribuídos em sete grupos residindo nas áreas remanescentes de mata ciliar do rio Apiaí-Mirim, conectadas às matas ciliares dos córregos que nascem dentro da Floresta Nacional de Capão Bonito, totalizando uma área de aproximadamente 357 hectares. No PHVA briefing book (2005) foram apresentados dados referentes a estimativas populacionais dos mesmos 357 hectares, onde na ocasião estimou-se em 12 indivíduos distribuídos em três grupos.

Dos sete grupos encontrados, cinco estão localizados nas áreas de mata ciliar do rio. Já que a área de vida dos grupos estende-se pelas duas margens, nossa equipe encontrou uma maior dificuldade para segui-los. O rio possui muitos pontos de travessia para os grupos de uma margem a outra, seja por árvores caídas que cruzam o rio, ou galhos de uma árvore de uma margem do rio que encontra-se ou está próxima de galhos de árvores da outra margem (Figura 11).

Os grupos atravessam de uma margem para outra com bastante agilidade despistando muitas vezes a equipe nessa travessia.

Nossa equipe conseguiu acompanhar os dois grupos que estão associados à mata ciliar dos córregos, a equipe, já que o córrego não se torna uma barreira para a equipe atravessar.



Figura 11: Fotos tiradas do rio Apiaí Mirim com pontos de travessia para os micos leões preto. A) Foto tirada de uma travessia do grupo do Paredão. B) Foto tirada de vários pontos de travessia do grupo da ponte.

Também pudemos observar que alguns grupos tinham uma sobreposição de território, um grupo entrava nas bordas da área de vida de outro grupo. Percebemos essa situação quando um grupo que estava sendo acompanhado pela equipe entrou em uma área que a equipe já havia estado com outro grupo. Nós nos deparamos com essa situação constantemente com diferentes grupos.

De acordo com Peres (1989b), os grupos se locomovem regularmente e permanecem em áreas de encontro para defender as fronteiras, evitando que os vizinhos ultrapassem determinados limites dentro da sua área de uso. Pouca defesa territorial foi observada em grupos de *L. chrysopygus* no Parque Estadual Morro do Diabo (VALLADARES-PADUA, 1993) e na Estação Ecológica de Caetetus (PASSOS, 1997).

Na campanha de julho de 2013, a equipe se deparou com um conflito entre dois grupos vizinhos (Pirambeira1 e Pirambeira 2), na suposta sobreposição de território. Na ocasião o grupo da Pirambeira 2 estava com dois infantes no grupo visto antes do conflito e no dia após o conflito apenas um dos infantes permaneceu no grupo.

Dos seis grupos encontrados em novembro de 2012, quatro grupos estavam com infantes. Em novembro de 2013, dos três grupos visitados, todos estavam com infantes em seus grupos. French et al., (2008) relata que o *Leontopithecus chrysopygus* comumente tem cria apenas uma vez por ano no período de setembro a março. Porém, o grupo Pirambeira 2, também foi avistado com infantes no mês de julho de 2013, mostrando que o grupo se reproduziu duas vezes no ano.

Mesmo com a dificuldade encontrada pela equipe de acompanhar os grupos, muitas vezes por cruzarem o rio, quatro grupos tiveram seus sítios de pernoite localizados, totalizando 13 sítios de pernoite. A ideia de seguir o grupo até o local de pernoite tinha como intuito capturar os indivíduos para colher material para estudo genético (capítulo 2), de forma que no momento que o grupo era capturado, o grupo deixava de ser visitado. Como é o caso do grupo do paredão, que no primeiro dia que encontramos o sítio de pernoite (oco de árvore), o grupo foi capturado e foi deixado de ser acompanhado. O grupo manso pernoitou duas vezes em emaranhados de cipó, local onde não havia condições para o grupo ser capturado e, posteriormente, dois ocos, um no qual não tinha condições de captura pelos riscos para equipe e o outro no qual o grupo foi capturado. O grupo da ponte passou um dia em emaranhados de cipó e outro dia em um coqueiro, possivelmente na inserção da folha com o tronco do coqueiro. O grupo da Pirambeira 1, pernoitou quatro vezes em emaranhados de cipó e duas vezes em copas de araucárias. Nenhum grupo foi visto repetindo o sítio de pernoite. Mamede (1997) em seu estudo verificou que os micos-leões-pretos repetem os sítios de pernoite, porém o número de sítios de um grupo por ela amostrado foi bem maior.

Valladares-Padua (1993) mencionou que o uso de ocos não parece ser um fator limitante que restrinja a utilização do habitat pela espécie. Heymann (1995) aponta que o tipo de sítio de pernoite pode deixar os primatas mais susceptíveis ou não a predação.

A coloração negra da espécie contrastada com o fim dos raios solares do horário que os grupos finalizam suas atividades diárias, e a agilidade com que os membros do grupo se deslocam para o sítio de pernoite, é um fator que limita a visualização do grupo entrando nos sítios de pernoite.

O comportamento apresentado pelos calitriquídeos, quando se dirigem para o sítio de pernoite, os indivíduos ficam bem quietos e apenas vocaliza com baixa intensidade andando rapidamente pelas árvores verificando ao redor, para proteção contra os predadores (HERSKOVITZ, 1977), o que dificultava a visualização de onde será o sítio de pernoite do grupo.

3. Capítulo 2: Diversidade genética e relações de parentesco em grupos de *Leontopithecus chrysopygus* na Floresta Nacional de Capão Bonito.

3.1 Introdução:

A fauna primatológica mundial é rica e o Brasil tem um grande destaque, pois possui a maior diversidade de espécie de símios do mundo (COIMBRA FILHO, 1983; MITTERMEIER et al., 1994). Os micos-leões (*Leontopithecus*), pertencentes à família Callitrichidae, estão entre as espécies que habitam remanescentes de Mata Atlântica.

Em um grande números taxonômicos, grandes reduções na riqueza de espécies foram observadas com a fragmentação, incluindo os primatas (RYLANDS; KEUROGHLIAN, 1988).

Os primatas, como outros mamíferos não voadores, são considerados os mais vulneráveis à fragmentação, principalmente por grande parte das espécies serem ecologicamente exigentes e especialistas quanto à qualidade de habitat, dieta e área de vida (LOVEJOY, 1986).

Para a espécie *L. chrysopygus* a fragmentação do habitat também é um dos principais fatores que garantem o status de ameaça da espécie (COIMBRA FILHO; CAMARA, 1996; DEAM, 1995; FONSECA, 1985).

Atualmente a maior população de *L. chrysopygus* de vida livre encontra-se no Parque Estadual Morro do Diabo, que é uma reserva protegida de Mata Atlântica localizada no município de Teodoro Sampaio-SP, onde existem ações conservacionistas para a espécie (PARANHOS; ROPER, 2006).

Outras populações de mico-leão-preto, encontram-se em fragmentos pequenos e isolados (RYLANDS; MITTERMEIER; KONSTANT, 2001), como é o caso da Floresta Nacional de Capão Bonito, onde apenas a mata ciliar do rio Apiaí-Mirim oferece os recursos necessários para a sobrevivência da espécie.

Para a perpetuação e sobrevivência de uma espécie, é preciso que esta apresente populações mínimas viáveis (SHAFFER, 1981), sendo muitas vezes necessárias medidas de proteção de seus *habitat* naturais, manejo das populações

na natureza ou em cativeiro, de modo que seja proporcionada a garantia mínima de variabilidade genética (CULLEN JUNIOR; RUDRAN, 2003).

Para avaliar estas questões as técnicas moleculares têm se mostrado ser uma importante ferramenta para a conservação de populações (RUELL; CROOKS, 2006), possibilitando o estudo da variabilidade genética das espécies nas regiões de ocorrência.

Os microssatélites são marcadores moleculares, com pequenas sequências de um a seis pares de base repetidas em tandem (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002), podendo ser di, tri, tetranucleotídeos ou um composto. Esses marcadores têm sido bastante utilizados por possuírem uma ampla distribuição no genoma, tamanho pequeno e alto grau de polimorfismo (CHISTIANKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006). Além disso, estes apresentam herança codominante, o que possibilita identificar dois alelos de um *locus* separadamente (SUNNUCKS, 2000), e respondem melhor às mudanças mais recentes de fragmentação do ambiente (JOHNSON et al., 1999).

Os microssatélites são considerados marcadores neutros, ou seja, não codificam nenhum produto na maioria dos seus *loci*, o que possibilita que sejam utilizados para comparar a diversidade genética entre populações (SELKOE; TOONEN, 2006), e também fornecem dados sobre variabilidade genética e fluxo gênico (GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997).

Esses marcadores também têm sido amplamente utilizados, para estudos de estruturação populacional (FERNANDES; ALMEIDA TOLEDO, 2000). Eles favorecem o estudo em diversas áreas de conhecimento, entre elas a genética da conservação (CHISTIANKOV et al., 2006).

Pouco se sabe sobre a genética de *L. chrysopygus*. Os estudos genéticos ainda são muito escassos, principalmente relacionados à variabilidade genética. Os resultados dos poucos estudos realizados em animais de vida livre reportam uma baixa variabilidade genética (FORMAN et al., 1986; PEREZ-SWEENEY et al., 2005; VALLADARES-PADUA, 1987), podendo ser uma característica de todos os gêneros de calitriquídeos (POPE, 1996).

Dado que a baixa variabilidade genética de *L. chrysopygus* foi encontrada em outros estudos e possivelmente pode ser uma característica dos gêneros de calitriquídeos (POPE, 1996), esperamos encontrar uma baixa variabilidade genética na população da Floresta Nacional de Capão Bonito (SP).

3.2. Objetivo Geral

Estimar a variabilidade genética da população de *L. chrysopygus* na Floresta Nacional de Capão Bonito, no Estado de São Paulo, utilizando marcadores moleculares microssatélites em amostras de sangue ou pelos.

3.2.1. Objetivos específicos

- Inferir sobre a proporção da variação genética devida as diferenças entre grupos e dentro de cada grupo;
- Verificar as relações de parentesco entre os indivíduos;

3.3. Material e métodos

3.3.1. Obtenção das amostras

3.3.1.1. Captura

A técnica de captura consistiu em percorrer as áreas de mata nativa localizada dentro e ao redor da Floresta Nacional de Capão Bonito em busca dos grupos de *L. chrysopygus* com o auxílio de um *playback* da vocalização desses primatas, esse método tem o objetivo de atrair os animais existentes na área.

Após encontrar o grupo, a equipe segue os indivíduos até o fim de suas atividades diárias. Essa espécie possui o hábito de procurar abrigo e dormir em ocos de árvores (COIMBRA FILHO, 1970b, 1976b), locais onde ocorrem a captura dos grupos (Figura 12).



Figura 12 : Foto de uma árvore com um oco em potencial dormitório para a indivíduos de *Leontopithecus chrysopygus*.

Caso um dos indivíduos entre em um oco da árvore para se esconder durante suas atividades diárias, um dos mateiros escala rapidamente essa árvore e captura o indivíduo para ser colocado um rádio-colar (Figura 13). Essa técnica com o rádio-colar permite localizar onde o grupo está passando a noite, se o sítio de pernoite for encontrado, a equipe checa a posição do oco, número de possíveis saídas, sanidade da árvore, ocorrência de enxames de abelha ou formigueiros no tronco ou nas proximidades, e as condições de captura visando a segurança da equipe e dos animais durante o processo de captura.

A captura é então realizada no dia seguinte antes do amanhecer. O assistente de campo novamente escala a árvore, confere a forma, tamanho e profundidade do oco e todas as possíveis saídas que são tampadas com auxílio de buchas de tecido. Os animais são manualmente capturados um a um e colocados dentro de bolsas de pano. Em seguida as bolsas são amarradas com cordas finas e entregues ao veterinário, pesquisador e outro assistente de campo que iniciarão os procedimentos de coleta de material biológico (VALLADARES-PADUA, 1993).



Figura 13: Fotos mostrando a utilização do rádio-colar. A) indivíduo da espécie *Leontopithecus chrysopygus* com rádio-colar. B) Foto do equipamento.

Na tentativa de aumentar as chances de captura, foi utilizado um termógrafo, um equipamento capaz de registrar variações de temperatura do ambiente. Durante todo o percurso percorrido pelas matas tentando encontrar os grupos, os ocos em potencial dormitório foram sendo marcados com o auxílio de um GPS.

Antes do amanhecer, os grupos ainda não iniciaram as atividades diárias e ainda permanecem nos sítios de pernoite, portanto, a equipe checa as árvores marcadas antes do amanhecer com o aparelho de termógrafo, verificando se há variação na temperatura desses troncos. Caso o termógrafo identifique um aquecimento na região do sítio de pernoite em potencial, os auxiliares de campo escalam essa árvore para verificar se é o grupo de *L. chrysopygus* (Figura 14).

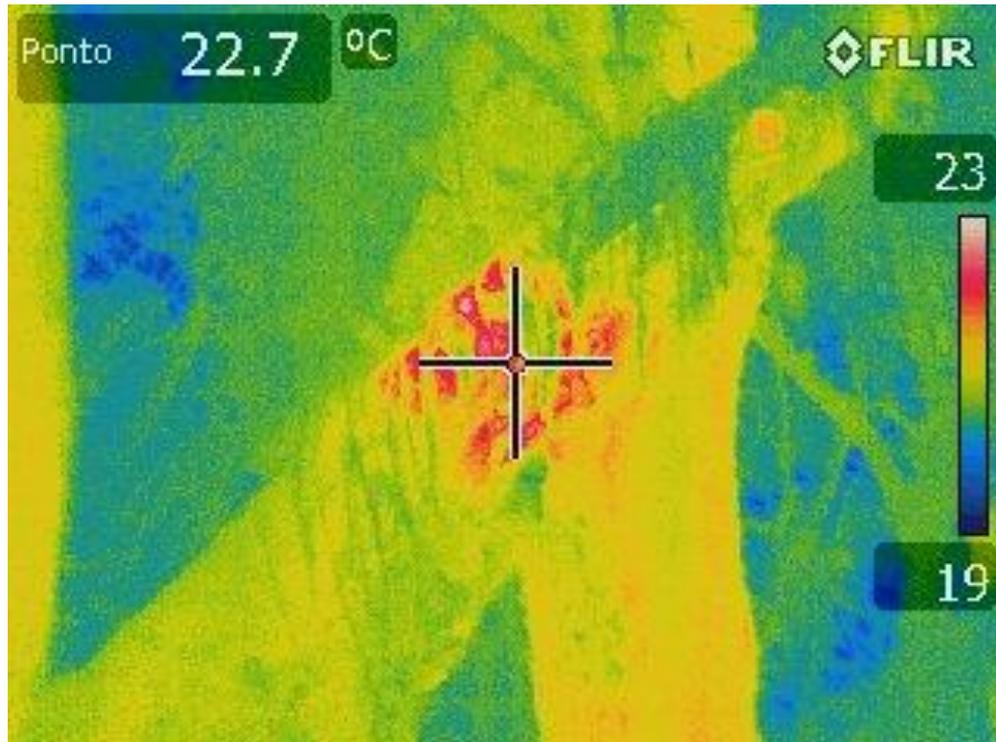


Figura 14: Foto tirada com o termógrafo, evidenciando a variação de calor em um oco de uma árvore. Foto: Cauê Monticelli.

O terceiro método de captura consistiu na utilização de plataformas com frutas, as quais eram distribuídas ao longo da área de vida do grupo. Nessas estruturas eram colocadas frutas visando habituar os indivíduos a se alimentar naquelas plataformas. Posteriormente à habituação, as plataformas eram substituídas por armadilhas do tipo *tomahawk* (Figura 15).



Figura 15: Fotos da ceva com frutas. A) Frutas colocadas na plataforma. B) Foto da ceva elevada na altura das árvores

Após a captura dos indivíduos, os médicos veterinários da Fundação Parque Zoológico de São Paulo realizavam a contenção química dos animais com anestesia inalatória (isoflurano), a qual permite rápida indução anestésica e rápida recuperação. Sendo assim, após o término dos procedimentos de colheita de sangue de todos os animais, os mesmos eram soltos imediatamente, visto que o procedimento anestésico é extremamente seguro para os animais e equipe.

3.3.1.2. Coleta de Sangue

Durante o procedimento, os sinais vitais dos animais eram monitorados utilizando-se oximetria de pulso, eletrocardiograma, temperatura e pressão não invasiva. O sexo dos animais também era registrado (Figura 16).

Foi efetuada a retirada de um volume total de 500 μL de sangue e acondicionados em tubos contendo EDTA e armazenados a -20°C .

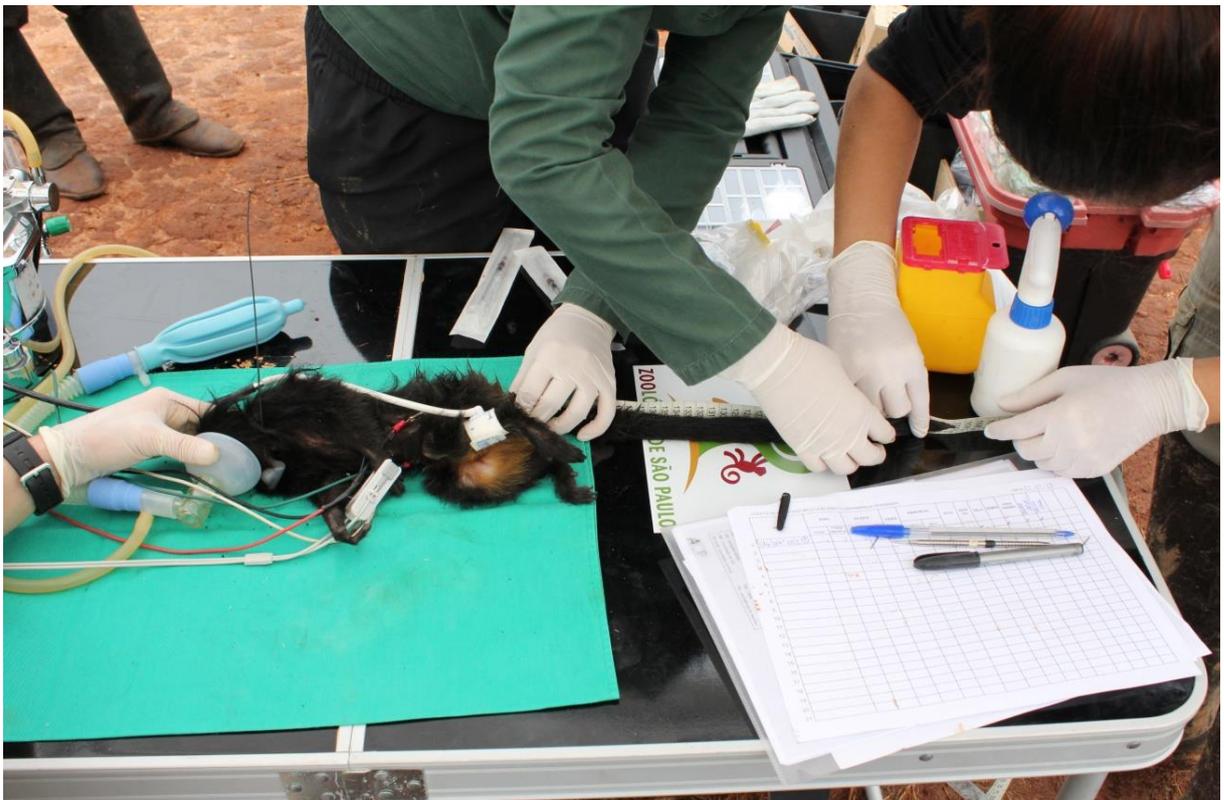


Figura 16: Foto tirada dos procedimentos realizados com os indivíduos de *Leontopithecus chrysopygus* pelos biólogos e médicos veterinários da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

3.3.1.3. Coleta de Pelos

A coleta de pelos foi feita manualmente em dois locais distintos (região femoral lateral e dorsal). As amostras obrigatoriamente deveriam conter bulbos para fins do estudo genético. Os pelos foram acondicionados em saco plástico tipo *zip-lock* e armazenadas a 20°C. Em animais com peso inferior a 300g não foi efetuada a colheita de sangue, somente amostras de pelo.

3.3.2. Extração de DNA:

3.3.2.1. Extração de DNA de Sangue:

Para a extração de DNA das amostras de sangue foi utilizado o Protocolo de extração de sangue de Sambrook et al. (1989).

- 1- Colocar 100 μ de papa de hemácias misturadas com 220 μ l de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 e KCl 50mM) e 20 μ l de SDS e 15 μ l de proteinase K, em microtubos, sendo essa mistura homogeneizada.
- 2- Após homogeneização, a mistura deve ser incubada em banho-maria por aproximadamente 12 h a uma temperatura de 55°C
- 3- A extração tem início com a adição de 250 μ l de Fenol em cada microtubo e agitação por 10 minutos, seguida de centrifugação por 10 minutos a 14.500 rpm (14103g).
- 4- Os sobrenadantes são transferidos para novos tubos e misturados como uma solução de Fenol-Cloroformio-Álcool isoamílico 25:24:1, (250 μ l por tubo), agitados vagarosamente por 10 minutos e centrifugados por 10 minutos a 14.500 rpm (14103g).
- 5- Os sobrenadantes são transferidos para novos tubos e acrescidos de uma mistura de 250 μ l de Clorofórmio-Álcool isoamílico 24:1. Seguido de vagarosa agitação por 10 minutos e centrifugação por 10 minutos a 14.500 rpm (14103g).
- 6- Os sobrenadantes desse último passo são transferidos a tubos limpos e a esses foram acrescidos: acetato de sódio 3M (10% do volume) e 2,5 vezes (250% do volume) de álcool absoluto gelado.

- 7- Deixar o DNA precipitar no freezer por no mínimo 1 hora.
- 8- Centrifugar por 30 minutos a 14.500 rpm (14103g) e colocar os tubos no freezer por 10-20 minutos a fim de que o pellet de DNA não desgrude do fundo do tubo
- 9- Descartar o sobrenadante e lavamos o DNA com álcool 70% (750µl). Centrifugar por 10 minutos a 14.500 rpm (14103g), repetir esse passo mais uma vez.
- 10- Os sobrenadantes são descartados e os precipitados deixados à temperatura ambiente a fim de que o restante do etanol evapore. Após esse processo foram acrescentados de 100 a 200 µl de água para diluir o DNA (dependente do tamanho do pellet)

3.3.2.2. Extração de DNA de Pelo:

Para os procedimentos da extração do DNA das amostras de pelo foi utilizado o protocolo de Sambrook (1989). Foram utilizados de 10 a 15 pelos contendo o bulbo por amostra. Protocolo utilizado:

- 1- Em cada amostra colocar 500µL de solução de digestão (Tris HCl - 50mM; EDTA - 50mM e NaCl 100mM), e 20 µL SDS (10%) por amostra. Deixar em banho-maria durante 1 hora a 37°C.
- 2- Colocar 25 µL de proteinase K por amostra e deixar em banho-maria a 55°C por cerca de 3 horas ou até a digestão completa do tecido.
- 3- Adicionar o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e agitamos os tubos por 10 minutos.
- 4- Centrifugar a 14.500 rpm (14103g) por 15 minutos.
- 5- Recuperar o sobrenadante.
- 6- Centrifugar novamente por mais 10 minutos (para verificar se ainda há “impurezas” no sobrenadante recuperado).
- 7- Acrescentar NaCl-5M de modo que a concentração final da solução seja de 1M (volume/5).
- 8- Completar o volume com álcool 100% gelado e vertemos delicadamente o tubo para a precipitação do DNA.
- 9- Centrifugar por 10 minutos a 14.500 rpm (14103g).

- 10- Verter o álcool 100% (descartando o sobrenadante).
- 11- Adicionar 500 µL de álcool 70% gelado.
- 12- Centrifugar por 10 min a 14.500 rpm (14103g).
- 13- Verter o álcool 70%.
- 14- Deixar o material secar em estufa a 37°C por aproximadamente 2 horas.
- 15- Adicionar 50 µL de H₂O para ressuspender o DNA.

Verificamos a qualidade do DNA extraído em gel de agarose 1% e o quantificamos em biofotômetro.

3.3.3. Amplificação dos loci de microssatélites e genotipagem

Para a obtenção dos dados para a estimativa da diversidade genética, utilizamos 10 pares de *primers* específicos para a espécie *Leontopithecus chrysopygus* descritos por Perez-Sweeney et al. (2005) (Tabela 3).

Tabela 3: Sequências de *forward* e *reverse* dos *primers* de microssatélite específico para *Leontopithecus chrysopygus* com as temperaturas de anelamento (PEREZ SWEENEY et al., 2005).

<i>Primer</i>	Sequência dos primers	5' → 3'	T _a
Leon27c13	F: AAGCGCAGATTTATTGATAGG R: TGCAGGTAATGATGGTAATG		60 °C
Leon35c42	F: GTGGAAAGGTTTCAGAATATC R: TGCAGTTGTCCACACTTTA		58 °C
Leon2	F: CTGCTTCTTGTTCCACTTCTTCTC R: GTTTGGGTGGTTGCCAAG		55 °C
Leon26c10	F: TTCATCTCAATGACACGAAAC R: CATCGAGTGTCCTGCTGT		50 °C
Leon15c85	F: CTGATCCTTGAAGCAGCATTG R: GGTAAAGGGGTTTCGTTCTGTG		60 °C
Leon21c75	F: CAGTTGAGGGAACAGGAATTA R: CACTGCACTGACAGAGCAAG		60 °C
Leon11c72	F: AGGATTACAGGTGCCAC R: TTGCATATTGTGTTCAACTTC		60 °C
Leon30c73	F: GGACCTGATTGAAGCAGTC R: TTCCCTGAGAATCTAATGGAG		60 °C

Leon31c97	F: TGGTCCAGAGAAATGATGTC R: GTAATTCCTTGGATTTATGCC	55 °C
Leon 3c20	F: CTGTATGTGATCGCTTTTACCTG R: AAGGCAATCTAACTAATCAACACTC	60 °C

Também foram utilizados 10 *primers* heterólogos, descrito para outras espécies do gênero *Leontopithecus*, oito de *L. chrysomelas* (GALBUSERA; GILLEMOT, 2008) e dois de *L. rosalia* (GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER, 2001) (Tabela 4).

Tabela 4: Sequências de *forward* e *reverse* dos *primers* de microsatélite descritos para *Leontopithecus chrysomelas* (GALBUSERA; GILLEMOT, 2008) e *Leontopithecus rosalia* (GRATIVOL; BALLOU; FLEISCHER; 2001)

Primer	Sequência dos primers 5' → 3'	T_a
Lchu01	F:GCTCAGGTGTTATTTATGTCCAAA R:GTTTCTTGCAACTATCTTGCATGTTCTGC	58 °C
Lchu02	F:AGATTCTGCCTCAAGAAATTCAGT R:GTTTCTTTCTAGATCCAGGTCGGCAAT	58 °C
Lchu03	F:AAGGCATGATGTATCTTGTTCTCA R:GTTTCTTATCTTTCTGTATGTGTCTCCCTGTCT	58 °C
Lchu04	F: TGACCAAAGAAAATGCAAAA R: GTTTCTTGACAGGGTATTTAGCAGGA	61 °C
Lchu05	F: TGATGCTAAAACAGAAGCATTT R: GTTTCTTGTCCTGATGTTACAAAACCT	55 °C
Lchu06	F: GCCTTAATTAGCACCAGAACC R: GTTTCTTACCACTCCAAGCCTTCAGTA	55 °C
Lchu07	F: TCTCATTTCTTCTCATGGACTC R: GTTTCTTCTTGACTCACAGCATGACCT	54 °C
Lchu08	F: CACGGCAATGTGGGAATAA R: GTTTCTTTTCAGTAGTTGGGACTGGGATAA	58 °C
Lr.P2BH6	F: TCTGTTTGAATCCCCAGTCC R: GCAGTCCCTCAAGGTTTTCT	55 °C
Lr.P5BE6	F: TGTGCATGCTTGCCTGTGTC R: ATCTCACTGGACCCACCT	55 °C

Os *primers* com inicial *Lchu* foram descritos para *L.chrysomelas* e *Lr.P* foram descritos para *L. rosalia*

Todos os primers continham a "cauda" universal de 18 pares de bases (TGT AAA ACG GCC AGT) adicionada na posição 5' conforme foi proposto por Schuelke (2000), permitindo que seja incorporado um terceiro *primer* universal M13 o qual é complementar a "cauda" universal marcado com um fluoróforo para a realização das genotipagens (Figura 17).

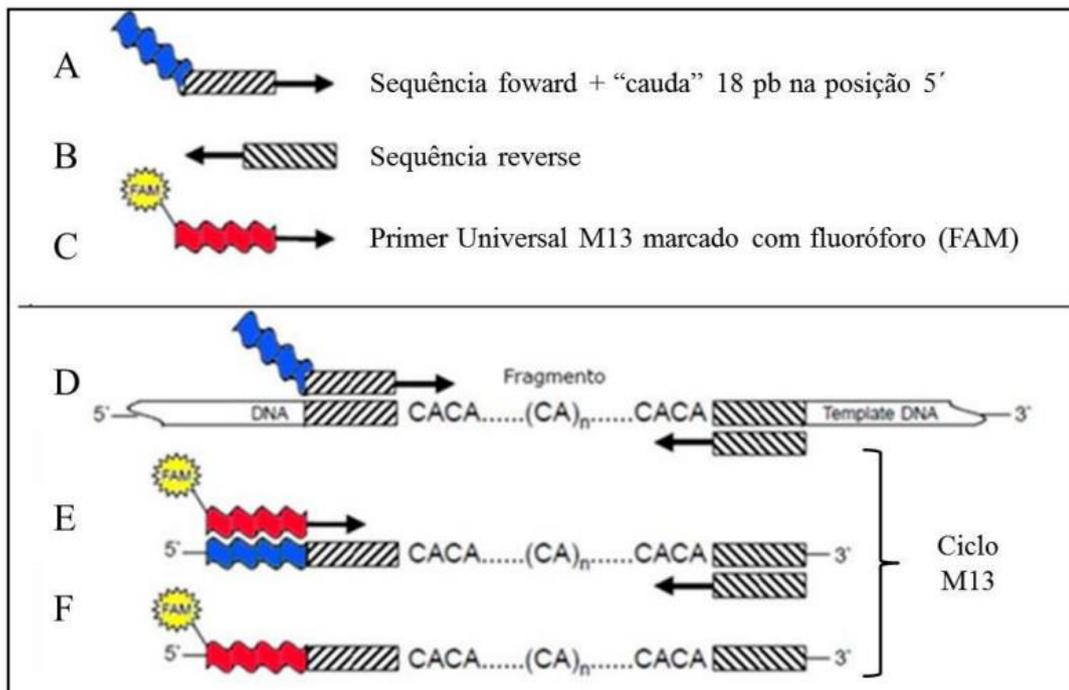


Figura 17: Reação de amplificação usando a "cauda" universal e o *primer* M13 marcado com fluoróforo (Adaptado de Schuelke, 2000). (A e B) são os *primers* para amplificação do fragmento de interesse. (C) corresponde ao *primer* M13 marcado com o fluoróforo. (D) representa amostra de DNA incorporado com o *primer forward* contendo a "cauda" de 18 pb complementar ao *primer* M13. (E e F) corresponde ao ciclo específico do M13, onde ele é incorporado ao produto de PCR.

A reação de amplificação (PCR) utilizada para esses *primers* possuía um volume final de 12 μ l que continha 6,0 μ L de GoTaq (Promega) (Mix pronto com tampão Buffer 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq DNA polimerase), complementados com 0,25 μ g/ μ L de BSA, 0,625 mM de $MgCl_2$, 0,45 pmol do *primer forward*, 0,12 pmol do *primer reverse* e 0,45 pmol do *primer* universal M13, 1,45 μ L de H₂O MiliQ e 2 μ L de DNA. A PCR ocorreu por meio de um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de um estágio 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura específica de cada *primer* por 45 segundos, (apresentadas nas tabelas 3 e 4) , 72 °C por 45 segundos, seguido do ciclo específico para o *primer*

universal M13 com 8 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Após as reações, os produtos amplificados foram checados em gel de agarose a 1,0% e posteriormente enviados para genotipagem em sequenciador automático MegaBACE GEMROX-365 Size Standard (Amersham Biosciences) pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil). Os resultados foram observados em forma de gráficos (eletroferograma) no programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Sciences).

3.3.4. Análises populacionais

Para analisar a variabilidade populacional, verificamos o conteúdo de informações polimórficas (PIC) de cada *locus* no programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007; MARSHALL et al., 1998). Segundo Botstein et al. (1980) os *loci* com valores maiores que 0,5 são altamente informativos, entre 0,25 e 0,5 são razoavelmente informativos e abaixo de 0,25 são pouco informativos.

Estimamos a diversidade genética considerando os valores de número de alelos, riqueza alélica e heterozigidade observada e esperada. Os cálculos de heterozigidade esperada (H_e) e heterozigidade observada (H_o) e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (DHW), foram realizados no programa GENEPOP 4.0.10 (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008). Usamos a correção sequencial de Bonferroni para corrigir os intervalos de significância para análises múltiplas (RICE, 1989).

O coeficiente de endogamia (F_{is}) juntamente com o excesso de heterozigotos (p_L) ou déficit de heterozigotos (p_S) e valores de riqueza alélica foram calculados no programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no programa GENALEX (PEAKALL; SMOUSE, 2006) para avaliar a distribuição da variação genética entre os grupos familiares. Por fim calculamos o tamanho efetivo populacional pelo programa NeStimator V2.

3.3.5. Análises de Parentesco

Os *softwares* que estimam o parentesco possuem valores teóricos para todas as classes de relacionamento entre indivíduos, “não relacionados” (UN) com valores entre 0 a 0,25, os “meio-irmãos” (HS) com valores entre 0,25 a 0,5, e “irmãos completos ou pai e filho” (FS) com valores acima de 0,5.

Utilizamos os estimadores de Queller e Goodnight (1989) e por máxima verossimilhança pelo programa Kingroup v2 (KONOVALOV; MANNING; HENSHAW, 2004), e também o programa ML Relate (KALINOWSK; WAGNER; TAPER., 2006).

Com os resultados dos três estimadores, o parentesco final foi confirmado quando eles mostravam o mesmo resultado. Esse procedimento utilizado é parte da metodologia proposta por Miño et al. (2010).

Realizamos duas análises para saber o grau de parentesco genético, uma dentro de cada grupo familiar e a outra entre os grupos.

3.4 Resultados

3.4.1. Amostragem

Para a amostragem dos indivíduos a equipe realizou cinco campanhas de coleta, com duração de um mês por campanha, realizando 12 horas de campo diárias.

Os dois grupos capturados consistem naqueles em que a equipe conseguiu identificar os ovos de pernoite, o que totalizou dez indivíduos. A dificuldade com os demais grupos se deu ao fato dos pontos de pernoite não proporcionarem a captura (Tabela 5).

Tabela 5: Informações sobre os indivíduos dos dois grupos capturados.

Grupo	Amostra	Sexo	Peso
Grupo 1	BLT1	Macho (Adulto)	0,610
Grupo 1	BLT2	Macho (Jovem)	0,410
Grupo 1	BLT3	Macho (Adulto)	0,565
Grupo 1	BLT4	Macho (Filhote)	0,110
Grupo 1	BLT5	Fêmea (Filhote)	0,105

Grupo 2	BLT6	Fêmea (Adulto)	0,610
Grupo 2	BLT7	Fêmea (Adulto)	0,566
Grupo 2	BLT8	Macho (Jovem)	0,395
Grupo 2	BLT9	Macho (Adulto)	0,685
Grupo 2	BLT10	Macho (Adulto)	0,585

O primeiro grupo foi capturado com a metodologia descrita por VALLADARES PADUA (1993) (Figura 18). Esse grupo era formado por três machos adultos, dois filhotes (um macho e uma fêmea) e um indivíduo ao qual não se têm dados, pois no momento da captura o mesmo conseguiu fugir.

O segundo grupo foi encontrado com o termógrafo durante a madrugada, era constituído por três indivíduos machos adultos e duas fêmeas adultas.

Em relação à tentativa de cevar os indivíduos a comer as frutas que fornecíamos, não foi obtido sucesso e nenhum vestígio de mico-leão-preto foi encontrado.



Figura 18: Foto tirada do dentro do oco no momento da captura. Foto: Carlos Nader

3.4.2. Diversidade genética

Obtivemos sucesso na amplificação dos 20 *loci* de microsatélites, no entanto seis deles (Leon26c10, Lchu01, Lchu02, Lchu05, Lchu06, Lchu08) não se mostraram polimórficos e, portanto, foram retirados das análises. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) médio foi considerado razoavelmente informativo segundo a escala de Botstein et al. (1980). Apenas dois *loci* foram pouco informativos, os outros 12 *loci* foram razoavelmente ou altamente informativos como mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Informações dos *locus* de microsatélite utilizados nas análises.

Locus	PB	PIC
Leon2	223-225	0,322
Leon3c20	313-317	0,559
Leon27c13	195-211	0,259
Leon15c85	286-296	0,563
Leon31c97	338-340	*0,222
Leon35c42	219-223	0,269
Leon21c75	293-301	0,504
Leon30c73	282-284	0,375
Leon11c72	304-314	0,375
Lr.P2BH6	134-140	0,269
Lr.P2BE6	117-119	0,375
Lchu03	337-341	*0,164
Lchu04	400-404	0,365
Lchu07	344-346	0,351
Total	-	0,355

Tamanho dos fragmentos em pares de base (pb); conteúdo de informação polimórfica por loco (PIC)

*Pouca informação polimórfica.

No total, foi detectado um total de 34 alelos em 14 *loci* polimórficos. A média dos *loci* polimórficos foi de 2,42 alelos, e os *loci* que mostraram maior nível de polimorfismo foram o Leon27c13 e o Leon21c75, com quatro alelos cada um.

As heterozigosidades esperadas e observadas médias foram 0,433 e 0,614, respectivamente. Não foi observado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos *loci* após a correção sequencial de Bonferroni ($0,003 < \alpha < 0,05$).

Para os pares de *loci* analisados não foi encontrado desequilíbrio de ligação. Não foram observados valores significativos de excesso de heterozigotos nos *loci* após a correção sequencial de Bonferroni ($0,003 < \alpha < 0,05$). O coeficiente de endogamia (F_{is}) médio foi de -0,363. O número efetivo populacional foi de 3,2 indivíduos. Todas as informações de diversidade genética são apresentadas na tabela 7.

Tabela 7: Características dos *loci* de microsatélite e dados de diversidade genética.

Locus	N	NA	RA	AE	H_E	H_o	DHW	F_{is}	pL	pS
Leon2	10	2	2	1,72	0,42	0,6	0,481	-0,385	1,000	0,371
Leon3c20	10	3	3	2,74	0,63	1	0,079	-0,538	1,000	0,025
Leon27c13	10	4	4	1,37	0,27	0,3	1,000	-0,059	1,000	0,846
Leon15c85	10	3	3	2,78	0,64	0,4	1,000	0,419	0,075	0,975
Leon31c97	10	2	2	1,34	0,25	0,3	1,000	-0,125	1,000	0,821
Leon35c42	10	2	2	1,47	0,32	0,4	1,000	-0,2	1,000	0,692
Leon21c75	10	4	4	2,44	0,59	0,5	0,518	0,204	0,339	0,867
Leon30c73	10	2	2	2	0,5	1	0,007	-1,000	1,000	0,007
Leon11c72	10	2	2	2	0,5	1	0,007	-1,000	1,000	0,007
Lr.P5BH6	10	2	2	1,47	0,32	0,4	1,000	-0,2	1,000	0,714
Lr.P5BE6	10	2	2	2	0,5	1	0,007	-1,000	1,000	0,007
Lchu03	10	2	2	1,22	0,18	0,2	1,000	-0,059	1,000	0,960
Lchu04	10	2	2	1,92	0,48	0,8	0,172	-0,636	1,000	0,082
Lchu07	10	2	2	1,83	0,45	0,7	0,219	-0,500	1,000	0,207
Média	-	2,42	2,42	1,88	0,43	0,614	0,535	-0,363	-	-

(N) tamanho amostral; (NA) número de alelos; (RA) riqueza alélica; (AE) número de alelos efetivos; (H_E) heterozigosidade esperada; (H_o) heterozigosidade observada; (DHW) desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($0,003 < \alpha < 0,05$, após correção sequencial de Bonferroni); (pL) p para déficit de heterozigotos; (pS) p para excesso de heterozigotos ($0,003 < \alpha < 0,05$, após correção sequencial de Bonferroni); (F_{is}) coeficiente de endocruzamento; (*) valores significativos.

3.4.3. Análises entre os dois grupos

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior parte da variação genética foi encontrada entre os indivíduos dos grupos. Da variação total, 12,91% da variação genética foram atribuídas à variação entre os dois grupos estudados, e 87,09% da variação às diferenças entre os indivíduos de cada grupo.

3.4.4. Níveis de Parentesco

Foram analisados os indivíduos par a par, dentro de cada grupo e entre os grupos, totalizando 45 pares, sendo possível definir o provável parentesco de 40 pares (89 %), dos quais seis foram classificados como Pai/filho ou irmãos completos, três como meio irmão e 31 não relacionados.

Os pares que não tiveram relação de parentesco definida devido a não concordância entre os métodos utilizados totalizam cinco pares.

Nas Tabelas 8 e 9 encontram-se os resultados do parentesco divididos por grupos, para melhor visualização dos resultados e na Tabela 10 está discriminada a relação entre os dois grupos.

Tabela 8: Relação de parentesco entre os indivíduos do grupo1.

Indivíduos	Estimadores de parentesco			Resultado
	ML-Relate	Q&G	MV	
BLT1(♂) e BLT2(♂)	U	U	U	U
BLT1(♂) e BLT3(♂)	FS	FS	FS	FS
BLT1(♂) e BLT4(♂)	FS	FS	FS	FS
BLT1(♂) e BLT5(♀)	FS	U	HS	-
BLT2(♂) e BLT3(♂)	FS	FS	FS	FS
BLT2(♂) e BLT4(♂)	U	U	U	U
BLT2(♂) e BLT5(♂)	FS	HS	HS	-
BLT3(♂) e BLT4(♂)	U	U	HS	-
BLT3(♂) e BLT5(♀)	HS	HS	HS	HS
BLT4(♂) e BLT5(♀)	FS	FS	FS	FS

(Q&G) Queller e Goodnight (1989); (MV) Máxima verossimilhança; (-) Parentesco não definido.

Tabela 9: Relação de parentesco entre os indivíduos do grupo2.

Indivíduos	Estimadores de parentesco			Resultado
	ML-Relate	Q&G	MV	
BLT6(♀) e BLT7(♀)	U	U	U	U
BLT6(♀) e BLT8(♂)	FS	FS	FS	FS

BLT6(♀) e BLT9(♂)	U	U	U	U
BLT6(♀) e BLT10(♂)	HS	HS	HS	HS
BLT7(♀) e BLT8(♂)	FS	HS	FS	-
BLT7(♀) e BLT9(♂)	U	U	U	U
BLT7(♀) e BLT10(♂)	U	U	U	U
BLT8(♂) e BLT9(♂)	FS	HS	FS	-
BLT8(♂) e BLT10(♂)	HS	HS	HS	HS
BLT9(♂) e BLT10(♂)	FS	FS	FS	FS

(Q&G) Queller e Goodnight (1989); (MV) Máxima verossimilhança; (-) Parentesco não definido.

Tabela 10: Relação de parentesco entre os indivíduos dos 2 grupos.

Indivíduos	Estimadores de parentesco			Resultado
	ML-Relate	Q&G	MV	
BLT1(♂) e BLT6(♀)	U	U	U	U
BLT1(♂) e BLT7(♀)	U	U	U	U
BLT1(♂) e BLT8(♂)	U	U	U	U
BLT1(♂) e BLT9(♂)	U	U	U	U
BLT1(♂) e BLT10(♂)	U	U	U	U
BLT2(♂) e BLT6(♀)	U	U	U	U
BLT2(♂) e BLT7(♀)	U	U	U	U
BLT2(♂) e BLT8(♂)	U	U	U	U
BLT2(♂) e BLT9(♂)	U	U	U	U
BLT2(♂) e BLT10(♂)	U	U	U	U
BLT3(♂) e BLT6(♀)	U	U	U	U
BLT3(♂) e BLT7(♀)	U	U	U	U
BLT3(♂) e BLT8(♂)	U	U	U	U
BLT3(♂) e BLT9(♂)	U	U	U	U
BLT3(♂) e BLT10(♂)	U	U	U	U
BLT4(♂) e BLT6(♀)	U	U	U	U
BLT4(♂) e BLT7(♀)	U	U	U	U
BLT4(♂) e BLT8(♂)	U	U	U	U
BLT4(♂) e BLT9(♂)	U	U	U	U
BLT4(♂) e BLT10(♂)	U	U	U	U
BLT5(♀) e BLT6(♀)	U	U	U	U

BLT5(♀) e BLT7(♀)	U	U	U	U
BLT5(♀) e BLT8(♂)	U	U	U	U
BLT5(♀) e BLT9(♂)	U	U	U	U
BLT5(♀) e BLT10(♂)	U	U	U	U

(Q&G) Queller e Goodnight (1989); (MV) Máxima verossimilhança;

3.5. Discussão

Devido ao fato de os micos-leões-pretos residentes na Floresta Nacional de Capão Bonito estarem restritos apenas às matas ciliares do rio Apiaí-Mirim e essas áreas possuírem raros ocos com potencial para dormitório dos grupos, o método de captura conhecido e utilizado, proposto por Valladares-Padua (1993), que é dependente desses ocos, se mostrou inadequado para o local de estudo.

Contudo um grupo foi capturado com o método, o qual teve uma proporção sexual de quatro machos para uma fêmea. O indivíduo que escapou possivelmente era uma fêmea, já que o grupo era formado por dois filhotes e três machos adultos.

O segundo grupo que foi capturado com o auxílio do aparelho de termógrafo, foi uma tentativa da equipe em testar a metodologia. A área foi escolhida por haver uma área que havia uma maior oferta de ocos em potenciais dormitórios para o grupo. Essa metodologia foi testada pela primeira vez na captura de *L. chrysopygus* e ainda são necessários alguns ajustes para melhorar a eficiência do método. Como mencionado previamente no capítulo 1, os grupos de *L. chrysopygus*, nem sempre pernoitam em ocos de árvore. Também é válido ressaltar que o aparelho verifica a variação de temperatura do ambiente e esse aquecimento no local do oco da árvore indica que alguma espécie animal está pernoitando dentro do oco, podendo não ser necessariamente os *L. chrysopygus*. A proporção sexual encontrada no segundo grupo era de três machos e duas fêmeas.

Alguns estudos sobre análises de variabilidade genética em *L. chrysopygus* já foram realizados anteriormente. Forman et al., (1986) realizaram um levantamento com 47 *loci* de aloenzimas em 16 indivíduos de *L. chrysopygus* e após as análises concluíram que a população estudada possuía uma variabilidade genética extremamente baixa. Dos 47 *loci* estudados apenas um (2,13%) revelou polimorfismo. E os resultados encontrados por Forman et al. (1986) novamente foi

demonstrado no levantamento de variação genética em aloenzimas em *L. chrysopygus* de Valladares-Padua (1987), onde todos os 25 *loci* testados foram monomórficos.

Perez Sweeney et al. (2005) também encontraram uma baixa variabilidade genética com os indivíduos do Parque Estadual do Morro do Diabo, utilizando *loci* de microsatélite. Em uma amostra de 14 indivíduos, obtiveram $H_e = 0,29$ e 2,14 alelos por *locus*.

Ayala (2013) realizou um estudo com os *L. chrysopygus* de cativeiro da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e do Parque Ecológico de São Carlos (PESC), onde os resultados também não mostraram uma alta variabilidade genética. No FPZSP com uma amostra de 16 indivíduos obteve uma $H_e = 0,49$ e um $N_a = 3,13$ e no PESC em uma amostra de 4 indivíduos encontrou, $H_e = 0,5$ e $N_a = 2,57$.

Os nossos resultados mostraram que dos 20 *loci* analisados, seis não mostraram polimorfismo e apenas quatro tiveram mais que dois alelos. Em média o $N_a = 2,42$ e uma $H_e = 0,43$, revelando um baixo número de alelos por *locus*.

Os resultados do número efetivo populacional indicam que apenas 3,2 indivíduos estão contribuindo geneticamente para a população. Esse valor está próximo do esperado por se tratar de dois grupos familiares, sugerindo haver uma relação de monogamia nos os grupos. É válido lembrar que não foi identificado o sexo de um dos indivíduos do grupo 1, podendo ser uma fêmea ativa na reprodução do grupo. Este fato pode afetar diretamente o número efetivo populacional.

No entanto, esses dados não indicam que a espécie tem uma relação restritamente monogâmica. Visto que grupos potencialmente poliândricos são encontrados em outras espécies de *Leontopithecus* (BAKER; BALES; DIETZ, 2008).

Em um estudo com *L. rosalia*, Baker; Dietz; Kleiman, (1993) concluíram que grupos que continham dois machos adultos não parentes da fêmea reprodutora do grupo eram potencialmente reprodutores poliândricos. E machos adultos filhos ou irmãos da fêmea reprodutora, provavelmente não são ativos dentro do grupo (ABBOTT, 1984; KLEIMAN, 1978c).

Os micos-leões em geral têm sistemas de grupos familiares onde indivíduos podem migrar de um grupo para o outro ou formar um novo grupo. (CARVALHO, Cory; CARVALHO, Cibele 1989). Baker; Dietz, (1996) em um estudo com *L. rosalia*, observaram que os dispersores não são admitidos com facilidade, necessitando

surgir uma vaga no grupo para que o macho ou a fêmea residente seja trocado. Assim, seria mais fácil formar um novo grupo social, do que conseguir entrar em um grupo formado.

Porém, os resultados de parentesco mostraram que em ambos os grupos existem machos que não tem relação de parentesco com alguns indivíduos do grupo, mostrando algum indício de migração dentro dos grupos. No grupo 1, mesmo sem os dados do indivíduo que fugiu no momento da captura (possivelmente uma fêmea em virtude da presença dos filhotes existentes no grupo), observou-se que um dos machos adultos não tem grau de parentesco com os outros machos dentro do grupo. Os dois filhotes capturados são gêmeos, conforme sugerem os estimadores de parentesco.

Com esses parâmetros as relações dentro do grupo dois ficam mais claras, o Indivíduo BLT 9 não tem relação com ambas as fêmeas do grupo (BLT 6 e BLT 7) e o indivíduo BLT 10 não tem relação com a fêmea BLT 7, porém segundo os estimadores este é meio-irmão de BLT 6.

Os três estimadores utilizados foram unânimes em resultar que todos os indivíduos de um grupo, não tem relação nenhuma com os indivíduos do outro grupo, não havendo troca genética entre esses grupos.

Não houve presença de alelos nulos em nenhum dos *locus*. O Fis médio negativo indica uma ausência de endogamia, sugerindo um excesso de heterozigotos nos *loci* e também um baixo grau de parentesco entre os indivíduos reprodutores dos grupos.

Os resultados das análises de variância molecular mostraram que a maior diferenciação está retida entre os indivíduos de cada grupo, essa informação faz sentido, já que nenhum indivíduo de um grupo tem algum grau de parentesco com o outro.

Mesmo que os níveis de variabilidade genética vista no *L. chrysopygus* possam parecer alarmantes, Pope (1996) em suas pesquisas notou que os baixos níveis de variabilidade genética parecem ser uma característica de todos os gêneros de calitriquídeos, e que podem ser explicados pelas características dos sistemas sociais, como tamanho efetivo da população e crescente possibilidade de endogamia, resultado das oportunidades limitadas de dispersão em ambientes altamente saturados e fragmentados.

4. Conclusões

- ❖ O censo demográfico populacional mostrou existir mais grupos do que o estimado para a região. Desse modo, o número populacional da área estava subestimado e a quantidade de grupos detectados foi maior do que a esperada pela estimativa feita pelo método capacidade/suporte.
- ❖ É importante a realização de novos censos populacionais nos fragmentos ao redor da Floresta Nacional de Capão Bonito e nas matas ciliares dos rios Apíai- Mirim e Paranaipitanga para atualizar o número populacional da espécie na região e também entender se esses sete grupos encontrados estão isolados ou não.
- ❖ Levando em consideração os poucos remanescentes de Mata Atlântica no estado de São Paulo, esse trabalho mostra a importância da conservação da Floresta Nacional de Capão Bonito, principalmente por ser considerado o limite sudeste da espécie e por abrigar grupos de mico-leão-preto.
- ❖ A eficiência da metodologia de captura estipulada inicialmente não foi satisfatória em virtude da falta de ocos nas áreas de vida dos grupos. A outra metodologia testada com o termógrafo mostrou ser promissora, mas ainda necessita de alguns ajustes para aumentar a eficiência do método, porém, também é dependente de ocos.
- ❖ A variabilidade genética encontrada nos *loci* de microssatélites foi baixa nesses dois grupos estudados, como era esperado, visto que outros estudos já haviam revelado uma baixa diversidade genética para populações de *L. chrysopygus*.
- ❖ Apesar dos dois grupos capturados serem grupos vizinhos, os microssatélites analisados mostraram que ambos não têm relações parentais entre si, sugerindo que não há uma dispersão de indivíduos entre eles, embora, a

presença de machos não aparentados com indivíduos do grupo, indica possível dispersão de indivíduos com outros grupos aqui não estudados.

5. BIBLIOGRAFIA

ABBOT, D. H. Behavioural and physiological suppression of fertility in subordinate marmoset monkeys. **American Journal of primatology** v. 6, p. 169-186. 1984.

AYALA, P. Caracterização Genética de la población ex situ del mico león negro (*Leontopithecus chrysopygus*) utilizando marcadores homólogos de tipo microsatélites en la Fundación Parque Zoológico de São Paulo y en el Parque Ecológico de São Carlos. 126 f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) 2013. Dados não publicados.

BAKER, A. J.; DIETZ, J. M.; KLEIMAN, D. G. Behavioural evidence for monopolization of paternity in multi-male groups of golden lion tamarins. **Animal Behaviour**. v. 46, p. 1091-1103. 1993.

BAKER, A. J.; DIETZ, J. M. Immigration in wild groups of golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of primatology**. v. 38, p. 47-56. 1996.

BAKER, A. J.; BALES, K.; DIETZ, J. M. Sistema de acasalamento e dinâmicas de grupo em mico-leões. In: KLEIMAN, D. G; RYLANDS A. B. **Micos-Leões: biologia e conservação**. Tradução de Larissa Stones. Brasília: Smithsonian Institution, 2008. p. 69-88.

BOTSTEIN, D. et al.; Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.

BRONIKOWSKI, A. M.; ALTMANN, J. Foraging in a variable environment: Weather patterns and the behavioral ecology of baboons. **Behavioural ecology and sociobiology**. v. 39, p. 11-25. 1996.

BUENO, A. R. **Determinação da área de vida de um grupo de saguis, *Callithrix aurita*, em um fragmento florestal do sul de Minas Gerais**. 1989. 152 f. Trabalho de conclusão de curso (monografia), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 1989.

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

CBSG. Lion Tamarin Population and Habitat Viability Assessment (PHVA) Workshop, 3rd, 2005. Brasília. Briefing Book... Brasília: Escola de Administração Fazendária, 2005.

CHAPMAN, C. A. Ecological constraints on group size in tree species of neotropical primates. **Folia primatologica**. v. 70, p. 47-54. 1990.

CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 1-29, 2006.

CHIVIAN, E. Biodiversity: its importance to human health. In: CHIVIAN, E. **Harvard Medical School, Boston**. 2002. p. 6-12.

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

COIMBRA FILHO, A. F. Acerca da redescoberta de *Leontideus chrysopygus* (Mikan, 1823) e apontamentos sobre sua ecologia (Callitrichidae, Primates). **Revista Brasileira Biologia**. v. 30, n. 4, p. 609-615. 1970b.

COIMBRA FILHO, A. F. **Os saguis do gênero Leontopithecus Lesson, 1840 (callitrichidae-Primates)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1976.

COIMBRA FILHO, A. F. *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), o mico leão do Estado de São Paulo. **Silvicultura**. São Paulo. v. 10, p. 1-36. 1976b.

COIMBRA FILHO, A. F. Animais predados ou rejeitados pelo sauí-piranga, *Leontopithecus r. rosalia* (L., 1766) na sua área de ocorrência primitiva (Callitrichidae, Primates). **Revista Brasileira Biologia**. v. 41, n. 4, p. 717-731. 1981.

COIMBRA FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Distribution and ecology of the genus *Leontopithecus* in Brazil. **Primates**, v.14, p. 47-66. 1973.

COIMBRA FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Conservation of the Brazilian Lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*) In: RAINER, P; BOURNE, G. H. **Primates Conservation**. New York: Academic Press. 1977. p. 59-94.

COIMBRA FILHO, A. F. et al.; A ciência primatológica e o centro de primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) in: SYMPOSIO DE PRIMATOLOGIA, 1983, Arequipa, Peru.

COIMBRA FILHO, A. F.; CÂMARA, I. G. Os limites originais do bioma mata atlântica na região nordeste do Brasil. Rio de Janeiro, Fundação Brasileira para a conservação da Natureza. 1996.

CULLEN JUNIOR, L.; RUDRAN, R. (2003). Transectos lineares na estimativa de densidade de mamíferos e aves de médio e grande porte. In: Cullen Júnior., L.; Rudran, R.; Valladares-Padua, C. **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba: Ed. Universidade Federal Paraná/ FBPN, 2003. p. 169-179.

CZECH, B.; KRAUSMAN, P. R.; DEVERS, P. K. Economic associations among causes of species endangerment in the United States. **BioScience**, v. 50, n. 7, p. 593-601, 2000.

DEAN, W. With broadax and firebrand: the destruction of the brasilian Atlantic forest. Berkeley: **University of California Press**. 1995.

DEAN, W. A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira. **Cia. das Letras**, São Paulo, v. 1, p. 23. 2004.

DIETZ, J. M. et al.; The effective use of flagship species for conservation of biodiversity: the example of lion tamarins in Brazil. **Creative conservation: interactive management of wild and captive animals**, London. p. 32-49. 1994b.

DIETZ, J. M.; PERES, C. A., PINDER, L. Foraging ecology and use of sapace in wild goldem lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of Primatology**. v. 41, p. 289-305. 1997

FERNANDES, E. M. C.; ALMEIDA, L. F. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC) microsatellite analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 803-807, 2000.

FONSECA, G. A. B. The vanishing Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**. v. 34, p. 17-34. 1985.

FORMAN, L. et al.; Genetics variation among lion tamarins. **American Journal of Physical Anthopopology**. v. 71, p. 1-11. 1986.

FRANKHAM, R. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. **Conservation Biology**, p. 1500-1508, 1996.

FRENCH, J. A. et al. Biologia Reprodutiva do Mico-LEÃO. In:___ **Mico Leões: Biologia e Conservação**. Tradução de Larissa Stones. Brasília, Smithsonian Institution, 2008. p. 186-215.

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

GOLDSTEIN, D. e POLLOCK, D. Launching Microsatellites: Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 335-342, 1997.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: DEZ, 2013.

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

HELLER, R.; OKELLO, J.; SIEGISMUND, H. Can small wildlife conservancies maintain genetically stable populations of large mammals? Evidence for increased genetic drift in geographically restricted populations of Cape buffalo in East Africa. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 7, p. 1324-1334, 2010.

HERSHKOVITZ, P. Living new world monkeys (Platyrrhini) with an introduction to primates. Chicago. **Chicago Press**. v. 1, 1977.

HEYMANN, E. W., Sleeping habits of tamarins. *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis* (Mammalia. Primates. Callitrichidae). in north-eastern Peru. **Journal of Zoology of London**, v. 237, p. 211-226, 1995.

HOLST, B. et al.; Lion Tamarin Population and Habitat Viability Assessment Workshop 2005, final report. Apple Valley, MN: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, 2006. p. 193

IBAMA; MMA. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília, DF: Ed. MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 744-746.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. 2012. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: Dez, 2013.

JOHNSON, W. E. et al.; Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 1, p. 79-94, 1999.

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

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

KIERULFF, M. C. M. et al.; Ecologia comportamental dos micos leões. In: KLEYMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Mico Leões: Biologia e Conservação**. Tradução de Larissa Stones. Brasília, Smithsonian Institution, 2008. p. 216-250

KLEIMAN, D. G. The development of pair preferences in the lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*): Male competition or female choice? In: ROTHE, H.; WOLTERS, H. J.; HEARN, J. P. **Byology and behavior of marmosets**, Gottingen: Eigenverlag h. Rothe. p. 181-188. 1978c.

KLEIMAN, D. G. HOAGE. R. J; GREEN, K. M. The lions tamarins, genus *Leontopithecus*. MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, A. G. B. **Ecology and behavior of neotropical primates**, Washington. World Wildlife Fund. v. 2, p. 299-347. 1988.

KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Lion Tamarin: Biology and Conservation**. Washington: Smithsonian Institution Press, 2002. p. 384.

KONOVALOV, D. A.; MANNING C.; HENSHAW, M. T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. **Molecular Ecology Notes**. v.4, p. 779-782. 2004.

LAWTON, J. H.; MAY, R. M. Extinction Rates. Oxford: **Oxford University Press**, p. 248. 1995.

LIMA, F. S. et al., On the occurrence of the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*) in Buri. **Neotropical Primates**. São Paulo, Brazil. v.11, n. 2, p. 76-77. 2003.

LOVEJOY et al.; Edge and others effects of isolation on Amazon Forest fragments. In: SOULÉ, M. E. **Conservation Biology: the science of scarcity and diversity**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1986. p. 257-85

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção. Belo Horizonte: **Fundação Biodiversitas**, p. 157. 2005.

MAMEDE, A. C. Ecologia de um grupo de mico leões pretos (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan, 1823) na mata ciliar da Fazenda Rio Claro, Lençóis Paulista, SP. 123 f. Dissertação (Mestrado em zoologia), instituto de biociências do Campos de Rio Claro. UNESP, Rio Claro. 1997.

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

MIÑO, C. I. **Genética de Populações e Relações de Parentesco em Ciconiiformes (Aves)**. 2010 Tese (Doutorado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2010.

MITTERMEIER, R. A.; KONSTANT, W. R.; Mast, R. B. Use of neotropical and Malgasy Primates Species in Biomedical Research. **American Journal Primatology**, v. 34, p. 73-80. 1994.

MORAIS JUNIOR, M. M. Sagüis do gênero *Callithrix*: Espécies invasoras no norte do Estado do Rio de Janeiro. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE PRIMATOLOGIA. 2005. Porto Alegre. Livro de Resumos. Porto Alegre: PUCRS e Sociedade Brasileira de Primatologia. 2005. p. 57.

MYERS, N. Threatened Biotas: "Hot Spots" in Tropical Forests. **The Environmentalist**. v. 8, n. 3, p. 187-208, 1988.

NALON, M. A.; MATTOS, I. F. A.; FRANCO, G. A. D. C. Meio Físico e Aspectos da Fragmentação Vegetal. In: Rodrigues, R. R et al. (Coord. Geral). **Diretrizes para a conservação e restauração da biodiversidade no estado de São Paulo**. Programa BIOTA/FAPESP. p. 15 - 22. 2008.

O'BRIEN, T. G.; KINNAIRD, M. F. Behavior, diet and movements of the Sulawesi crested Black macaque (*Macaca nigra*). **International Journal of Primatology**. v. 18, p. 321. 1997.

PARANHOS, K. M.; ROPER, J. J. **Estimativas populacionais para espécies raras: o mico-leão-preto *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) como modelo**. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

PASSOS, F. C. Seed dispersal by black lion tamarin, *Leontopithecus chrysopygus* (Primates, Callitrichidae), in southeastern Brazil. **Mammalia** v. 61, n. 1, p. 109-111. 1997.

PASSOS, F. C.; KEUROGHLIAN, A. Foraging behavior and microhabitats used by Black Lion tamarins, *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan) (Primates, callitrichidae). **Revista Brasileira de zoologia**. v. 16, p. 219. 1999.

PEAKALL R.; SMOUSE P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295. 2006.

PERES, C. A. Cost and benefits of territorial defense in wild golden Lion tamarin *Leontopithecus rosalia*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 25, p. 227- 233 1989b.

PERES, C. S. A previsão constitucional do bioma mata atlântica. **Revista Brasileira de direitos constitucional**. v. 16, p. 109-119, jul/dez. p. 2010.

PEREZ-SWWENEY, B; et al.; Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**. 2008.

PIMM, S. et al.; The future of biodiversity. **Biological Conservation**, v. 75, n. 3, p. 310-310. 1996.

POPE, T. R. Socioecology, population fragmentation, and patterns of genetics loss in endangered primates. In: Avise, J. C.; HAMRICK. **Conservation genetics: Case studies from nature**. New York: Chapman and Hall. 1996. p. 119-159.

PRESSEY, R. L. et al.; Beyond opportunism: Key principles for systematic reserve selection. **Tree**. v. 8, n. 4, p. 124-128. 1993.

QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**. v. 43, n. 2, p. 258-275. 1989.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REDFORD, K. H.; FONSECA, G. A. B. The role of gallery forests in the zoogeography of the cerrado's non-volant mamalian fauna. **Biotropica**. v. 18, p. 126-135. 1986.

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

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

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**. v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.

RÖHE, F.; ANTUNES, A. P.; TÓFOLI C. F. The discovery of a new population of black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*) in the Serra de Paranapiacaba, São Paulo, Brazil. **Neotropical Primates**. v. 11, n. 2, p. 75-76. 2003.

RUELL, E. W.; CROOKS, K. R. Evaluation of noninvasive genetic sampling methods for felid and canid populations. **The Journal of Wildlife Management**, v. 71, n. 5, p. 1690-1694, 2007.

RYLANDS, A. B. **Behavior and ecology of three species of marmosets and tamarins (Callitrichidae, primates) in Brazil**. Tese (doutorado). Universidade de Cambridge, Cambridge, 1982.

RYLANDS, A. B. Sympatric Brazilian callitrichids: the black-tufted-ear marmoset, *Callithrix kllhli*, and the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*. **Journal of Heredity Evolution**. v. 18, p. 679-695. 1989b.

RYLANDS, A. B. The ecology of the lion tamarins, *Leontopithecus*: some intrageneric differences and comparisons with other callitrichids, **Oxford University Press**. p. 296-313. 1993.

RYLANDS, A. B.; KEUROGHLIAN. A. Primate populations in continuous forest and forest fragments in central Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 291-307. 1988.

RYLANDS, A. B.; RODRIGUES-LUNA, E. Threatened primates of Mesoamerica and South America. **The Red List 2000. Neotropical Primates**. v. 8, n. 3, p.115, 2000.

RYLANDS, A. B.; MITTEMEIER, A. R.; KONSTANT, W. R. Species and subspecies of primates described since 1990, **Neotropical Primates**, v. 9, p. 75-78. 2001.

RYLANDS, A. B.; KIERULFF, M. C.; PINTO, L. P. Distribution and status of lion tamarins. In: KLEIMAN, D. G; RYLANDS, A.B. **Lion Tamarins: Biology and Conservation**, Smithsonian Institution Press, Washington, 2002. p. 42-70.

RYLANDS, A. B. et al., Distribuição e *status* dos micos-leões. In: KLEIMAN, D.G; RYLANDS A.B. **Micos-Leões: biologia e conservação**. Tradução de Larissa Stones. Brasília: 2008. p. 69-88.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2^a ed. Cold Spring Harbor Press, New York. 1989.

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

SEAL, U.; BALLOU L.; VALLADARES-PADUA. *Leontopithecus* Population Analysis. Apple Valley, MN: International Union for Conservation of Nature and Natural Resource/ Species Survival Commission (IUCN/SSC) Captive Breeding Specialist Group (CBSG). 1990.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology letters**, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006

SHAFFER, M.L. Minimum population sizes for species conservation. **Bioscience**, v. 31, p. 131-134. 1981.

SOULÉ, M.; GILPIN, M.; CONWAY, W.; FOOSE, T. The millennium Ark; How long voyage, how many staterooms, how many passengers? **Zoo Biology**. v. 5, p. 101. 1986.

SPIELMAN, D. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? **Conservation Genetics**. v. 5, p. 439–448. 2004.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

VALLADARES-PADUA, C. **Black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus*: Status and conservation**. Tese (Mestrado), University of Florida, Gainesville. 1987.

VALLADARES-PADUA, C. **The ecology, behavior and conservation of the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan, 1823)**. Doctoral dissertation, University of Florida, Gainesville. 1993.

VALLADARES-PADUA, C; CULLEN JUNIOR, L. Distribution, abundance and minimum viable metapopulation of the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Journal of the wildlife preservation trusts** v. 30, p. 80-88. 1994.

VALLADARES-PADUA, C; PRADO, F; MAIA, R.G. Survey new population of Black-faced lion tamarin (*leontopithecus caissara*) in São Paulo and Paraná states. Instituto de Pesquisas Ecologicas (IPÊ), Nazaré Paulista, São Paulo. Relatório não publicado. 2000a.

YOUNG, T P. ISBELL, L A. Minimum group size and other conservation lessons exemplified by a declining primate population. **Biology Conservation**. v 68, p 129-34. 1994.

ZANE, L.; BARGELLONI, L; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.