

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

**NATHALIA BULHÕES JAVAROTTI**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, DEMOGRAFIA HISTÓRICA E ASPECTOS SÓCIO-  
REPRODUTIVOS DO MICO-LEÃO-PRETO (*Leontopithecus chrysopygus*)**

São Carlos – SP

2024

**NATHALIA BULHÕES JAVAROTTI**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, DEMOGRAFIA HISTÓRICA E ASPECTOS SÓCIO-REPRODUTIVOS DO MICO-LEÃO-PRETO (*Leontopithecus chrysopygus*)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção de título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Área de concentração:** Genética e Evolução

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Domingues de Freitas

SÃO CARLOS – SP

2024

## AGRADECIMENTOS

O encerramento desse ciclo merece muitos agradecimentos aos que tornaram possível a conclusão de mais essa etapa da minha formação acadêmica.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas, por ter aceitado me orientar ainda na iniciação científica, e que desde então vem contribuindo para minha formação pessoal e profissional. Agradeço por toda a confiança e parceria em todos esses anos.

Meu enorme agradecimento a todos os membros atuais e aos que passaram pelo LabBMC (Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação), por todas as conversas, científicas ou não, toda colaboração e amizade. Em especial quero agradecer a Dra. Paola Ayala-Burbano, que compartilhou sua paixão pelo mico-leão-preto comigo, que me auxiliou em todo o aprendizado inicial no laboratório e que hoje se tornou uma grande amiga.

A Dra. Carla Gestich, Dr. Bruno Saranholi, Dra. Marina Elisa Oliveira, Ma. Camila Francisco Gonçalves, Leonardo W. G. F. Olímpio e Anderson Coimbra, que tornam o dia a dia no laboratório um momento especial. Eu tenho orgulho de fazer parte do time que formamos e quero agradecer por todo o apoio, ensinamentos, conselhos, fofocas e cafezinhos. Eu tenho muita sorte em ter pessoas maravilhosas e pesquisadores exemplares como vocês ao meu lado, me inspirando todos os dias. Tenho certeza de que vou levar essa amizade para toda a minha vida. Mais que colegas de trabalho, vocês se tornaram minha segunda família, e eu sou muito grata por isso.

Aos meus amigos Suzana Alves Fernandes, Gustavo Palombo, Bruno Matheus Gomes, Gabriela Aliaga-Samanez e Jacqueline Gardellin muito obrigada por cada conversa, risada ou desabafo. A minha colega de quarto e grande amiga Marina Del Giudice, agradeço imensamente toda companhia e cumplicidade nesses anos todos.

A todos que contribuíram com amostras: Profa. Dra. Laurence Culot da UNESP de Rio Claro e toda a equipe do Laboratório de Primatologia – LAP, Dra. Gabriela C. Rezende, e ao Instituto de Pesquisa Ecológicas – IPE. Obrigada por confiarem a mim amostras que foram coletadas com muito esforço e dedicação.

A todos os pesquisadores e pesquisadoras que se dedicam para conservação do mico-leão-preto. Espero que esse trabalho seja mais ferramenta para auxiliar na conservação desse primata tão ameaçado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e ao PPGGEV (Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular), que possibilitaram a realização dessa pesquisa.

E por último e não menos importante, quero agradecer a minha família – a minha mãe Marcia, que me ensinou a ser forte, e que sempre me incentivou a lutar pelas coisas que eu acredito e nunca me deixou desistir, ao meu pai Jairo, que desde criança me instigou a conhecer a natureza, os animais e plantou uma sementinha sobre a biologia e a conservação em mim, ao meu irmão José Pedro, Pepe, obrigada por me mostrar que a vida é mais bonita tendo alguém que me entende e me apoia tão bem como você. Vocês são a razão de tudo isso, e todos os dias me incentivam ser melhor.

## RESUMO

Mudanças na paisagem, ocasionadas pela perda e fragmentação do habitat decorrente do desmatamento, vêm se mostrando um grande desafio para a sobrevivência e persistência de espécies dependentes de florestas. Os primatas Neotropicais estão entre as espécies animais mais ameaçadas por tais alterações. Dentre estes está o mico-leão-preto (MLP), *Leontopithecus chrysopygus*, que é endêmico da Mata Atlântica do estado de São Paulo, bioma com intensa redução de cobertura florestal. Atualmente, a distribuição dessa espécie se limita a cerca de 20 fragmentos florestais, compreendidos em três regiões ao longo do rio Paranapanema, os quais apresentam diversidade paisagística em termos de tamanho, recursos e conectividade. Populações fragmentadas, desconectadas e com baixas densidades tendem a ser mais susceptíveis a eventos que promovem redução da diversidade genética e aumento da endogamia, como, por exemplo, ausência ou diminuição de fluxo gênico, e aumento da estruturação e da deriva genética. Neste contexto, tais populações estão mais sujeitas a sofrer extinções locais, comprometendo a manutenção e viabilidade da espécie em longo termo. A fragmentação e alteração do habitat também pode afetar a estrutura e dinâmica social dos grupos familiares do MLP, fazendo com que estes busquem estratégias alternativas para garantir a reprodução e sobrevivência. No presente trabalho nós investigamos a estrutura e diversidade genética de *L. chrysopygus*, provenientes de fragmentos em duas regiões de ocorrência atual da espécie, Pontal do Paranapanema e Alto Paranapanema; e caracterizamos a estrutura matrilinear e as relações de parentesco, com o intuito de compreender aspectos sócio-reprodutivos e demográficos, e assim gerar informações relevantes para o manejo e conservação da espécie. Para isso, foram realizadas análises de microssatélites (região nuclear) e da região mitocondrial Dloop. Os resultados mostram que a diversidade genética encontrada nos fragmentos variou de baixa a moderada para ambos os marcadores ( $H_d = 0,000 - 0,51$ ;  $H_o = 0,088 - 0,719$ ). A análise de simulação da perda de diversidade genética nos próximos 100 anos revelou que apenas a população do Morro do Diabo (Pontal do Paranapanema) conseguirá reter 90% da diversidade genética atual. As análises de demografia histórica indicam uma redução populacional ocorrida há aproximadamente 5-7 mil anos, coincidindo com o Holoceno Médio, período em que houve alterações climáticas e paisagísticas na Mata Atlântica. As análises de parentesco sugerem a ocorrência de poligamia em alguns grupos familiares do MLP. Os dados gerados neste trabalho são relevantes para ampliar o conhecimento sobre a biologia da espécie, bem como para gerar *insights* para seu eventual manejo e sua conservação.

**Palavras-chave:** diversidade genética; Mata Atlântica; primatas neotropicais; marcadores moleculares.

## ABSTRACT

Changes in the landscape, caused by habitat loss and fragmentation due to deforestation, have been posing a great challenge for the survival and persistence of forest-dependent species. The Neotropical primates are among the animal species most threatened by such changes. Among them is the black lion tamarin (BLT), *Leontopithecus chrysopygus*, which is endemic to the Atlantic Forest of the state of São Paulo, a biome with intense reduction of forest cover. Currently, the distribution of this species is limited to about 20 forest fragments, comprised in three regions along the Paranapanema river, which present landscape diversity in terms of size, resources and connectivity. Fragmented, disconnected and low-density populations tend to be more susceptible to events that promote genetic diversity reduction and inbreeding increase, such as, for example, absence or decrease of gene flow, and increase of genetic structure and drift. In this context, such populations are more likely to suffer local extinctions, compromising the maintenance and viability of the species in the long term. The fragmentation and alteration of the habitat can also affect the structure and social dynamics of the BLT family groups, making them seek alternative strategies to ensure reproduction and survival. In this work we investigated the structure and genetic diversity of *L. chrysopygus*, from fragments in two regions of current occurrence of the species, Pontal do Paranapanema and Alto Paranapanema; and we characterized the matrilineal structure and the kinship relations, with the aim of understanding socio-reproductive and demographic aspects, associated with historical and contemporary events, and thus generate relevant information for the management and conservation of the species. For this, analyses of microsatellites and the mitochondrial region Dloop were performed. The results show that the genetic diversity found in the fragments varied from low to moderate for both markers ( $H_d = 0.000 - 0.51$ ;  $H_o = 0.088 - 0.719$ ). The predictive analysis revealed that only the population of Morro do Diabo (Pontal do Paranapanema), will be able to retain 90% of the current genetic diversity for the next 100 years. The historical demography analyses indicate a population reduction occurred approximately 5-7 thousand years ago, coinciding with the period of the Middle Holocene, when there were climatic and landscape changes in the Atlantic Forest. The kinship analyses suggest the occurrence of polygamy in some family groups of BLTs. The data generated in this work are relevant to increase the knowledge about the biology of the species, as well as to generate insights for its eventual management and conservation.

**Keywords:** genetic diversity; Atlantic forest; Neotropical primates; molecular markers.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa de um recorte do estado de São Paulo, destacando as populações de conhecidas mico-leão-preto pertencentes as regiões do Pontal do Paranapanema (círculo), Médio Paranapanema (losango) e Alto Paranapanema (triângulo), e as regiões com potencial ocorrência (estrela).....15
- Figura 2** – Mapa de um recorte do estado de São Paulo, indicando os fragmentos em que foram realizadas coletas para as amostras de *Leontopithecus chrysopygus* analisadas neste estudo (A), com ampliação para as regiões do Pontal Paranapanema (B) e Alto Paranapanema (C). O losango indica as áreas localizadas no Pontal do Paranapanema e o círculo indica as áreas localizadas no Alto Paranapanema.....20
- Figura I.1** – Análise de *clusterização*, sem informação *a priori*, por Inferência Bayesiana realizada no BAPS (A), utilizando as sequências de Dloop demonstrando K=4; e no Structure (B-C), utilizando microssatélites para sete populações remanescentes de *Leontopithecus chrysopygus* do Alto (MD: Parque Estadual do Morro do Diabo; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca) e do Pontal (An: Angatuba; Bu: Buri, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito) do Paranapanema. Os gráficos indicam a presença de K=4 (B) de acordo com o método de Evanno *et al* (2005) (D) e K=7 (C) de acordo com o método de Pritchard *et al* (2000) (E).....36
- Figura I.2** – Análise de Coordenadas Principais (PCoA), evidenciando os agrupamentos obtidos com dados de microssatélites para as populações de *Leontopithecus chrysopygus* provenientes do Pontal do Paranapanema: Morro do Diabo (MD), Santa Maria (SM) e Ponte Branca (PB); e do Alto Paranapanema: Capão Bonito (CB), Angatuba (An), Guareí (Gu) e Buri (Bu).....37
- Figura I.3** – Rede de haplótipos construída com os dados de sequências de Dloop para a espécie *L. chrysopygus* utilizando o método de *Median-Joining*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os traços representam o número de mutações entre os haplótipos. Os círculos em preto representam haplótipos não amostrados que foram inferidos pela análise (“*median vectors*”). As cores indicam os fragmentos detalhados na legenda. An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito. ....40

**Figura I.4** – Matriz de correlação de *Sperman* entre os valores de diversidade genética e área do fragmento.  $H_o$ ,  $H_e$ ,  $R_a$ ,  $F_{IS}$  (A) e entre a área dos fragmentos e os índices de relacionamento Wang, Ritland e QuellerGT (B). O gradiente de coloração indica o coeficiente de correlação ( $\rho$ ) entre as variáveis analisadas, variando de -1 (vermelho escuro) a 1 (azul escuro). \* p-valor  $p < 0.05$ .....41

**Figura I.5** – Análise de *Mismatch Distribution* para as sequências Dloop para a região do Alto (A) e Pontal do Paranapanema (B). Distribuição da frequência do número de diferenças entre os pares de sequências (Pontal: SSD = 0.125  $p = 0.02$ ; índice de Raggdness = 0.388,  $p = 0.86$ ), (Alto: SSD = 0,206,  $p = 0,090$ ); índice de Raggdness = 0.388,  $p=0.861$ ).....42

**Figura I.6** – Análise de *Bayesian Skyline Plot* mostrando o tamanho populacional ao longo do tempo da espécie *L. chrysopygus* nas regiões (A) Alto e (B) Pontal do Paranapanema. A linha preta sólida indica a estimativa média e a área em azul o intervalo de maior densidade posterior (95%).....43

**Figura I.7** – Análise de predição para retenção da diversidade genética atual (alelos observados, heterozigosidade observada e esperada) nos próximos 100 anos em populações de *Leontopithecus chrysopygus* de sete fragmentos, considerando ausência de redução (100%) e redução de 25%, 50% e 75% no tamanho populacional atual estimado.....45

**Figura II.1** – Heredograma da família cativa “Kinha x Calixto” da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) atribuída através das análises de parentesco realizadas no programa CERVUS.....66

**Figura II.2** – Heredograma dos grupos BGE, BT e BGM de Buri (Bu), Gu\_01 de Guareí (Gu), PB de Ponte Branca (PB) e CB\_02 de Capão Bonito (CB) atribuídos através das análises de parentesco realizadas no programa CERVUS, evidenciando apenas relações monogâmicas.....67

**Figura II.3** – Heredograma dos grupos An\_01 de Angatuba (An), Gu\_01 e Gu\_03 de Guareí (Gu) e CB\_01 de Capão Bonito (CB) atribuídos através das análises de parentesco realizadas no programa CERVUS. H1-H7 indicam o haplótipo do indivíduo. Os círculos indicam fêmeas e os quadrados indicam machos. As linhas tracejadas indicam uma provável existência de gêmeos.....68

**Figura II.4** – Gráfico com o número de indivíduos para cada faixa etária (adultos, juvenis e filhotes) por cada grupo de vida-livre de *Leontopithecus chrysopygus*.....71

**Figura II.5** – Representação dos haplótipos encontrados nos indivíduos dos grupos familiares de *Leontopithecus chrysopygus*. Cores representam todos os haplótipos encontrados no trabalho (H1 – H7).....72

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Dados das amostras de *Leontopithecus chrysopygus* estudadas no presente estudo, indicando o local de procedência (Fragmento), o código de identificação da amostra (ID), o grupo social em que os animais foram encontrados, o sexo, a faixa etária (Idade), o tipo de amostra coletada e informações adicionais sobre o fragmento, como área em hectares, e tamanho populacional estimado.....20
- Tabela 2** – Informações dos animais de cativeiro, pertencentes a um grupo familiar mantido sob cuidado humano na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, SP) utilizados para validar as análises de parentesco, indicando a identificação do animal, o sexo, a data de nascimento, o local de nascimento e o pai e a mãe.....22
- Tabela 3** – Informações sobre os loci microssatélites utilizados nesse estudo, indicando à espécie para qual foram descritos, o nome do locus, às sequências forward e reverse dos primers, a temperatura de anelamento (TA) e fluorescência utilizadas nas reações de amplificação.....23
- Tabela I.1** – Valores de  $F_{ST}$  par a par, utilizando as sequências de Dloop (abaixo da diagonal) e microssatélites (acima da diagonal) para os sete fragmentos analisados. MD: Parque Estadual do Morro do Diabo; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca; An: Angatuba; Bu: Buri, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito. \* Valores significativos de p ( $p < 0,05$ )....36
- Tabela I.2** – Índices de diversidade genética, utilizando o marcador Dloop e os marcadores microssatélites, calculados para cada fragmentos analisados. (N) Número de indivíduos, (h) número de haplótipos, (S) número de sítios polimórficos, (Hd) diversidade haplotípica, ( $\pi$ ) diversidade nucleotídica, (Na) número de alelos, (Ne) número de alelos exclusivos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (Ra) riqueza alélica, ( $F_{IS}$ ) coeficiente de endogamia, ( $P_{DH}$ ) valores de p para déficit de heterozigotos do coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ , ( $P_{EH}$ ) valores de p para excesso de heterozigotos do coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ . An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito. \* p-valor  $< 0,00079$  \*\*p-valor  $< 0,0006$ .....38

<b>Tabela I.3</b> – Frequências dos alelos exclusivos nos fragmentos analisados. Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo e CB: Floresta Nacional de Capão Bonito.....	39
<b>Tabela I.4</b> – Valores médios de relacionamento calculados a partir dos índices de Wang, Ritland e QuellerGT e a área (ha) para cada fragmento.....	40
<b>Tabela I.5</b> – Valores para os testes de neutralidade D de Tajima e FS de Fu para as regiões do Alto e do Pontal do Paranapanema.....	41
<b>Tabela I.6</b> – Valores de p para a análise de <i>Bottleneck</i> nos fragmentos, segundo os diferentes modelos de mutações. IAM (Alelos Infinitos), SMM ( <i>Stepwise Mutation</i> ) e TPM ( <i>Two Phase Mutation</i> ). An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito. Os valores significativos ( $p < 0,05$ ) estão em negrito.....	43
<b>Tabela I.7</b> – Taxa de migrantes, calculada pelo método de alelos privados entre os fragmentos par a par. An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito.....	44
<b>Tabela I.8</b> – Alelos privados entre os grupos de Buri, de acordo com os resultados da estruturação, que agrupou os grupos BGM, BGE e BG_04 em um cluster e o grupo BT em outro cluster .....	48
<b>Tabela I.9</b> – Valores médios de diversidade para os <i>clusters</i> genéticos encontrados. ( <i>Cluster 1</i> : Santa Maria, Ponte Branca e Morro do Diabo; <i>Cluster 2</i> : Angatuba e Guareí; <i>Cluster 3</i> : Grupos BGM, BGE e BG_04 - Buri e <i>Cluster 4</i> : grupo BT – Buri).....	49
<b>Tabela II.1</b> – Resultado da análise de parentesco realizada no programa CERVUS da família cativa “Kinha x Calixto” da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Trio confidence: * >95%, 95%< + >90% e - <90% LOD: logaritmo natural (log na base e) da razão de verossimilhança geral .....	66

**Tabela II.2** – Valores de LOD e Delta para a atribuição de parentesco realizadas pelo programa Cervus. A ID dos pais/mães candidatos foram colocadas em negrito. Os indivíduos considerados gêmeos foram marcados com \*. Delta: diferença entre as razões de verossimilhança para dois pais candidatos mais prováveis. LOD: logaritmo natural (log na base e) da razão de verossimilhança geral .....67

**Tabela II.3** – Índices de relacionamento, segundo o método de Li et al (1993) e Wang (2002), e haplótipos do Dloop para indivíduos atribuídos como prováveis casais reprodutores.....70

**Tabela II.4** – Valores de relacionamento entre os pares reprodutores atribuídos, valores de relacionamentos simulados para cada fragmento e p-valor.....70

**Tabela II.5** – Composição dos grupos de *Leontopithecus chrysopygus* em relação ao número de indivíduos e o número de machos e fêmeas por cada faixa etária (adultos, jovens e filhotes)..... 70

**Tabela II.6.** Lista de haplótipos (H1-H7) encontrados nos indivíduos amostrados de *Leontopithecus chrysopygus*.....72

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS &amp; HIPÓTESES</b> .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>3.1. Requisitos éticos e licenças para pesquisa</b> .....	19
<b>3.2. Amostragem biológica e extração de DNA</b> .....	19
<b>3.3. Amplificação e genotipagem de microssatélites</b> .....	23
<b>3.4. Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial</b> .....	25
<b>3.5. Análises de estrutura e diversidade genética usando dados de microssatélites</b> .....	26
<b>3.6. Análises de predição de perda de diversidade genética</b> .....	27
<b>3.7. Análises de estrutura e diversidade genética usando dados de Dloop</b> .....	28
<b>3.8. Análises de parentesco</b> .....	29
<b>3.9. Teste de escolha de parceiros baseada em dados de parentesco</b> .....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
<b>Capítulo I: Diversidade e estruturação genética de populações de vida livre do ameaçado mico-leão-preto</b> .....	32
<b>I.1. INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>I.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>I.3. RESULTADOS</b> .....	35
<b>I.3.1. Genotipagem e sequenciamento</b> .....	35
<b>I.3.2. Estruturação populacional</b> .....	35
<b>I.4.3. Diversidade genética</b> .....	38
<b>I.2.4. Demografia histórica</b> .....	41
<b>I.2.5 Análises preditivas de viabilidade populacional</b> .....	44
<b>I.5. DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>I.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	53
<b>I.7. REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>Capítulo II: Estrutura sócio-reprodutiva do mico-leão-preto</b> .....	62
<b>II. 1. INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>II.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	65
<b>II. 3. RESULTADOS</b> .....	65
<b>II.3.1. Validação do painel de microssatélite</b> .....	65
<b>II.4.2. Análises de parentesco e inferências sócio-reprodutivas</b> .....	66

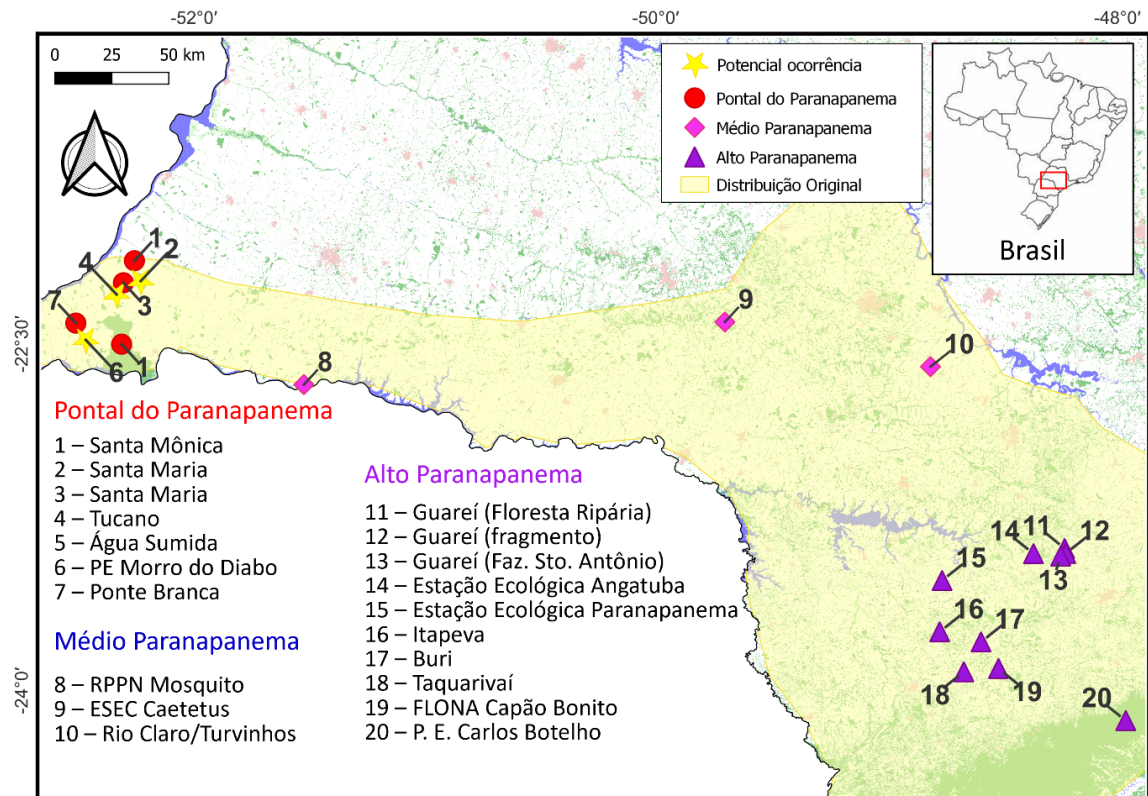
<b>II.4.2. Escolha de parceiro baseada em parentesco .....</b>	<b>69</b>
<b>II.4.3. Composição do Grupo.....</b>	<b>70</b>
<b>II.5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>II. 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>II.7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>92</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é considerada um dos maiores *hotspots* de biodiversidade do mundo, no entanto, ao longo do tempo, as atividades antrópicas resultaram em uma severa perda e fragmentação desta floresta, reduzindo sua cobertura vegetal para 12% da cobertura original (RIBEIRO *et al.*, 2011, 2009). No estado de São Paulo o desmatamento atingiu índices que resultaram em 2016 em estimativas da manutenção de cerca de 22% da floresta original. Entretanto, entre 2019 e 2020 os índices de desmatamento aumentaram 400% em relação aos anos anteriores (INSTITUTO SOS MATA ATLÂNTICA, 2021), intensificando ainda mais as ameaças às populações de espécies dependentes de florestas.

O mico-leão-preto (MLP), *Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823 (Primates, Callitrichidae), é um primata endêmico da Mata Atlântica do estado de São Paulo (REZENDE *et al.*, 2020), considerado em perigo de extinção, tanto nacionalmente pelo MMA (Ministério do Meio Ambiente - Portaria MMA nº 148), quanto internacionalmente (EN, *Endangered*) pela lista vermelha da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) (REZENDE *et al.*, 2020). Essa classificação se deve à previsão de declínio populacional de 50% ou mais em até três gerações, relacionado, principalmente, com a perda, fragmentação e desconexão dos habitats (PASSOS *et al.*, 2015; REZENDE *et al.*, 2020). A distribuição geográfica original desta espécie se estendia entre os rios Tietê e Paranapanema, sendo limitada pelo rio Paraná (KLEIMAN; RYLANDS, 2004). Porém, devido, provavelmente, aos desmatamentos e avanços das áreas urbanas e agrícolas em seu habitat natural, atualmente as populações de MLP podem ser encontradas em cerca de 20 fragmentos florestais (FORERO-SÁNCHEZ, 2020), distribuídos em três principais regiões, a saber: o Pontal do Paranapanema, localizado a oeste do estado de São Paulo; o Médio Paranapanema, localizado no centro do estado; e o Alto Paranapanema, localizado no centro-leste do estado de São Paulo (Figura 1). Do total de fragmentos com ocorrência atual da espécie, apenas oito estão localizados em áreas protegidas e somente um (Parque Estadual do Morro do Diabo) teve sua população considerada demograficamente viável (HOLST *et al.*, 2006; PARANHOS, 2006; REZENDE *et al.*, 2020). Assim, a maioria dos fragmentos onde o MLP está atualmente presente apresenta tamanhos reduzidos e desconectados, e apesar da espécie demonstrar flexibilidade e resiliência, suas populações continuam sofrendo os impactos negativos das ações humanas (FORERO-SÁNCHEZ, 2020; CULOT *et al.*, 2015; MAMEDE-COSTA; GOBBI, 1998; VALLADARES-PADUA, 1993).

**Figura 1.** Mapa de um recorte do estado de São Paulo, destacando as populações de conhecidas mico-leão-preto pertencentes as regiões do Pontal do Paranapanema (círculo), Médio Paranapanema (losango) e Alto Paranapanema (triângulo), e as regiões com potencial ocorrência (estrela).



A perda e fragmentação do habitat propiciam uma redução da diversidade genética, devido principalmente aos gargalos populacionais e aos efeitos mais acentuados da deriva, que se somam à potencial interrupção ou diminuição da dispersão e fluxo gênico efetivo (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE; 2008; LINO *et al.*, 2019). Neste contexto, há uma tendência ao aumento de endocruzamentos, e, conseqüentemente, dos efeitos deletérios de alelos recessivos prejudiciais, os quais podem conduzir à depressão por endogamia (AYALABURBANO *et al.*, 2017; (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE; 2008;). Aspectos relacionados à biologia e comportamento de uma espécie podem também promover a manutenção de níveis de diversidade genética mais reduzidos. No caso dos MLPs, estes se organizam em pequenos grupos sociais, compostos por 2 a 8 indivíduos, incluindo, geralmente, um único casal alfa reprodutor, além de juvenis e infantes (BAKER, A J; BALES; DIETZ, 2008; CARVALHO; CARVALHO, 1989; COIMBRA-FILHO, 1976; KLEIMAN, 1983; MARSDEN, 1985). As fêmeas se reproduzem apenas uma vez ao ano, podendo ocorrer gestação gemelar, com nascimentos de *twins* e ocasionalmente de *triplets* (CARVALHO; CARVALHO, 1989; HARRIS *et al.*, 2014).

O sistema social descrito para o MLP é o monogâmico (KLEIMAN; MALLINSON, 1998). No entanto, sistemas de acasalamentos flexíveis envolvendo relações poliândricas e/ou poligâmicas já foram reportados para outras espécies do gênero *Leontopithecus* (e.g. *Leontopithecus rosalia*: DIETZ; BAKER, 1993) e para outros calitriquídeos (e.g. *Callithrix jacchus*: RODA; PONTES, 1998). Evidências de poligamia para o MLP também foram recentemente sugeridas (GARCIA *et al.*, 2021). Porém, ainda se sabe muito pouco sobre o comportamento reprodutivo e estrutura social desta espécie. Similarmente, um número reduzido de estudos foi conduzido com o intuito de acessar a diversidade genética e o padrão de sua distribuição nas populações de vida-livre do MLP, atualmente restritas a fragmentos com tamanhos diferenciados e paisagens alteradas (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017, 2020; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2005).

A fragmentação e alteração do habitat pode afetar diretamente a estrutura e dinâmica social dos grupos familiares do MLP, fazendo com que estes busquem estratégias alternativas para garantir sua reprodução e sobrevivência. O isolamento das populações e a saturação do ambiente podem reduzir o processo de dispersão e estimular a ocorrência de poliginia, por exemplo (BAKER, A; BALES; DIETZ, 2002; RODA; PONTES, 1998). Todos estes fatores influenciam os níveis de diversidade genética e diferenciação populacional, podendo também interferir na viabilidade populacional. Neste sentido, a análise de dados genético-moleculares pode auxiliar a esclarecer questões relacionadas ao padrão de distribuição da diversidade genética no presente e no passado, além de fornecer informações sobre as relações de parentescos inter- e intra-grupos, as quais são relevantes ao entendimento do comportamento da espécie e da dinâmica de suas populações (BELAY; MORI, 2006; HAYAISHI; KAWAMOTO, 2006; HUCK; ROOS; HEYMANN, 2007). Tais dados também permitem a realização de análises preditivas de simulação para o futuro, que visem avaliar a viabilidade das populações e sua capacidade de persistência ao longo do tempo, considerando a manutenção da diversidade genética e do potencial evolutivo da espécie (ACEVEDO-GARCÉS *et al.*, 2021).

Diferentes classes de marcadores moleculares, com características próprias e potenciais de aplicação distintos, vêm sendo utilizadas em abordagens que visam esclarecer questões voltadas ao entendimento da diversidade de espécies e populações e sua conservação (FRANKHAM, 2008; ARIF *et al.*, 2011; RAMESH *et al.*, 2020). Dentre estas classes estão os *loci* de microssatélites e os marcadores mitocondriais, os quais podem ser empregados de forma individual ou combinada para investigar aspectos relacionados à biologia das espécies e a eventos históricos e contemporâneos que modulam o padrão de distribuição da diversidade genética das populações (ACEVEDO-GARCÉS *et al.*, 2021; DOLOTOVSKAYA; ROOS;

HEYMANN, 2020; FAULKES; ARRUDA; MONTEIRO DA CRUZ, 2003; HUCK; ROOS; HEYMANN, 2007; PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003), incluindo do MLP (AYALA-BURBANO *et al.*, 2017; JAVAROTTI, 2021; MODENA, 2021; VELTRONI, 2018).

Os microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR, *Simple Sequence Repeats*) podem estar presentes em regiões gênicas, sendo mais comumente encontrados, no entanto, em regiões não-codificantes do genoma nuclear. Por este motivo, estes marcadores costumam exibir um alto grau de polimorfismo, que somado ao seu caráter codominante, permite a detecção de heterozigotos e análises de identificação individual (SUNNUCKS, 2000). Essas características tornam esta classe de marcadores extremamente eficiente para avaliar os níveis de diversidade e diferenciação genética dentro e entre populações, além de possibilitar inferências sobre tamanho efetivo populacional, eventos de gargalos, dispersão e fluxo gênico efetivo (BEAUMONT; NICHOLS, 1996; ( FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; RUSSELLO; AMATO, 2004); e sobre as relações de parentesco e o grau de endogamia (LEITE *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O DNA mitocondrial (DNAm), por sua vez, é um genoma haploide, transmitido exclusivamente pela mãe, não estando, portanto, sujeito a eventos de recombinação e singamia (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003). Embora as taxas mutacionais do mitogenoma sejam elevadas, regiões do DNAm podem revelar assinaturas genéticas de um cenário mais antigo (AVISE, 1994), permitindo investigar aspectos históricos que modularam os padrões de diferenciação de suas populações, além de caracterizar a estrutura genética matrilinear de grupos familiares e facilitar o entendimento de questões relativas à demografia e comportamento (HUCK; ROOS; HEYMANN, 2007; PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003). Neste contexto, dados mitocondriais que exibem baixa diversidade haplotípica para marcadores mais polimórficos, como a região controle do DNAm (Dloop), por exemplo, podem sugerir uma provável filopatria feminina. Por outro lado, uma alta variabilidade de haplótipos dentro de grupos familiares, e/ou uma menor diversidade entre grupos, pode indicar uma maior dispersão das fêmeas (HUCK; ROOS; HEYMANN, 2007). A existência de filhotes de mesma idade com haplótipos distintos dentro de um mesmo grupo social, por sua vez, pode sugerir a existência de poliginia. Já a poliandria pode ser detectada através da combinação de dados mitocondriais com dados de parentescos, estimados pela análise de *loci* de microssatélites, por exemplo (DOLOTOVSKAYA; ROOS; HEYMANN, 2020). Todos esses estudos apresentam especial relevância dentro do contexto conservacionista, uma vez que permitem detectar padrões comportamentais e de estruturação populacional, além de possibilitar análises de predição para tendências futuras de redução da

diversidade genética e, conseqüentemente, do potencial evolutivo e capacidade da espécie persistir em longo termo (ACEVEDO-GARCÉS *et al.*, 2021; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Estas informações podem ser úteis para indicar áreas prioritárias à conservação da espécie, por exemplo, para o reestabelecimento da conectividade entre fragmentos específicos, através da criação de corredores reflorestados; e/ou para auxiliar tomadas de decisão que visem translocações, suplementações e/ou reintroduções em áreas de ocorrência histórica da espécie; como previsto no Programa de Conservação do Mico-Leão-Preto (FORERO-SÁNCHEZ, 2020; REZENDE, 2014).

## 2. OBJETIVOS & HIPÓTESES

Considerando a problemática aqui apresentada, este trabalho teve como objetivo geral caracterizar a diversidade genética e seu padrão de distribuição em distintas populações de vida livre de *L. chrysopygus*, com o intuito de compreender aspectos sócio-reprodutivos e demográficos da espécie e de avaliar a viabilidade populacional, e, assim, gerar informações relevantes à sua conservação. Para alcançar esta meta, os seguintes objetivos específicos de trabalho foram estabelecidos:

2.1. Caracterizar a diversidade e estrutura genética de distintas populações do mico-leão-preto, provenientes do Alto e do Pontal do Paranapanema, através de análises de *loci* de microssatélites e da região Dloop do DNA mitocondrial;

2.2. Identificar padrões demográficos populacionais relacionados a eventos históricos que expliquem o padrão de diversificação observado nas populações contemporâneas;

2.3. Realizar simulações para o futuro, visando prever a viabilidade de populações remanescentes, considerando a retenção da diversidade genética nos próximos 100 anos.

2.4. Estabelecer as relações de parentesco dentro dos grupos familiares e caracterizar a estrutura matrilinear, combinando dados mitocondriais e de microssatélites para inferir sobre aspectos relacionados ao sistema sócio-reprodutivo da espécie;

Ao atingir estes objetivos, tentamos responder às seguintes hipóteses de trabalho:

I. As populações remanescentes de *L. chrysopygus* evidenciam sinais de diferenciação genética entre as regiões do Alto e do Pontal do Paranapanema (SP);

II. A espécie *L. chrysopygus* apresenta um sistema sócio-reprodutivo diversificado, no qual podem ocorrer a poliginia e/ou poliandria;

III. A diversidade genética de populações que ocupam fragmentos maiores tende a ser maior que a de populações restritas a fragmentos menores;

IV. As populações remanescentes de *L. chrysopygus* com tamanhos reduzidos possuem capacidade de retenção de diversidade genética que assegure sua viabilidade nos próximos 100 anos;

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Requisitos éticos e licenças para pesquisa**

As coletas das amostras biológicas de *L. chrysopygus* foram realizadas seguindo as normas e requerimentos éticos e legais estabelecidas pelo SISBIO (ICMBio, MMA, Governo Federal, Brasil), autorizações números 36961-1 e 34862-2; e pelo Comitê de Ética no Uso e Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, números 9805200815 e 7058110316 e pela Sociedade Americana de Primatologistas (ASP) para o tratamento ético de primatas não-humanos. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), sob número A411359.

#### **3.2. Amostragem biológica e extração de DNA**

Foram coletadas amostras biológicas de 94 animais (56 machos, 32 fêmeas e seis de sexo indefinido) pertencentes a 14 grupos provenientes de sete fragmentos, sendo três deles localizados no Pontal do Paranapanema e quatro no Alto Paranapanema (Figura 2; Tabela 1). Deste total, cinco grupos são de fragmentos localizados no Pontal do Paranapanema, sendo dois deles provenientes da Fazenda Santa Maria (SM); dois da Estação Ecológica Mico-Leão-Preto/Ponte Branca (PB); e um do Parque Estadual do Morro do Diabo (MD), que abriga a maior população de MLP, atualmente estimada (N=1200, PARANHOS, 2006). Os outros nove grupos são provenientes de fragmentos localizados na região do Alto Paranapanema, sendo que três grupos são de Guareí (Gu); dois da Floresta Nacional de Capão Bonito (CB); três de Buri (Bu); e um de Angatuba (An) (Figura 2, Tabela 1). Além dos indivíduos de vida-livre, sete animais pertencentes a um grupo familiar mantido sob cuidado humano na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, SP) foram analisados para validação dos *loci* de microssatélite e para realização dos testes de paternidade (Tabela 2).

**Figura 2.** Mapa de um recorte do estado de São Paulo, indicando os fragmentos em que foram realizadas coletas para as amostras de *Leontopithecus chrysopygus* analisadas neste estudo (A), com ampliação para as regiões do Pontal Paranapanema (B) e Alto Paranapanema (C). O losango indica as áreas localizadas no Pontal do Paranapanema e o círculo indica as áreas localizadas no Alto Paranapanema.



**Tabela 1.** Dados das amostras de *Leontopithecus chrysopygus* estudadas no presente estudo, indicando o local de procedência (Fragmento), o código de identificação da amostra (ID), o grupo social em que os animais foram encontrados, o sexo, a faixa etária (Idade), o tipo de amostra coletada e informações adicionais sobre o fragmento, como área em hectares, e tamanho populacional estimado.

Fragmento	ID	Grupo	Sexo	Idade	Amostra
<b>Pontal do Paranapanema</b>					
<b>Fazenda Santa Maria (SM)</b> Presidente Epitácio, SP – Pontal do Paranapanema Fragmento de floresta, medianamente alterado, com efeito de borda, com presença de estrada.  Área: 515 ha População Estimada: 18 indivíduos	SM1_08	1 (SM_01)	Fêmea	Adulto	Pelo
	SM1_09	1 (SM_01)	Macho	Adulto	Pelo
	SM2_01	2 (SM_02)	Macho	Adulto	Sangue
	SM2_02	2 (SM_02)	Fêmea	Adulto	Sangue
	SM2_03	2 (SM_02)	Fêmea	Adulto	Sangue
	SM2_04	2 (SM_02)	Macho	Filhote	Pelo
	SM2_05	2 (SM_02)	Fêmea	Adulto	Sangue
	SM2_06	2 (SM_02)	Fêmea	Adulto	Pelo
	SM2_07	2 (SM_02)	Macho	Adulto	Sangue
	SM2_10	2 (SM_02)			Sangue
<b>Parque Estadual Morro do Diabo (MD)</b> Teodoro Sampaio, SP – Pontal do Paranapanema  Ambiente de floresta contínua, pouco alterado.  Área: 35.000 ha População Estimada: 1200 indivíduos	MD1_01	3 (MD_01)	Macho	Adulto	Pelo
	MD1_02	3 (MD_01)	Macho	Adulto	Pelo
	MD1_03	3 (MD_01)	Macho	Adulto	Pelo
	MD1_04	3 (MD_01)	Fêmea	Adulto	Sangue
	MD_A	3 (MD_01)	Macho	Adulto	Fezes
	MD_B	3 (MD_01)			Fezes
	MD_C	3 (MD_01)			Fezes
	MD_D	3 (MD_01)			Fezes
	MD1_05	3 (MD_01)	Fêmea	Adulto	Sangue
	MD1_06	3 (MD_01)	Macho	Adulto	Sangue
	MD1_07	3 (MD_01)	Macho	Adulto	Sangue
	MD1_08	3 (MD_01)	Macho	Adulto	Sangue
MD1_09	3 (MD_01)	Fêmea	Juvenil	Pelo	
MD1_10	3 (MD_01)	Macho	Juvenil	Pelo	
MD1_11	3 (MD_01)	Fêmea	Adulto	Pelo	
<b>Estação Ecológica MLP (EEMLP)/Ponte Branca (PB)</b>  Euclides da Cunha Paulista, SP – Pontal do Paranapanema  Ambiente de floresta contínua, pouco alterado, e sem estradas  Área: 1.303 ha População Estimada: 46 indivíduos	PB1_01	4 (PB_01)	Macho	Adulto	Pelo
	PB1_02	4 (PB_01)	Fêmea	Adulto	Pelo
	PB1_03	4 (PB_01)	Fêmea	Adulto	Pelo
	PB1_04	4 (PB_01)	Fêmea	Juvenil	Sangue
	PB1_05	4 (PB_01)	Fêmea	Juvenil	Sangue
	PB2_06	4 (PB_01)	Macho	Adulto	Sangue
<b>Alto Paranapanema</b>					
<b>Floresta Nacional de Capão Bonito (CB)</b> Buri, SP – Alto Paranapanema  Fragmento alterado, ocupado principalmente por plantações de pinheiros e araucárias, com presença de estradas  Área: 4.344 ha População Estimada: 35 indivíduos	CB1_01	5 (CB_01)	Macho	Adulto	Sangue
	CB1_02	5 (CB_01)	Macho	Adulto	Sangue
	CB1_03	5 (CB_01)	Macho	Adulto	Sangue
	CB1_04	5 (CB_01)	Macho	Filhote	Pelo
	CB1_05	5 (CB_01)	Fêmea	Filhote	Pelo
	CB2_06	6 (CB_02)	Fêmea	Adulto	Sangue
	CB2_07	6 (CB_02)	Fêmea	Adulto	Sangue
	CB2_08	6 (CB_02)	Macho	Adulto	Sangue
	CB2_09	6 (CB_02)	Macho	Adulto	Sangue
	CB2_10	6 (CB_02)	Macho	Adulto	Sangue
<b>Fragmento Guareí (Gu)</b> , conectado à Estação Ecológica de Angatuba	G1_01	-	Macho	Adulto	Pelo
	G_03	7 (Gu_01)	Fêmea	Adulto	Pelo
	G_04	7 (Gu_01)	Fêmea	Adulto	Pelo
	G_05	7 (Gu_01)	Macho	Adulto	Pelo

Guareí, SP – Alto Paranapanema	G_06	7 (Gu_01)	Macho	Filhote	Pelo
Grupo 3: Fragmento alterado, com presença de estradas e gado.	G_07	7 (Gu_01)	Macho	Adulto	Sangue
	G_08	7 (Gu_01)	Fêmea	Juvenil	Pelo
	G_10	7 (Gu_01)		Filhote	Fezes
	G_17	7 (Gu_01)	Macho	Juvenil	Sangue
Grupos 4 e 5: Fragmento preservado, sem presenças de estradas.	G_18	7 (Gu_01)	Fêmea	Adulto	Sangue
	G_19	7 (Gu_01)	Macho	Adulto	Sangue
<b>Área:</b> 100 ha	G_09	8 (Gu_02)	Macho	Adulto	Pelo
<b>População Estimada:</b> 28 indivíduos	G_20	8 (Gu_02)	Macho	Adulto	Sangue
	G_21	8 (Gu_02)	Macho	Filhote	Sangue
	G_22	8 (Gu_02)	Fêmea	Adulto	Sangue
	G_11	9 (Gu_03)	Macho	Filhote	Sangue
	G_12	9 (Gu_03)	Macho	Filhote	Sangue
	G_13	9 (Gu_03)	Macho	Adulto	Sangue
	G_14	9 (Gu_03)	Macho	Adulto	Sangue
	G_15	9 (Gu_03)	Fêmea	Adulto	Sangue
	G_16	9 (Gu_03)	Fêmea	Filhote	Sangue
	BU1_01	-			Pelo
	BGM_01	10 (BGM)	Macho	Juvenil	Sangue
	BGM_02	10 (BGM)	Macho	Adulto	Sangue
	BGM_03	10 (BGM)	Macho	Adulto	Sangue
	BGM_04	10 (BGM)	Macho	Juvenil	Pelo
	BGM_05	10 (BGM)	Fêmea	Adulto	Sangue
	BGM_06	10 (BGM)	Macho	Juvenil	Sangue
	BGM_07	10 (BGM)	Macho	Adulto	Sangue
	BGM_08	10 (BGM)	Fêmea	Filhote	Sangue
<b>Buri – Fazenda Garibaldi (Bu)</b>	BGC_01	-	Macho	Adulto	Sangue
	BGT_01	11 (BGT)	Macho	Adulto	Sangue
Buri, SP – Alto Paranapanema	BT_01	11 (BGT)	Macho	Adulto	Sangue
	BT_02	11 (BGT)	Fêmea	Adulto	Sangue
Mata ciliar as margens do rio Apiaí-Guaçu	BT_03	11 (BGT)	Fêmea	Juvenil	Sangue
	BT_04	11 (BGT)	Macho	Juvenil	Sangue
<b>Área:</b> 85 ha	BT_05	11 (BGT)	Fêmea	Adulto	Sangue
<b>População Estimada:</b> 25 a 30 indivíduos	BT_06	11 (BGT)	Macho	Adulto	Sangue
	BT_07	11 (BGT)	Macho	Adulto	Sangue
	BGE_01	12 (BGE)	Macho	Adulto	Sangue
	BGE_02	12 (BGE)	Macho	Adulto	Sangue
	BGE_03	12 (BGE)	Fêmea	Adulto	Sangue
	BGE_04	12 (BGE)	Fêmea	Adulto	Sangue
	BGE_05	12 (BGE)	Macho	Filhote	Sangue
	BG_013	13 (BG_04)	Macho	Adulto	Sangue
	BG_014	13 (BG_04)	Macho	Adulto	Sangue
	BG_015	13 (BG_04)	Fêmea	Adulto	Sangue
	ASF_01	14 (ASF)	Macho	Juvenil	Pelo
<b>Angatuba - Sagrada Família (An)</b>	ASF_02	14 (ASF)	Macho	Adulto	Sangue
Angatuba, SP - Alto Paranapanema	ASF_03	14 (ASF)	Macho	Adulto	Sangue
Mata ciliar as margens do rio Guareí.	ASF_04	14 (ASF)	Fêmea	Adulto	Sangue
<b>Área:</b> 85 ha	ASF_05	14 (ASF)	Macho	Juvenil	Sangue
<b>População Estimada:</b> 15 indivíduos	ASF_06	14 (ASF)	Macho	Adulto	Sangue

Para cada indivíduo, foi coletado aproximadamente 0,2 centímetro cúbico (200 µL), de sangue, utilizando *Vacutainer* contendo anticoagulante EDTA (3.6 mg). As amostras foram armazenadas à -20 °C até o momento da extração de DNA. Para a amostragem de sangue os indivíduos foram anestesiados, utilizando equipamento de anestesia inalatória, calibrado com Isoflurano (2–5%) e Oxigênio (2 L/min). Todos os procedimentos para coleta de sangue foram

realizados por um veterinário que liberou os animais em seus locais de procedência, após cessado por completo o efeito da anestesia. Na impossibilidade de coleta de sangue, foram coletadas amostras de pelo, a partir da retirada manual de alguns tufo de pelos contendo bulbo piloso. Os pelos foram acondicionados em envelopes plásticos com sílica gel e mantidos em temperatura ambiente até o momento da extração de DNA. Para alguns animais que foram avistados em vida-livre, mas que não foram capturados, amostras de fezes frescas foram coletadas e acondicionadas em álcool 70%, sendo posteriormente mantidas à -20°C.

O DNA das amostras de sangue e de pelo foi extraído de acordo com o protocolo fenol-clorofórmio proposto por Sambrook *et al* (1989). A extração de DNA das amostras de fezes foi feita utilizando o *kit QIAGEN Fast DNA Stool Mini* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A integridade e a quantificação do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, Chicago, EUA).

**Tabela 2.** Informações dos animais de cativeiro, pertencentes a um grupo familiar mantido sob cuidado humano na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, SP) utilizados para validar as análises de parentesco, indicando a identificação do animal, o sexo, a data de nascimento, o local de nascimento e o pai e a mãe.

ID	Sexo	Data de nascimento	Local de nascimento	Pai	Mãe
Kinha (430)	Fêmea	-	Vida-Livre (Buri)	-	-
Calixto (412)	Macho	17/09/2003	CPRJ	301	293
467	Fêmea	17/09/2010	FPZSP	412	430
473	Macho	31/10/2012	FPZSP	412	430
510	Macho	09/03/2015	FPZSP	412	430
511	Macho	30/08/2015	FPZSP	412	430
512	Macho	31/08/2015	FPZSP	412	430

### 3.3. Amplificação e genotipagem de microssatélites

Foi utilizado um painel de 12 *loci* de microssatélites, sendo oito deles descritos especificamente para *L. chrysopygus* (PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2005) e quatro descritos para *Leontopithecus chrysomelas* (GALBUSERA; GILLEMOT, 2008) (Tabela 3). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo 1x de GoTaq® (Promega, Madison, EUA), 1x Buffer, 0,46 pmol dos *primers reverse* e M13, 0,12 pmol do *primer forward*, 0,30 mg/mL de BSA, 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 uL a 50 ng de DNA, 0,25 mM de cada dNTPs e 3,85 µL de água milli-Q, seguindo os protocolos propostos Schuelke (2000) e Ayala-Burbano *et al.* (2017; 2020).

As PCRs foram realizadas nas seguintes condições: uma etapa de desnaturação à 94° por 5', seguida de 30 ciclos de 30" à 94°C, um gradiente de alinhamento específico para cada loco (ver Tabela 3), durante 45" e mais 8 ciclos adicionais, distribuídos da seguinte maneira: 30" à 94°C, 45" à 53°C (temperatura de alinhamento da cauda M13 marcada), 45" à 72°C, e finalmente uma etapa de extensão de final à 72°C por 10'. Os produtos da amplificação foram visualizados através de eletroforese, adicionando-se 2 µL de cada amostra à 1 µL de azul de bromofenol e 1 µL de GelRed (Uniscience, Miami, EUA).

**Tabela 3.** Informações sobre os *loci* microssatélites utilizados nesse estudo, indicando à espécie para qual foram descritos, o nome do *locus*, às sequências *forward* e *reverse* dos *primers*, a temperatura de anelamento (TA) e fluorescência utilizadas nas reações de amplificação.

Espécie	<i>Locus</i>	Sequências do <i>Primers</i> (5'-3')	TA (°C)	Fluorescência
<i>L. chrysopygus</i>	Leon2	F: CTGCTTCTTGTCCACTTCTTCTC R: GTTTGGGTGGTTGCCAAG	55	FAM
	Leon3c20	F: CTGTATGTGATCGCTTTTACCTG R: AAGGCAATCTAACTAATCAACACTC	60	NED
	Leon11c72	F: AGGATTACAGGTGCCAC R: TTGCATATTGTGTTCAACTTC	60	VIC
	Leon15c85	F: CTGATCCTTGAAGCAGCATTG R: GGTTAAAGGGGTTTCGTTCTGTG	60	FAM
	Leon21c75	F: CAGTTGAGGGAACAGGAATTA R: CACTGCACTGACAGAGCAAG	60	FAM
	Leon30c73	F: GGACCTGATTGAAGCAGTC R: TTCCCTGAGAATCTAATGGAG	60	NED
	Leon31c97	F: TGGTCCAGAGAAATGATGTC R: GTAATTCCTTGGATTTATGCC	58	PET
	Leon35c42	F: GTGGAAAGGTTTCAGAATATC R: TGCAGTTGTCCACACTTTA	60	FAM
<i>L. chrysomelus</i>	Lchu1	F: GCTCAGGTGTTATTTATGTCCAAA R: GTTTCTTGCAACTATCTTGCATGTTCTGC	58	FAM
	Lchu6	F: GCCTTAATTAGCACCAGAACC R: GTTTCTTACCACTCCAAGCCTTCAGTA	55	PET
	Lchu7	F: TCTCATTTCTTCTCATGGACTC R: GTTTCTTCTTGACTCACAGCATGACCT	55	FAM
	Lchu8	F: CACGGCAATGTGGGAATAA R: TTTCTTTTCAGTAGTTGGGACTGGGATAA	58	VIC

A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de 2% de agarose, submetido a uma voltagem de 100W por 30 minutos. As amostras que apresentarem padrão de amplificação satisfatório foram genotipadas em sequenciador 3730XL (Applied Biosystems, Waltham, EUA). O estabelecimento de genótipos e alelos foi realizado no *software* Geneious Primer 2022.1 (<https://www.geneious.com>). Após isso, a ocorrência de alelos nulos, alelos *dropout*, e *stuttering* foi avaliada através do programa Micro-Checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

### 3.4. Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial

Fragmentos da região controle do DNA mitocondrial (Dloop) foram amplificados através da utilização dos *primers* específicos LCrysopF (CCATCAACACCCAAAGCTGA) e LCrysopR (CGGAGGTTGGTAGATTAAGAGACC), desenhados a partir do genoma mitocondrial completo do *L. chrysopygus*, caracterizado por Freitas *et al.* (2018), para amplificar cerca de 400 pares de base de uma região previamente identificada como polimorficamente informativa (MODENA, 2021). Tais *primers* foram delineados, visando-se a amplificação de fragmentos menores em amostras de DNA de baixa qualidade (em geral, obtidas de fezes e de pelo). O protocolo de PCR para volume final de 12,5 µL seguiu as seguintes concentrações: 1X do buffer 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sup>2</sup> (Invitrogen, Waltham, EUA), 0,8µmol de cada *primers*, 1 unidade de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen, Waltham, EUA), 1-3 µL DNA molde e 1,85-3,85 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura. As condições da PCR incluíram um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 6 min, seguido por 35 ciclos de 94°C a 1 min, 60°C a 45 s e 72°C a 45s.

Após a amplificação, a visualização dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese utilizando gel de agarose 1% corados com GelRed (Uniscience, Miami, EUA) e Azul de Bromofenol. Posteriormente, foi realizada a purificação seguindo o protocolo de Lis (1980), com algumas modificações, visando-se eliminar os resíduos de baixo peso molecular dos produtos de PCR, como sais, *primers* e dNTPs. Nesse processo, em um tubo de 2 mL, foi adicionada às amostras igual volume de uma solução de PEG/Glicogênio azul. Essa mistura foi homogeneizada e incubada em banho seco a 37°C por vinte minutos. Após a incubação, a solução foi centrifugada durante 15 minutos a 13000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e ao pellet resultante foram adicionados 150 µL de etanol 80% gelado. Novamente, a amostra foi centrifugada por dez minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Então, foram adicionados 150 µL de etanol 80% gelado e a amostra foi centrifugada por dez minutos

a 13000 rpm, sendo o sobrenadante descartado mais uma vez. Ao final, os tubos permaneceram secando a 37°C por cerca de 40 minutos. Após a secagem, o pellet foi ressuspendido com 10 µL de água miliQ e os produtos purificados foram submetidos a sequenciamento em sequenciador 3730XL (Applied Biosystems, Waltham, EUA).

A edição e alinhamento das sequências da região Dloop foram realizados no programa Geneious Primer 2022.1 (<https://www.geneious.com>), utilizando o algoritmo ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), visando-se a identificação dos haplótipos de cada indivíduo.

### 3.5. Análises de estrutura e diversidade genética usando dados de microssatélites

A estrutura populacional, utilizando os dados de microssatélites, foi verificada através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA), implementada no programa GenAlEx v6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), e de inferência bayesiana, realizada no programa Structure v2.1 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Foram realizadas dez corridas para valores de K variando de 1 a 8, usando o modelo *admixture* com um MCMC de 1.000.000 de cadeias e um *burn-in* de 100.000 interações. O número de grupos genéticos (K) foi determinado com base no Delta K, conforme descrito em Evanno *et al.* (2005), e com base no LnP (K), conforme descrito por Pritchard *et al.* (2000), utilizando o programa Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012). As representações gráficas para estas análises foram obtidas pelo uso do programa PopHelper (FRANCIS, 2017). Foram calculados também os valores de  $F_{ST}$  par a par entre os grupos analisados, utilizando o software FSTAT v2.9.4 (GOUDET, 1995). O teste de Mantel, para verificar a correlação entre distância genética ( $F_{ST}$ ) e distância geográfica entre os fragmentos, foi realizado no *software* Arlequin v3.5 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005), utilizando 10.000 permutações.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos *loci* foi estimado no programa Cervus v3.0.3 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). O número alelos ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), os valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) foram estimados utilizando o programa GenAlex v6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). A determinação dos valores de riqueza alélica ( $R_a$ ) e dos coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi feita no FSTAT v2.9.4 (GOUDET, 1995) e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os pares de *loci* no Genepop v4.7 (ROUSSET, 2008). As estimativas para desvios de HWE, incluindo excesso e deficiência de heterozigotos, foram obtidas pelo algoritmo Cadeia de Makov-Monte Carlo (MCMC) no programa Genepop v4.7 (ROUSSET, 2008).

Os valores de  $p$  para diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram determinados com base no teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn, após verificação da normalidade e homogeneidade da amostragem, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, no R 4.2.1 (R CORE TEAM, 2018).

Foi avaliado se os parâmetros de diversidade genética ( $R_a$ ,  $H_o$ ,  $H_e$  e  $F_{IS}$ ) e coeficientes de parentesco (*Wang, Ritland, e Queller & Goodnight*), calculados através do pacote Related (PEW *et al.*, 2015), implementado no programa R v3.5.0 (R CORE TEAM, 2018), estão correlacionados com as áreas dos fragmentos. A correlação entre a variável explicativa (tamanho do fragmento) e as variáveis de resposta (parâmetros de diversidade genética e coeficiente de parentesco) foram testadas usando correlação de *Pearson* (para dados seguindo uma distribuição gaussiana), ou a correlação de *Spearman* (para dados que não seguem a distribuição gaussiana). Estas análises foram realizadas em R v3.5.0 (R CORE TEAM, 2018), utilizando o pacote Related (PEW *et al.*, 2015).

Para avaliar os efeitos recentes e drásticos na mudança do tamanho populacional foram realizados dois testes: o índice de Garza-Williamson (M-ratio) (GARZA; WILLIAMSON, 2001), calculado no Arlequin v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010); e o teste unicaudal de postos sinalizados de Wilcoxon, de acordo com três modelos mutacionais (CORNUET; LUIKART, 1996), calculado no BOTTLENECK v1.2.02 (PIRY *et al.*, 1999). Foram utilizados como parâmetros 95% de SMM em TPM e 12% de variância para TPM, considerando 10.000 réplicas (PIRY *et al.*, 1999). Estes testes foram conduzidos considerando cada fragmento como sendo uma população única.

O número de migrantes por geração ( $N_m$ ) foi calculado utilizando o método de alelos privados (SLATKIN, 1985) no *software* Genepop v4.6 (ROUSSET, 2008) e a taxa de migrantes foi calculada entre os fragmentos par a par e entre todos os fragmentos.

### **3.6. Análises de predição de perda de diversidade genética**

Para avaliar se o tamanho das populações é suficiente para reter variação genética ao longo dos próximos 100 anos, implementamos uma análise preditiva usando o *software* BOTTLESIM v2.6 (KUO; JANZEN, 2003), considerando 1.000 interações e os seguintes parâmetros: tempo de vida = 16 anos; idade na maturidade = 2 anos; gerações completamente sobrepostas; acasalamento aleatório; reprodução dioica; tamanho populacional constante (FORERO-SÁNCHEZ, 2020) e razão sexual de 1,5 machos por fêmea, baseada em dados disponíveis para outra espécie de mico-leão (DIETZ; BAKER, 1993) e nos achados do presente

trabalho. Esse programa simula parâmetros genéticos (número observado de alelos, número efetivo de alelos, heterozigosidade observada e esperada) em diferentes cenários de redução populacional, preditos para retenção de 100, 75, 50 e 25% do tamanho populacional atual. Utilizamos como premissa de viabilidade populacional a capacidade de retenção de 90% da diversidade genética estimada (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

### 3.7. Análises de estrutura e diversidade genética usando dados de Dloop

A estruturação populacional com os dados mitocondriais foi investigada através de uma análise de inferência bayesiana de delimitação de grupos, realizada no *software* BAPS (CORANDER *et al.*, 2008). Foram calculados também os valores de  $F_{ST}$  par a par entre os grupos analisados, usando o *software* Arlequin v3.5 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

A caracterização dos índices de diversidade genética foi realizada para cada fragmento através da determinação do número de sítios polimórficos (S), do número de haplótipos (h), da diversidade haplotípica (Hd) e da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), usando o programa DNAsp v5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). As redes de haplótipos foram construídas no programa PopArt (LEIGH; BRYANT, 2015), com base no método de Median-Joining (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999).

A história demográfica das populações foi investigada pelos testes de neutralidade D de Tajima (1989) e FS de Fu (1997), implementados no programa Arlequin v3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), para avaliar os cenários de expansão populacional ou de estabilidade ao longo do tempo. A significância dos testes foi determinada com base em 10.000 simulações coalescentes. Além disso, reconstruímos a história demográfica inferida, através da análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP) (DRUMMOND, *et al.*, 2005), utilizando o *software* BEAST v2.5 (BOUCKAERT *et al.*, 2019).

A análise BSP assume uma única população panmítica e usa padrões inferidos da coalescência para ajustar um modelo demográfico a um conjunto de dados sequenciais (DRUMMOND *et al.*, 2005). Essas análises foram realizadas por meio de três cadeias de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), com 30.000.000 gerações cada, amostradas a cada 30.000 cadeias. Os arquivos foram combinados no *software* LogCombiner v1.8.2 (RAMBAUT, A; DRUMMOND, 2015). A identificação do melhor modelo foi realizada através do programa JModelTest v2.1.4 (POSADA, 2008) por meio do *Bayesian Information Criterion* (BIC), obtendo o modelo HKY. A convergência das cadeias e os valores do tamanho efetivo da

amostragem (ESS - *Effective Sample Size*) para os parâmetros estimados foram checados no Tracer v1.7 (RAMBAUT *et al.*, 2018), considerando valores de tamanho efetivo da amostragem (ESS) de 200 ou mais para todos os parâmetros. A taxa mutacional utilizada foi de  $1,64 \times 10^{-7}$  substituições/nucleotídeos/ano, considerando o valor estimado para região controle do DNA mitocondrial em humanos (SOARES *et al.*, 2009), utilizado em análises com calitriquídeos (ACEVEDO-GARCÉS *et al.*, 2021) e outros primatas (WANG *et al.*, 2019).

Para testar a ocorrência de expansão populacional, uma análise de *Mismatch Distribution*, MD (ROGERS; HARPENDING, 1992), foi realizada no programa DNAsp v6.10.04 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A concordância e a significância entre os resultados esperados e observados sob o modelo de expansão repentina foi testada por meio de estimativas da SSD (*Sum of Squared Differences*) e do índice de Raggedness (r) (HARPENDING, 1994), determinadas com o programa Arlequin v3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Valores significativos para esses dois parâmetros rejeitam a hipótese de expansão populacional.

### 3.8. Análises de parentesco

As relações de parentesco foram estimadas no *software* Cervus v3.0.3 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007), utilizando os dados de microssatélites, sendo que o candidato parental mais provável foi determinado pelo valor estatístico LOD, obtido a partir do logaritmo natural da razão da verossimilhança, o qual realiza uma análise de probabilidade para testar a hipótese nula H1, na qual o pai candidato é o pai verdadeiro; e a hipótese alternativa H2, na qual o pai candidato não é o pai verdadeiro (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007; MARSHALL *et al.*, 1998). Foi considerada uma simulação de 100.000 *offspring*, com uma taxa de erro de 0,01, e nível de confiança de 90% relaxado e 95% estrito. Todos os machos e fêmeas adultos de cada grupo foram incluídos como prováveis mães e pais candidatos, respectivamente.

Aos dados de parentesco estabelecidos com os dados de microssatélites, adicionamos as informações dos haplótipos mitocondriais para avaliar a real possibilidade da relação inferida, considerando que: (i) qualquer filho ou filha estimado deve possuir o haplótipo da provável mãe indicada; (ii) irmãos completos devem possuir o mesmo haplótipo; (iii) irmãos de mesma mãe devem possuir o mesmo haplótipo; e (iv) meios-irmãos com haplótipos distintos devem ser filhos de mães distintas com haplótipos correspondentes.

### 3.9. Teste de escolha de parceiros baseada em dados de parentesco

Os valores de parentesco estimados entre os casais atribuídos pela análise de parentesco foram comparados aleatoriamente usando o estimador de parentesco pareado, implementado no *software* STORM (FRASIER, 2008). Este programa calcula o parentesco dos casais de acordo com o descrito em Li *et al* (1993) e em seguida calcula o parentesco esperado de pares, assumindo que o acasalamento é aleatório em relação ao parentesco; isso é feito gerando pares de acasalamento, utilizando 1000 interações e calculando a média dos valores de parentesco para cada interação. A distribuição obtida é então comparada com o parentesco médio de pares de acasalamento atribuídos.

## 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos nessa dissertação estão apresentados e discutidos em dois capítulos organizados como descritos a seguir:

Capítulo I: “Diversidade e estruturação genética de populações de vida livre do ameaçado mico-leão-preto”. Este capítulo tem como foco caracterizar a diversidade e estrutura genética da espécie e inferir sobre a viabilidade populacional.

Capítulo II: “Estrutura sócio-reprodutiva do mico-leão-preto”. Este capítulo tem como foco investigar o modo de reprodução da espécie, identificando os sistemas de acasalamento encontrados nos grupos analisados.



## Capítulo I

### **Diversidade e estruturação genética de populações de vida livre do ameaçado mico-leão-preto**

## Capítulo I: Diversidade e estruturação genética de populações de vida livre do ameaçado mico-leão-preto

### RESUMO

Acessar a diversidade genética e seu padrão de distribuição em populações remanescentes de espécies submetidas a perda e fragmentação de habitat é importante para inferir sobre o grau de estruturação e as taxas de endogamia e fluxo gênico, e potencial de viabilidade ao longo do tempo. Essas informações são de extrema importância para auxiliar o delineamento de programas de manejo e conservação das espécies, especialmente as ameaçadas. Neste trabalho, nós acessamos a diversidade e estrutura genética do mico-leão-preto (MLP), *Leontopithecus chrysopygus*, uma espécie de primata endêmico da Mata Atlântica do estado de São Paulo, que vem sofrendo os impactos negativos da perda e fragmentação do habitat, sendo atualmente classificada como ameaçada de extinção. Nós avaliamos 14 grupos de MLPs provenientes de sete fragmentos localizados em duas áreas de ocorrência atual da espécie: Pontal do Paranapanema e Alto Paranapanema. Através de análises de microssatélites e da região Dloop do DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>), nós verificamos a existência de um possível efeito da fragmentação do habitat no isolamento e diminuição e/ou interrupção do fluxo gênico entre populações, uma vez que o padrão de estruturação populacional (K) encontrado com ambos os marcadores evidenciou um valor de K maior para os microssatélites (K=7) do que para o Dloop (K=4). Os níveis de diversidade genética variaram entre baixo e médio para ambos os marcadores, sendo que para o Dloop este valor variou de 0,000 à 0,51 e para os microssatélites de 0,088 à 0,719. Foi observada uma correlação positiva e significativa entre a heterozigosidade observada e o tamanho do fragmento; e uma correlação negativa e significativa entre o coeficiente de endocruzamento e o tamanho dos fragmentos. As análises de demografia histórica não evidenciaram expansão populacional, sugerindo redução demográfica ocorrida há cerca de cinco mil anos, período coincidente com alterações climáticas e paisagísticas ocorridas no Holoceno. As análises preditivas demonstraram que apenas a população de Morro do Diabo (localizada no Pontal do Paranapanema) conseguirá reter 90% da diversidade genética atual ao longo dos próximos 100 anos. Os achados deste estudo contribuem com informações valiosas sobre a diversidade e estrutura genética da espécie nos fragmentos analisados e se mostram relevantes para definir unidades populacionais de manejo e áreas prioritárias de conservação que visem preservar o potencial evolutivo da espécie.

**Palavras-chave:** mico-leão-preto; diversidade genética; fragmentação do habitat; fluxo gênico; conservação.

## I.1. INTRODUÇÃO

A avaliação da diversidade e estruturação genética de populações de espécies ameaçadas é crucial para orientar planos de ação que visem sua conservação. Dados genéticos permitem identificar populações mais diferenciadas, com taxas de endogamia elevadas e níveis de diversidade mais reduzidos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Estas informações também possibilitam avaliar a viabilidade das populações e sua capacidade de persistência ao longo do tempo, considerando a manutenção da diversidade genética e, conseqüentemente, do potencial evolutivo da espécie, através de realização de simulação da retenção da diversidade genética ao longo dos anos (ACEVEDO-GARCÉS *et al.*, 2021). Tais dados podem ser úteis para indicar áreas prioritárias à conservação, por exemplo, para o reestabelecimento da conectividade entre fragmentos específicos através da criação de corredores reflorestados; e ainda auxiliar no desenvolvimento de estratégias que visem translocações, suplementações e/ou reintroduções em áreas de ocorrência histórica da espécie (FORERO-SÁNCHEZ, 2020; MORAES *et al.*, 2017; MILLS *et al.*, 2017; REZENDE, 2014). Devido a este potencial, abordagens genéticas têm sido recentemente utilizadas para auxiliar o manejo de espécies ameaçadas, tais como *Puma concolor* (SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017), *Bothrops insularis*, (SALLES-OLIVEIRA *et al.*, 2020), e primatas (MELO - CARRILLO; DUNN; CORTÉS - ORTIZ, 2020; MORAES *et al.*, 2017).

Os primatas consistem em um grupo taxonômico diverso que inclui espécies dependentes de florestas, as quais vêm sofrendo os impactos negativos dos altos índices de desmatamento, que promovem a perda e a fragmentação de seus habitats (ALMEIDA-ROCHA; PERES; OLIVEIRA, 2017), consideradas as principais ameaças à biodiversidade (HADDAD *et al.*, 2015). A perda e a fragmentação de habitats podem promover a redução a diversidade genética e diminuição ou interrupção do fluxo gênico, e assim aumentar a endogamia nas populações (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010). Populações isoladas com tamanhos reduzidos estão sujeitas ao efeito acentuado da deriva, que também favorece a perda de diversidade e aumento da estruturação genética (MORAES *et al.*, 2023). Estes fatores podem diminuir a viabilidade das populações, tornando-as mais suscetíveis a eventos estocásticos, podendo resultar em extinções populacionais locais e até mesmo de espécies, no caso de grupos endêmicos, com áreas de distribuição restritas e tamanhos populacionais reduzidos (ALLENDORF;

HOHENLOHE; LUIKART, 2010; FRANKHAM, 2010; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Este é o caso do mico-leão-preto (MLP), *Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823, uma espécie de primata neotropical (Callitrichidae, Platyrrhini) ameaçada, endêmica da Mata Atlântica do estado de São Paulo, que vem sofrendo as consequências negativas da perda e fragmentação de seu habitat (MEYER; PIE; PASSOS, 2014, REZENDE, *et al.*, 2020).

Devido, provavelmente, aos desmatamentos e avanços das áreas urbanas e agrícolas em seu habitat natural, o MLP foi considerado extinto por cerca de 65 anos. Felizmente, na década de 1970, alguns animais foram avistados no Parque Estadual do Morro do Diabo, localizado na região próxima ao município de Teodoro Sampaio, no Pontal de Paranapanema, tendo seu tamanho populacional estimado na época, em cerca de 200 animais (COIMBRA-FILHO, 1970; KLEIMAN; RYLANDS, 2008; REZENDE, 2014). Hoje, estima-se que existam cerca de 1600 animais em vida livre, com cerca de 1000 a 1200 habitando Morro do Diabo e o restante distribuído em fragmentos pequenos e/ou isolados ou com baixo grau de conectividade (REZENDE, *et al.*, 2020).

Neste estudo, nós analisamos MLPs provenientes de fragmentos com tamanhos e atributos ecológicos diferenciados a fim de avaliar a diversidade e estrutura genética das populações estudadas e inferir sobre processos demográficos históricos e/ou contemporâneos, eventualmente relacionados à diversificação de suas populações. Adicionalmente nós implementamos análises preditivas para avaliar a viabilidade populacional em termos de retenção da diversidade genética, nos próximos 100 anos. Nós hipotetizamos que devido ao contexto histórico de perda e fragmentação de habitat, as populações atuais do MLP apresentam baixa diversidade genética, forte estruturação genética, e altas taxas de endogamia. Nós também hipotetizamos que, neste cenário, a persistência da espécie em médio e longo termo está comprometida, devido aos tamanhos reduzidos de suas populações e à inviabilidade de retenção de níveis adequados da diversidade genética, considerando um *threshold* de 90% como indicativo para a manutenção da saúde genética de uma população e do potencial adaptativo da espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

## **I.2. MATERIAL E MÉTODOS**

A amostragem biológica e a metodologia empregada neste capítulo estão descritas nos itens 3.1 - 3.7 desta dissertação

### I.3. RESULTADOS

#### I.3.1. Genotipagem e sequenciamento

Ao todo foram analisados 94 MPLs (ver Tabela 1) pertencentes a 14 grupos de sete fragmentos, sendo que 85 amostras produziram padrões de amplificação satisfatórios e foram genotipadas com sucesso para, pelo menos, 70% dos *loci* analisados (oito *loci*). No total, foram produzidos dados de microssatélites para 26 amostras do Pontal do Paranapanema, sendo 11 provenientes do Morro do Diabo (MD), seis de Ponte Branca (PB) e nove de Santa Maria (SM); e 57 amostras do Alto Paranapanema, sendo seis de Angatuba (An), 10 de Capão Bonito (CB), 21 de Buri (Bu) e 20 de Guareí (Gu). Nove amostras (SM\_10; MD\_435; MD\_437; MD\_C; MD\_D; Bu\_01; BGM\_04; BGT\_01 e GC\_03) não atingiram o limiar de 70% dos *loci* genotipados e foram retiradas das análises. O loco Lchu01 se mostrou monomórfico em todos os fragmentos analisados e também foi retirado das análises, totalizando assim 11 *loci* analisados (Tabela 3). Não foram identificados alelos *dropout* ou *stuttering*, sendo apenas identificados alelos nulos para o excesso de homozigotos no loco Leon35 para os fragmentos Bu e Gu. O valor médio do conteúdo de informação polimórfica (PIC), para todas as amostras analisadas, foi de 0,525, demonstrando que esse conjunto de locos é altamente informativo para a espécie.

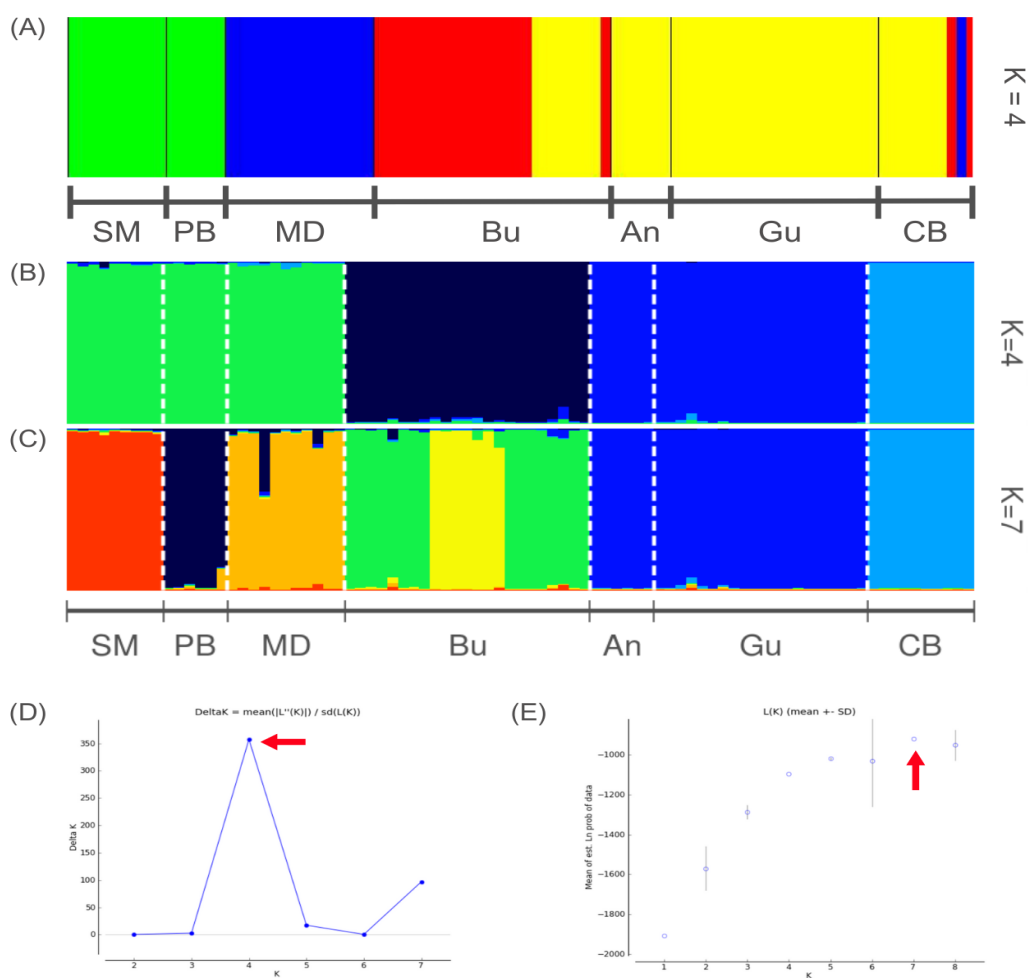
Para os dados de Dloop, foram sequenciadas 92 amostras, sendo 31 amostras provenientes do Pontal do Paranapanema (MD = 15, PB = 06 e SM = 10); e 61 amostras do Alto Paranapanema (An = 06; CB = 10; Bu = 24 e Gu = 21). Deste total, apenas duas amostras (Bu\_01 e BGM\_07) amplificadas não apresentaram qualidade adequada de sequenciamento para serem incluídas nas análises de diversidade e estruturação genética (ver Tabela 1).

#### I.3.2. Estruturação populacional

A análise bayesiana realizada no BAPS, utilizando os dados das sequências de Dloop, sem informação *a priori*, identificou a existência de quatro *clusters* genéticos (K=4, probabilidade posterior = 1,0; log (ml) = -185,5), conforme mostrado na Figura I.1A. Para os dados de microssatélite, a análise bayesiana de agrupamento indicou valores de K=4 e K=7, sendo que o método  $\Delta K$ , proposto por Evanno *et al.* (2005), identificou K=4 como valor mais provável (Figura I.1B); enquanto o método e LnP (K) de Pritchard

*et al.* (2000) evidenciou  $K=7$  como valor mais provável (Figura I.1C). Neste último cenário apenas os fragmentos de An e Gu foram agrupados. Ainda, de acordo com esse método, uma subestruturação foi observada no fragmento de Bu, separando um grupo familiar (BT) dos demais (BGM, BGE e BG\_04).

**Figura I.1.** Análise de *clusterização*, sem informação *a priori*, por Inferência Bayesiana realizada no BAPS (A), utilizando as sequências de Dloop demonstrando  $K=4$ ; e no Structure (B-C), utilizando microsatélites para sete populações remanescentes de *Leontopithecus chrysopygus* do Alto (MD: Parque Estadual do Morro do Diabo; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca) e do Pontal (An: Angatuba; Bu: Buri, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito) do Paranapanema. Os gráficos indicam a presença de  $K=4$  (B) de acordo com o método de Evanno *et al* (2005) (D) e  $K=7$  (C) de acordo com o método de Pritchard *et al* (2000) (E).



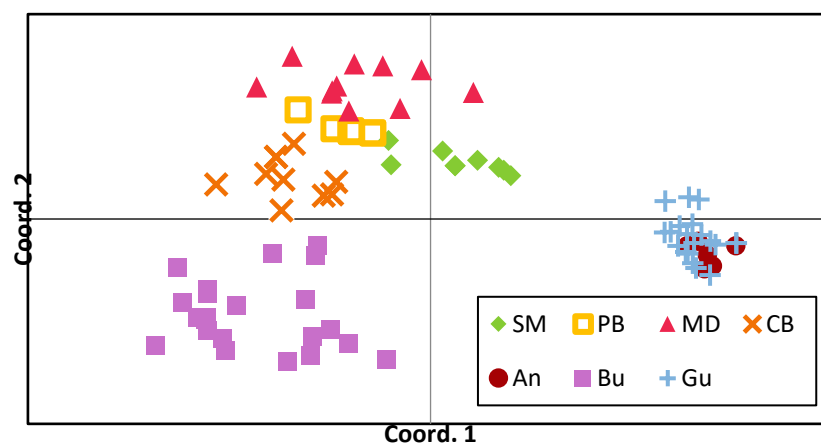
Para os dados Dloop, os valores de  $F_{ST}$  variaram de moderada diferenciação genética entre An e Gu (0,084) a alta diferenciação genética entre PB e Gu (0,798). Já para os dados de microsatélites, a comparação par a par dos valores de distância genética, calculada através do  $F_{ST}$  entre os fragmentos, variou de 0,00 (An e Gu) a 1,0 (PB e SM)

(Tabela I.1). O teste de Mantel entre os valores de  $F_{ST}$  calculados através dos microssatélites (Tabela I.1) e as distâncias geográficas dos fragmentos analisados não indicaram a existência de uma correlação significativa entre distância e isolamento ( $p = 0.083400$ ). A Análise de Coordenadas Principais (PCoA), utilizando os dados de microssatélites, indicou a existência de três grupos discretos, sendo o primeiro grupo formado entre os fragmentos do Pontal do Paranapanema (MD, PB e SM), o segundo formado pelo fragmento Bu e o terceiro, agrupando Gu e An. Nessa análise, o fragmento de CB está entre o primeiro e o segundo grupo (Figura I.2).

**Tabela I.1.** Valores de  $F_{ST}$  par a par, utilizando as sequências de Dloop (abaixo da diagonal) e microssatélites (acima da diagonal) para os sete fragmentos analisados. MD: Parque Estadual do Morro do Diabo; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca; An: Angatuba; Bu: Buri, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito. \* Valores significativos de  $p$  ( $p < 0,05$ ).

FST par a par	An	Bu	CB	Gu	MD	PB	SM
An		0,581*	0,613*	0,084	0,677*	0,768*	0,652*
Bu	0,692*		0,395*	0,627	0,469*	0,446*	0,520*
CB	0,137*	0,301*		0,672*	0,400*	0,378*	0,485*
Gu	0,000	0,692*	0,137*		0,711*	0,798*	0,520*
MD	0,979*	0,747*	0,63*	0,979*		0,315*	0,181*
PB	1,000*	0,635*	0,681*	1,000*	0,979*		0,542*
SM	1,000*	0,576*	0,642*	1,000*	0,976*	1,000*	

**Figura I.2.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA), evidenciando os agrupamentos obtidos com dados de microssatélites para as populações de *Leontopithecus chrysopygus* provenientes do Pontal do Paranapanema: Morro do Diabo (MD), Santa Maria (SM) e Ponte Branca (PB); e do Alto Paranapanema: Capão Bonito (CB), Angatuba (An), Guareí (Gu) e Buri (Bu).



### I.4.3. Diversidade genética

As análises de diversidade genética utilizando o marcador Dloop evidenciaram a existência de sete haplótipos e 19 sítios polimórficos nos fragmentos analisados. O número de haplótipos por fragmentos variou de 1 a 3, sendo que apenas Bu, CB e MD apresentaram mais de um haplótipo. Os fragmentos CB e Bu apresentaram, respectivamente, os maiores valores de diversidade haplotípica. Já os fragmentos de An, Gu, PB e SM não apresentaram diversidade, devido a presença de apenas um único haplótipo nestes locais (Tabela I.2).

**Tabela I.2.** Índices de diversidade genética, utilizando o marcador Dloop e os marcadores microssatélites, calculados para cada fragmentos analisados. (N) Número de indivíduos, (h) número de haplótipos, (S) número de sítios polimórficos, (Hd) diversidade haplotípica, ( $\pi$ ) diversidade nucleotídica, (Na) número de alelos, (Ne) número de alelos exclusivos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (Ra) riqueza alélica, ( $F_{IS}$ ) coeficiente de endogamia, ( $P_{DH}$ ) valores de p para déficit de heterozigotos do coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ , ( $P_{EH}$ ) valores de p para excesso de heterozigotos do coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ . An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito. \* p-valor < 0,00079 \*\*p-valor <0,0006.

	Alto Paranapanema				Pontal do Paranapanema		
	An	Bu	CB	Gu	MD	PB	SM
	<b>Dloop</b>						
<b>N</b>	6	24	10	21	15	6	10
<b>h</b>	1	3	3	1	2	1	1
<b>S</b>	0	13	17	0	1	0	0
<b>Hd</b>	0,000	0,489	0,511	0,000	0,343	0,000	0,000
$\pi$	0,000	0,016	0,018	0,000	0,001	0,000	0,000
	<b>Microssatélites</b>						
<b>N</b>	6	24	10	20	11	6	9
<b>Na</b>	1,273	2,727	2,182	1,818	2,182	1,727	1,636
<b>Ne</b>	1,181	1,914	1,935	1,402	1,832	1,461	1,520
<b>Ho</b>	0,088	0,462	0,791	0,166	0,491	0,379	0,439
<b>He</b>	0,107	0,437	0,475	0,173	0,379	0,241	0,272
<b>Ra</b>	1,273	2,380	2,109	1,585	2,138	1,680	1,596
<b><math>F_{IS}</math></b>	0,275	-0,033	-0,633	0,072	-0,243	-0,506	-0,570
<b><math>P_{DH}</math></b>	0,273	0,701	1,000	0,262	0,990	0,999	1,000
<b><math>P_{EH}</math></b>	0,874	0,300	0,0006*	0,829	0,010	0,004	0,0006*

As análises de diversidade, utilizando os marcadores microssatélites evidenciam que a heterozigosidade variou de alta ( $H_o = 0,791$ ;  $H_e = 0,475$ ) à baixa ( $H_o = 0,088$ ;  $H_e = 0,107$ ), sendo observados valores mais altos em CB ( $H_o = 0,791$ ;  $H_e = 0,475$ ) e MD ( $H_o = 0,491$ ;  $H_e = 0,379$ ) e mais baixos em An ( $H_o = 0,088$ ;  $H_e = 0,107$ ) e Gu ( $H_o = 0,166$ ;  $H_e = 0,176$ ) (Tabela I.2). Os valores de  $F_{IS}$  variaram de -0,663 (CB) a 0,275 (An),

tendo sido observados desvios significativos (\*) ( $p < 0,05$ ) (Tabela I.2). Os valores de riqueza alélica ( $R_a$ ) variaram entre 2,38 (Bu) e 1,27 (An), tendo sido identificados 14 alelos privados em quatro fragmentos (SM, MD, CB e Bu), sendo que Bu apresentou o maior número de alelos exclusivos (Tabelas I.2 e I.3). Comparações par a par utilizando o teste de Dunn indicaram que os valores de  $H_o$  do fragmento de CB foram significativamente diferentes dos valores de An ( $p = 0,0001$ ) e Gu ( $p = 0,0030$ ); os valores de  $H_e$  do fragmento de An foram significativamente diferentes dos valores de Bu ( $p = 0,0060$ ) e CB ( $p = 0,0078$ ); os valores de  $R_a$  do fragmento de An foi significativamente diferente dos valores de Bu ( $p = 0,009$ ). Não foram encontradas diferenças significativas para os valores  $F_{IS}$  entre os fragmentos.

**Tabela I.3.** Frequências dos alelos exclusivos nos fragmentos analisados. Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo e CB: Floresta Nacional de Capão Bonito.

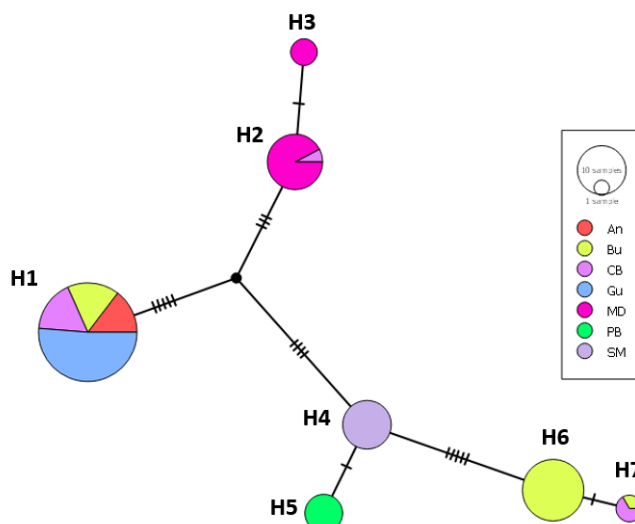
Fragmentos	Locus	Alelos	Frequência
SM	Leon30	274	0,444
MD	Leon11	309	0,278
	Leon21	286	0,143
CB	Leon3	318	0,400
	Leon11	315	0,500
	Leon21	300	0,100
	Leon31	328	0,050
	Leon31	338	0,600
Bu	Lchu8	224	0,630
	Leon3	310	0,114
	Leon11	325	0,348
	Leon15	290	0,881
	Leon30	278	0,289
	Leon31	336	0,159

A rede de haplótipos evidenciou três haplótipos comuns a fragmentos específicos, sendo eles: H1 (An, Gu, Bu e CB), H2 (MD e CB) e H7 (CB e Bu). Os outros quatro haplótipos foram exclusivos aos respectivos fragmentos, conforme descrito a seguir: H3 (MD), H4 (SM), H5 (PB) e H6 (Bu) (Figura I.3 e Tabela I.4).

A análise de *Spearman* mostrou correlação positiva e moderada entre a área dos fragmentos e a heterozigosidade observada ( $\rho = 0,40$ ;  $p$ -valor = 0,0014), e uma correlação negativa entre a área dos fragmentos e o coeficiente de endogamia ( $\rho = -0,39$ ,  $p$ -value < 0,000). As correlações entre os outros estimadores e a área dos fragmentos não evidenciaram valores significativos (Figura I.4A). As médias dos índices de relacionamento *Wang*, *Ritland* e *Queller & Goodnight* estimadas dentro dos fragmentos (Tabela I.4) para identificar a existência de correlação com a área de cada fragmento,

através da análise de *Spearman* mostrou que há uma correlação positiva e fraca entre a área dos fragmentos e os índices de relacionamento calculados pelo método de *Wang* ( $\rho = 0,17$ ;  $p\text{-valor} = < 0,000$ ). Os índices de parentesco calculados pelos métodos de *Ritland* ( $\rho = 0,01$ ;  $p\text{-value} = 0,789$ ) e *Queller&Goodnigh* ( $\rho = -0,06$ ;  $p\text{-value} = 0,149$ ) não apresentaram correlação significativa com a área dos fragmentos (Figura I.4B).

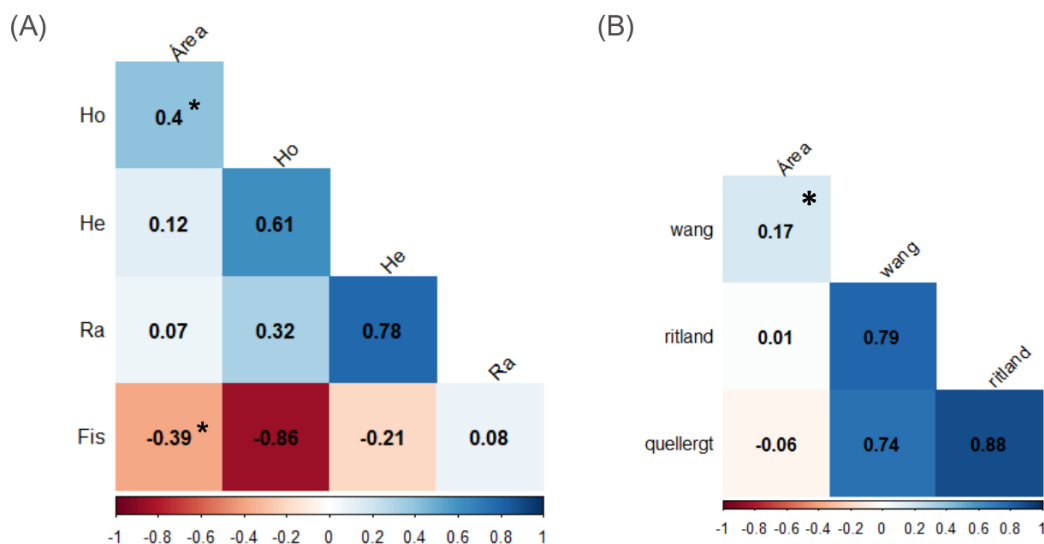
**Figura I.3.** Rede de haplótipos construída com os dados de seqüências de Dloop para a espécie *L. chrysopygus* utilizando o método de *Median-Joining*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos. Os traços representam o número de mutações entre os haplótipos. Os círculos em preto representam haplótipos não amostrados que foram inferidos pela análise (“median vectors”). As cores indicam os fragmentos detalhados na legenda. An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito.



**Tabela I.4.** Valores médios de relacionamento calculados a partir dos índices de Wang, Ritland e QuellerGT e a área (ha) para cada fragmento.

Fragmentos	Área (ha)	Wang	Ritland	Queller-Goodnight
An	85	-0.46862	-0.26712	-0.32
Bu	85	0.027987	-0.04499	-0.03455
CB	4344	0.6075	-0.0446	-0.14862
Gu	100	-0.33247	-0.04818	-0.20239
MD	35000	0.018569	-0.10144	-0.0962
PB	1303	0.410067	-0.12958	-0.15122
SM	515	0.550328	-0.06031	-0.06955

**Figura I.4.** Matriz de correlação de Spearman entre os valores de diversidade genética e área do fragmento. Ho, He, Ra,  $F_{IS}$  (A) e entre a área dos fragmentos e os índices de relacionamento Wang, Ritland e QuellerGT (B). O gradiente de coloração indica o coeficiente de correlação ( $\rho$ ) entre as variáveis analisadas, variando de -1 (vermelho escuro) a 1 (azul escuro). \* p-valor  $p < 0.05$ .



#### I.2.4. Demografia histórica

O teste de neutralidade D de Tajima apresentou valor positivo para ambas as regiões, porém, estatisticamente não significativo (Tabela I.5). Já o teste  $F_s$  de  $F_u$  apresentou valor negativo estatisticamente significativo para as duas regiões analisadas (Tabela I.5). Os valores do teste  $F_s$  de  $F_u$  tendem a ser negativos, devido ao excesso de mutações recentes, indicando uma possível expansão populacional nas regiões amostradas.

**Tabela I.5.** Valores para os testes de neutralidade D de Tajima e  $F_s$  de  $F_u$  para as regiões do Alto e do Pontal do Paranapanema.

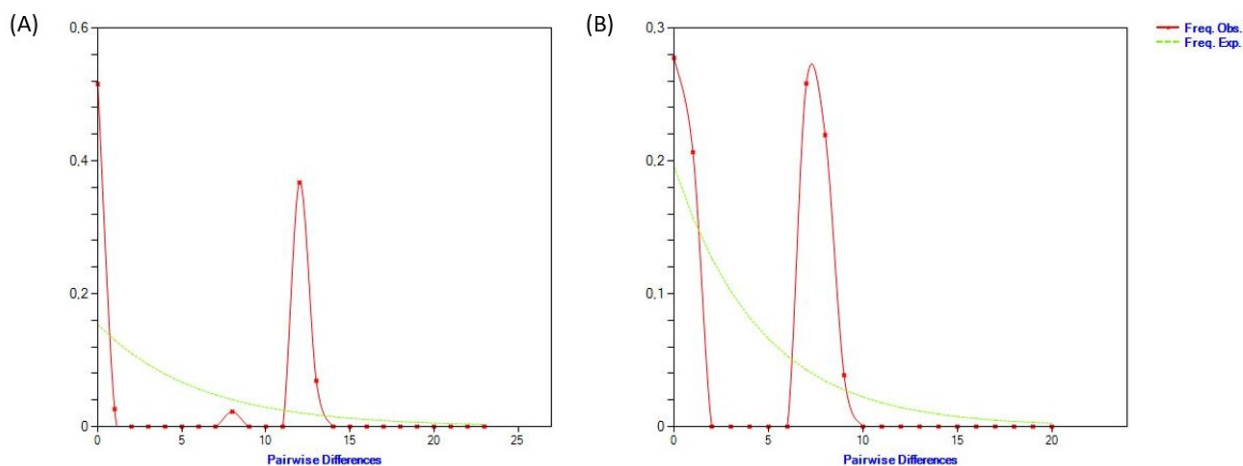
		Alto	Pontal
D de Tajima	Teste	1,56	2,55
	p-valor	0,95	0,99
$F_s$ de $F_u$	Teste	-25,36	-25,81
	p-valor	0,00*	0,00*

A curva de distribuição das diferenças par a par entre os pares de sequência apresentou um formato multimodal para ambas as regiões e o índice de ajuste entre as duas curvas foi significativo para Pontal,  $SSD = 0.125$  ( $p=0.02$ ), e não significativo para

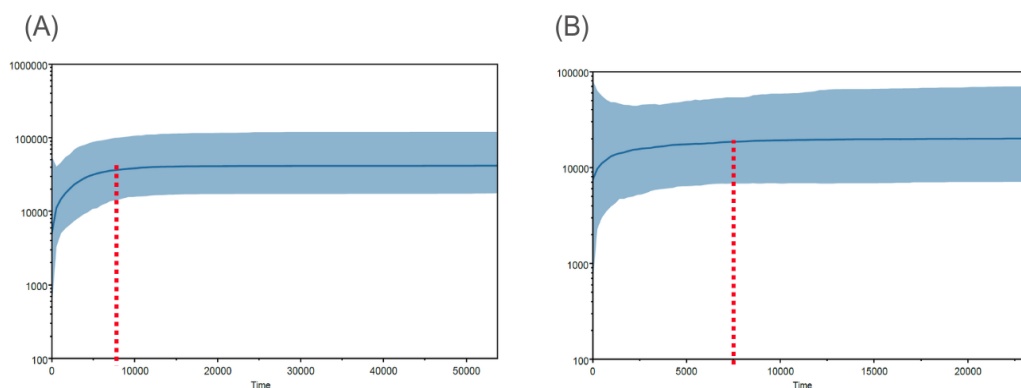
o Alto,  $SSD = 0,206$  ( $p=0,090$ ). O índice de *Raggedness*  $r$  não apresentou significância para ambas as regiões,  $r = 0.388$  ( $p=0.86$ ) para o Alto e  $r = 0.149$  ( $p=0,09$ ) para o Pontal (Figura I.5). Essa análise realiza a comparação da distribuição das diferenças nucleotídicas observadas em relação as esperadas entre os haplótipos levando em consideração o modelo de sítios infinitos, assim, quanto maior o número de diferença entre elas, maior o número de mutações ao longo do tempo.

Os valores positivos no teste D de Tajima, assim como o padrão multimodal observado em ambos os gráficos (Figura I.6) sugerem que estas populações estão em equilíbrio demográfico, sem indícios de expansão populacional. A análise BSP realiza as estimativas de acordo com o modelo de substituição nucleotídica, analisando a presença de oscilações demográficas nas populações (DRUMMOND et al, 2005). Os resultados obtidos aqui indicam que a população permaneceu estável até 5-7 mil anos, quando houve uma redução no tamanho efetivo populacional em ambas as regiões analisadas (Figura I.6). Essa redução foi contínua, sendo mais acentuada nos últimos cinco mil anos.

**Figura I.5.** Análise de *Mismatch Distribution* para as sequências Dloop para a região do Alto (A) e Pontal do Paranapanema (B). Distribuição da frequência do número de diferenças entre os pares de sequências (Pontal:  $SSD = 0.125$   $p = 0.02$ ; índice de *Raggedness* = 0.388,  $p = 0.86$ ), (Alto:  $SSD = 0,206$ ,  $p = 0,090$ ); índice de *Raggedness* = 0.388,  $p=0.86$ ).



**Figura I.6.** Análise de *Bayesian Skyline Plot* mostrando o tamanho populacional ao longo do tempo da espécie *L. chrysopygus* nas regiões (A) Alto e (B) Pontal do Paranapanema. A linha preta sólida indica a estimativa média e a área em azul o intervalo de maior densidade posterior (95%).



As probabilidades do teste de Wilcoxon e do teste do sinal para verificar os aspectos demográficos recentes, pela análise de *Bottleneck* utilizando os dados de microssatélites, apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os fragmentos de SM, MD, CB e Bu, nos modelos IAM e TPM, e para os fragmentos de SM, MD e CB, no modelo SMM (Tabela I.6). Os índices de Garza-Williamson foram baixos, variando de 0,306 a 0,645 entre as populações (Tabela I.6). Esses valores foram inferiores ao valor crítico de 0,68 proposto por Garza-Williamson, indicando que estes fragmentos estão passando por reduções no tamanho populacional.

**Tabela I.6.** Valores de  $p$  para a análise de *Bottleneck* nos fragmentos, segundo os diferentes modelos de mutações. IAM (Alelos Infinitos), SMM (*Stepwise Mutation*) e TPM (*Two Phase Mutation*). An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito. Os valores significativos ( $p < 0,05$ ) estão em negrito.

Fragmentos	IAM	Wilcoxon IAM	TPM	Wilcoxon TPM	SMM	Wilcoxon SMM	M-Ratio	S.D.
SM	0,061	<b>0,008</b>	0,051	<b>0,020</b>	0,062	<b>0,027</b>	0,389	0,155
PB	0,523	0,273	0,599	0,273	0,547	0,770	0,423	0,231
MD	0,054	<b>0,004</b>	0,220	<b>0,010</b>	0,237	<b>0,020</b>	0,532	0,275
CB	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	0,521	0,131
An	0,140	0,063	0,420	0,125	0,486	0,125	0,306	0,122
Bu	0,060	<b>0,003</b>	0,276	<b>0,012</b>	0,335	0,188	0,645	0,220
Gu	0,658	0,422	0,333	0,656	0,267	0,781	0,442	0,258

A taxa de migrantes por geração, calculada entre todos os fragmentos foi  $Nm = 0,084$ ; já a taxa de migrantes par a par para os fragmentos variou de 0,03 (Gu e CB) e 0,73 (Gu e An) (Tabela I.7).

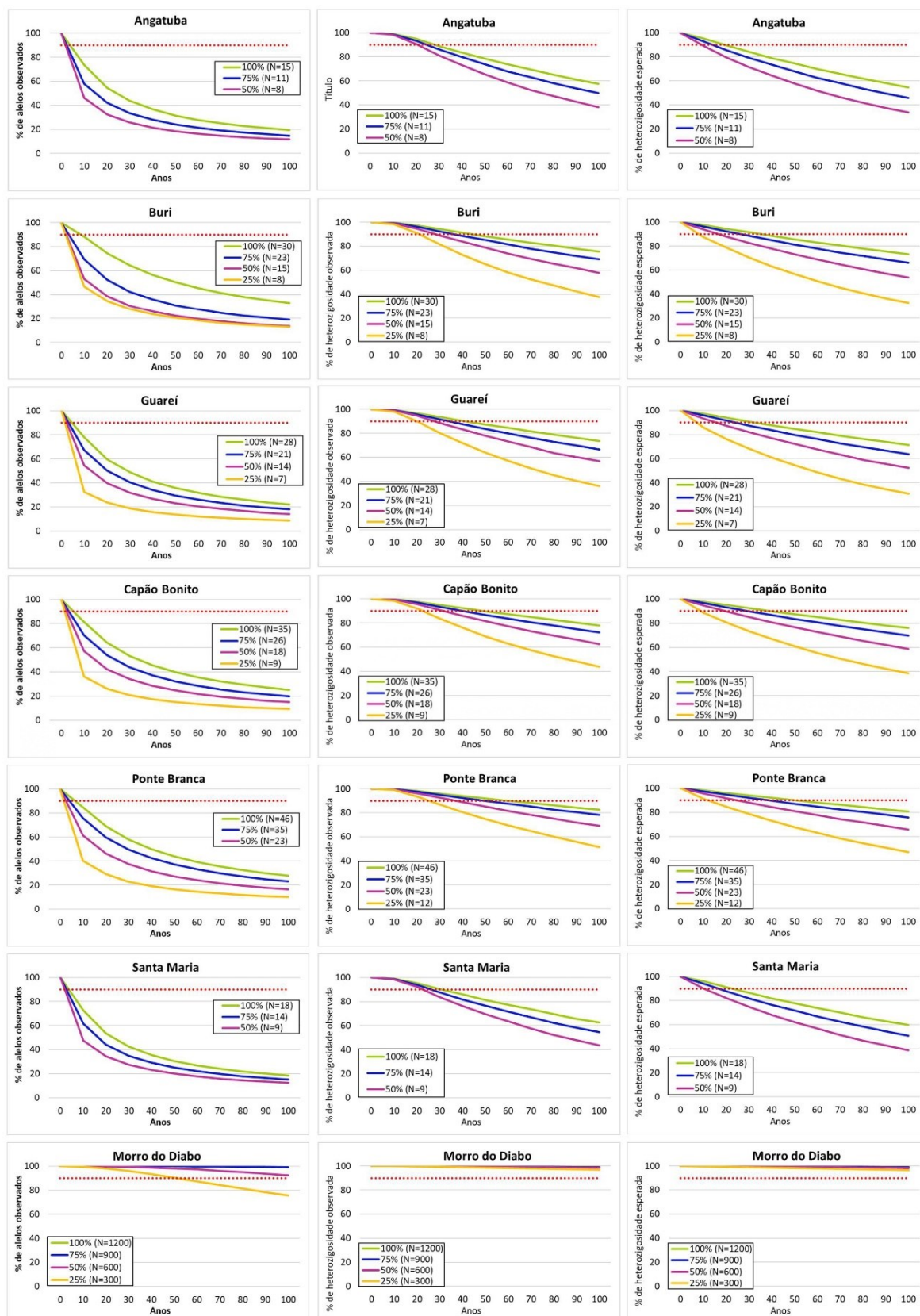
**Tabela I.7.** Taxa de migrantes, calculada pelo método de alelos privados entre os fragmentos par a par. An: Angatuba; Bu: Buri; SM: Fazenda Santa Maria, PB: Ponte Branca, MD: Parque Estadual do Morro do Diabo, Gu: Guareí, CB: Floresta Nacional de Capão Bonito.

Alto Paranapanema					Pontal do Paranapanema			
	An	Bu	CB	Gu		PB	SM	MD
<b>An</b>	-				<b>PB</b>	-		
<b>Bu</b>	0,07	-			<b>SM</b>	0,08	-	
<b>CB</b>	0,05	0,06	-		<b>MD</b>	0,12	0,12	-
<b>Gu</b>	0,73	0,10	0,03	-				

### I.2.5 Análises preditivas de viabilidade populacional

As simulações para retenção da diversidade genética ao longo do tempo evidenciaram uma redução mais rápida no número de alelos efetivos e observados, comparada a redução nos valores de heterozigosidade. Com exceção da população do MD, nenhuma outra população avaliada conseguirá reter 90% do número de alelos efetivos e do número de alelos observados por 10 anos, em qualquer cenário simulado (Figura I.7). Em relação aos valores de heterozigosidade, somente a população de PB e de MD evidenciaram capacidade de retenção de 90% da diversidade genética nos próximos 50 e 100 anos, respectivamente.

**Figura I.7.** Análise de predição para retenção da diversidade genética atual (alelos observados, heterozigidade observada e esperada) nos próximos 100 anos em populações de *Leontopithecus chrysopygus* de sete fragmentos, considerando ausência de redução (100%) e redução de 25%, 50% e 75% no tamanho populacional atual estimado.



## I.5. DISCUSSÃO

Os nossos achados apontam para uma moderada diversidade genética do MLP na maioria dos fragmentos analisados, sugerindo uma estruturação populacional provavelmente relacionada a diferenças nos graus de fragmentação e desconectividade dos habitats e a eventos históricos atrelados ao desmatamento nessas regiões (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; KEYGHOBADI *et al.*, 2005). No geral, detectamos uma menor estruturação genética dentro do Pontal do Paranapanema do que no Alto Paranapanema, apesar de terem sido observadas diferenças relacionadas aos métodos e marcadores empregados (ver Figura I.1). Embora o DNA mitocondrial possua uma elevada taxa de mutação, este reflete uma informação mais histórica, devido sua herança matrilinear e ausência de recombinação (AVISE, 1994). Por outro lado, devido a serem marcadores nucleares, e terem o efeito da singamia atrelado, incluindo eventos de recombinação (JENTZSCH, *et al.*, 2013; LI, *et al.* 2002), os microssatélites, possibilitam, inferências sobre fenômenos mais recentes ou contemporâneos, quando comparado aos mitocondriais. Além disso, algoritmos distintos podem implicar em diferenças na detecção de sinais de estruturação mais sutis (WANG, 2017), decorrentes da presença de alelos exclusivos e/ou com baixas frequências, como é o caso das populações de MLP estudadas aqui.

Os dados de estruturação obtidos com os locos de microssatélites, usando o método de Evanno e colaboradores (2005), indicam a existência de um único grupo genético na região do Pontal do Paranapanema, formado pelos fragmentos SM, PB e MD. Por outro lado, na região do Alto Paranapanema, apenas An e Gu se agruparam, sugerindo a existência de três populações geneticamente estruturadas (ver Figura I.1). Este cenário corrobora, em parte, os resultados obtidos com o marcador mitocondrial, que evidenciaram SM e PB, no Pontal, e An e Gu, no Alto, como grupos genéticos coesos dentro de cada região; mas aponta divergências em relação aos demais padrões de estruturação encontrados, possivelmente associados às diferenças na natureza dos marcadores utilizados e dos métodos de análise empregados. Pelo método de Pritchard e colaboradores (2000), os três fragmentos do Pontal (SM, PM e MD) se mostraram geneticamente estruturados, sugerindo que, embora indivíduos de um fragmento terem alta probabilidade de pertencerem a outro fragmento, estes fragmentos possivelmente estão experienciando um processo de diferenciação, resultante talvez de um desmatamento mais recente, com efeito mais tardio no padrão de distribuição da

diversidade genética (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; KEYGHOBADI *et al.* 2005). Apesar disso, é importante ressaltar que os valores de  $F_{ST}$  encontrados para os fragmentos do Pontal foram altos, indicando uma subestruturação nesta região (ver Tabela I.1). Por outro lado, os dados para os fragmentos de An e Gu sugerem a existência de apenas um grupo genético em todas as análises Bayesianas realizadas, corroboradas pela análise de PCoA e pelos valores de  $F_{ST}$  extremamente baixos ( $F_{ST} = 0,00-0,08$ ), demonstrando que esses fragmentos de fato constituem uma única população genética.

Historicamente, o Pontal do Paranapanema teve uma devastação mais tardia, quando comparada à de outras regiões do estado de São Paulo, tendo sido intensificado principalmente a partir da década de 1950, devido ao avanço das atividades de agricultura e pecuária naquela região. Assim, a partir de meados do século XX, a vegetação nativa de Mata Atlântica ao longo do Pontal foi sendo substituída por áreas destinadas ao monocultivo e à pastagem (RODRIGUES *et al.*, 2007; VALLADARES-PÁDUA *et al.*, 2002). Já no Alto Paranapanema, o início do desmatamento é incerto, no entanto, os dados históricos apontam uma intensificação na agricultura e agropecuária entre o final do século XIX e início do século XX, principalmente, após a construção da Estrada de Ferro Sorocabana, que era utilizada para o escoamento da produção de café e algodão (ARAUJO, 2012). Nestes cenários, a estruturação mais acentuada na região do Alto pode ser reflexo da ação do tempo mais evidente na diminuição e/ou interrupção de dispersão entre os fragmentos analisados, a qual é mais recente e menos sensível na região do Pontal e consequentemente nas análises realizadas neste estudo.

Quando avaliamos os atributos da paisagem dos fragmentos do Alto Paranapanema, verificamos que An e Gu apresentam conectividade e distam cerca de 15 km (distância euclidiana), e, apesar da taxa de migrantes ser baixa ( $Nm = 0,73$ ), esta foi a maior taxa estimada para toda a amostragem deste estudo (ver Tabela I.7.). Diferentemente, o fragmento Bu evidenciou uma subestruturação, ainda que detectada apenas com o método de Pritchard e colaboradores (2000). Esta diferenciação pode estar possivelmente associada a diferenças sutis de alelos raros e/ou exclusivos, os quais foram encontrados em alta frequência no grupo familiar BT de Bu, que se mostrou diferenciado dos demais grupos deste fragmento (ver Tabela I.9, Figura I.1). Adicionalmente, os dados mitocondriais evidenciaram haplótipos presentes no grupo BT que não foram encontrados nos outros dois grupos de Bu; por exemplo, o H7 presente também em CB, e o H1 presente em CB, Gu e An. Deste modo, embora não tenham sido identificadas barreiras físicas evidentes na paisagem de Bu, que possam ser responsáveis por uma possível

interrupção na dispersão e fluxo gênico local, os dados genéticos indicam uma possível ausência de dispersão/fluxo gênico entre BT e os dois outros grupos desse fragmento, a despeito da sobreposição na área de vida dos três grupos de Bu, e da ausência de clusterização distinta, evidenciada no PCoA. Por outro lado, os resultados sugerem uma possível conectividade histórica entre Bu e CB.

**Tabela I.8.** Alelos privados entre os grupos de Buri, de acordo com os resultados da estruturação, que agrupou os grupos BGM, BGE e BG\_04 em um *cluster* e o grupo BT em outro *cluster*.

<b>Grupos</b>	<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>
BGM-BGE-BG_04	Lchu7	344	0.433
	Lchu7	348	0.133
	Leon3	310	0.167
	Leon21	284	0.036
	Leon30	278	0.458
	Leon30	282	0.167
	Leon31	330	0.133
	Leon31	342	0.100
	Leon35	223	0.143
BT	Leon11	323	0.429
	Leon21	294	0.500
	Leon31	336	0.500
	Leon35	221	0.917

Outro dado que merece atenção é que na análise de coordenadas principais, as populações do Alto que retêm a maior diversidade genética são as que se apresentam mais próximas ao eixo das populações do Pontal que também apresentam os maiores níveis de heterozigidade observada. Por outro lado, An e Gu apresentaram os menores níveis de diversidade genética e as maiores taxas de endogamia (Tabela I.9). Vale destacar que embora a população de Bu possa ter seus dados de subestruturação influenciados pelo alto parentesco dentro do grupo BT, as taxas de endogamia nos grupos foram similares e parecidas em todos os fragmentos analisados, com exceção de Gu e especialmente de An, que se apresentou como a população mais endogâmica (Tabela I.9).

**Tabela 1.9.** Valores médios de diversidade para os *clusters* genéticos encontrados. (*Cluster 1*: Santa Maria, Ponte Branca e Morro do Diabo; *Cluster 2*: Angatuba e Guareí; *Cluster 3*: Grupos BGM, BGE e BG\_04 - Buri e *Cluster 4*: grupo BT - Buri. N: Número de amostras; Na: Número de alelos; Ne: Número de alelos efetivos; Ho: Heterozigosidade Observada; He: Heterozigosidade Esperada; Ra: Riqueza Alélica; Fis: Coeficiente de endogamia.

	<b>SM-PB-MD</b>	<b>An-Gu</b>	<b>BGM- BGE- BG_04</b>	<b>BT</b>
<b>N</b>	26	26	16	7
<b>Na</b>	2.818	1.818	2.364	1.909
<b>Ne</b>	1.895	1.358	1.755	1.710
<b>Ho</b>	0.425	0.146	0.423	0.554
<b>He</b>	0.415	0.162	0.355	0.342
<b>Ra</b>	2.462	1.601	2.137	1.896
<b>Fis</b>	-0.004	0.119	-0.157	-0.570

Os padrões de estruturação e os níveis de diversidade genética das populações são relevantes para auxiliar a definir unidades populacionais de manejo e sugerir áreas, populações ou unidades prioritárias de conservação, que visem preservar o potencial evolutivo de uma espécie (FRANKHAM, 2010; MORAES et al., 2023). Dados de endogamia são especialmente importantes também para guiar as tomadas de decisão e apontar populações com mais risco de extinção local. Os índices de endogamia estimados neste estudo evidenciaram valores positivos em Gu (0,072) e An (0,275), apontando para um possível déficit de heterozigotos e tendência a endogamia nesses fragmentos, apesar da ausência de significância após a correção de Bonferroni e novo valor de  $p$  ( $p = 0,0006$ ). Por outro lado, os fragmentos de CB e SM apresentaram valores negativos significativos para o excesso de heterozigotos. Valores de heterozigosidade observada maiores que o esperado são geralmente verificados em locos neutros e em populações com tamanho populacional reduzido, como é o caso das do MLP (CORNUET; LUIKART, 1996). Além disso, o excesso de heterozigotos pode indicar a existência de gargalos populacionais recentes, visto que a redução no número efetivo pode ocasionar ao aumento na heterozigosidade (CORNUET; LUIKART, 1996).

A redução do habitat, ocasionada pelo desmatamento e o isolamento de populações devido à ausência de conectividade entre fragmentos florestais, pode de fato ocasionar redução populacional e aumento do efeito da deriva genética. Além disso, pode causar a diminuição ou interrupção na dispersão e no fluxo gênico efetivo associado. Adicionalmente, a presença de rodovias e de grupos familiares em habitats extremamente modificados, como é o caso dos fragmentos de Gu e An, podem influenciar o comportamento reprodutivo de uma espécie e intensificar os endocruzamentos e aumento

da endogamia (ALMEIDA-ROCHA *et al.*, 2020; CLARK *et al.*, 2010). A interação entre esses eventos pode resultar na diminuição dos níveis de diversidade genética, e favorecer a diferenciação genética entre os fragmentos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; TEMPLETON *et al.*, 1990). Outro ponto relevante é que embora para o MLP dados de dispersão são escassos na literatura, estudos de observação em campo sugerem que os micos-leões em geral possuem baixa capacidade de dispersão, tendo sido reportado distâncias de 2 km para o mico-leão-dourado, *Leontopithecus rosalia* (MICKELBERG, 2011) e de 2,4 km mico-leão-da-cara-preta, *Leontopithecus caissara* (NASCIMENTO; NALI; FONSECA, 2014). Apesar disso, locomoções de 6,6 km já foram reportadas para *L. rosalia* e acredita-se que em paisagens suficientemente permeáveis, esta espécie possa realizar longas dispersões de até 8 km (MORAES *et al.*, 2018). Assim, quanto mais permeável e conectada a paisagem, maiores são as chances de promover a dispersão, garantindo o fluxo gênico e a manutenção de níveis de diversidade genética adequados.

No presente estudo, a população do MLP com maior diversidade genética, avaliada pelos níveis de heterozigosidade, foi a de CB, seguida pela de MD. Em termos de riqueza alélica, Bu apresentou um valor ligeiramente superior a MD e CB. Diferentemente, An e Gu foram os fragmentos que evidenciaram, além dos maiores valores estimados para o coeficiente de endogamia, os menores níveis de diversidade genética, incluindo de heterozigosidade esperada (An:  $He=0,107$ ; Gu:  $He=0,173$ ). Apesar disso, em geral, os achados evidenciaram valores de diversidade genética moderados para a maioria dos fragmentos tanto do Alto quanto do Pontal, sendo estes valores comparáveis aos encontrados para outras populações de vida-livre do MLP ( $He=0,295$  PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2005) previamente estudadas. Dados similares também foram encontrados para populações do MLP sob cuidado humano ( $He = 0,410-0,461$ ; AYALA-BURBANO *et al.*, 2017), bem como para outras espécies do gênero, como *L. rosalia* ( $He=0,42-0,66$ ; GRATIVOL, BALLOU, FLEISCHER, 2001; MORAES *et al.*, 2017; PEREZ-SWEENEY *et al.*, 2005), *Leontopithecus chrysomelas* (mico-leão-da-cara-dourada) ( $He=0,56-0,64$ ; GALBUSERA, GILLEMOT, 2008; ALIAGA-SAMANEZ *et al.*, 2023), e *Leontopithecus caissara* (mico-leão-de-cara-preta) ( $He=0,42-0,48$ ; MARTINS, GALETTI JR, 2010). Entretanto, é preciso ressaltar, que apesar da maior diversidade genética apontada para as populações de CB e de Bu, MD possui atualmente a maior população remanescente de MLP, (PARANHOS, 2006; REZENDE *et al.*, 2020), portanto, estudos futuros que incluam uma amostragem mais ampla, com um maior número de grupos representativos deste fragmento, devem ser priorizados.

Outro ponto importante, é que, embora bastante fragmentada, a região do Alto Paranapanema possui um dos maiores percentuais de cobertura florestal nativa de Mata Atlântica no estado de São Paulo (20,07% em cerca de 469.651,37 ha), sendo menor apenas que a área litorânea do estado (SMA/SP, 2018). Já na região do Pontal, restam apenas cerca de 8% (99.970,29 ha) da cobertura original desta área, a qual atualmente está presente principalmente no MD e em fragmentos adjacentes (SMA/SP, 2018), incluindo os fragmentos amostrados no presente estudo. O Parque Estadual Morro do Diabo, localizado no Pontal do Paranapanema, é uma unidade de conservação com aproximadamente 34 mil ha e como já mencionado possui a maior população de MLP remanescente, com um tamanho estimado de cerca de 1200 indivíduos, sendo considerada a única população demograficamente viável (REZENDE *et al.*, 2020). Já os fragmentos de Bu e CB, localizados no Alto Paranapanema, são caracterizados por florestas ripárias (CALDANO, 2014; LIMA *et al.* 2003). Especificamente, a Floresta Nacional de Capão Bonito possui uma área de aproximadamente 3 mil ha, localizada na bacia do rio Apiaí-Guaçu, e possui uma estimativa populacional de cerca de 35 animais (CALDANO; MONTICELLI; GALETTI, 2016). Por outro lado, o fragmento de Bu possui uma área de 85 ha ao longo do rio Apiaí-Guaçu, com uma estimativa populacional de 30 a 35 MLPs (L. Culot, *comunicação pessoal*). Desta forma, com exceção de Bu, os outros fragmentos com maior diversidade estão todos localizados em áreas protegidas. Assim, é importante que mais áreas de proteção sejam criadas para garantir a manutenção da diversidade genética do MLP nos fragmentos em que a espécie está presente, visto que dos 20 fragmentos em que ocorre, apenas oito são áreas protegidas (REZENDE *et al.*, 2020).

Estudos têm demonstrado que a implementação de áreas de proteção ambiental são ferramentas importantes para a conservação da biodiversidade (BRUNER *et al.*, 2001; SHAFER, 1999); e, apesar da Mata Atlântica possuir o maior número de áreas de proteção na América do Sul (TABARFTT *et al.*, 2016), é necessário uma ampliação das unidades de conservação, particularmente, em áreas de ocorrência de espécies ameaçadas, como é o caso do MLP. Neste contexto, os achados deste estudo são de especial relevância para os planos de manejo e conservação desta espécie, já que ações para criação de corredores florestais, estabelecimento de áreas prioritárias, além de movimentação assistida, através da translocação de animais entre fragmentos, estão previstas no Programa de Manejo Populacional do Mico-Leão-Preto, em consonância com as diretrizes da Instrução Normativa (IN) nº 5 de 13 de maio de 2021, estabelecida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA,

MMA, IN nº 5/2021). Adicionalmente, análises preditivas de simulação da perda de diversidade genética ao longo do tempo são relevantes para indicar populações em risco iminente de colapso, sendo os valores de heterozigosidade considerados bons preditores do potencial adaptativo de uma população em um futuro imediato (ALLENDORF, 1986).

No presente estudo, as projeções para reduções nos níveis de diversidade genética das populações analisadas, ao longo dos próximos 100 anos (KUO; JANZEN, 2003), demonstram que o número de alelos efetivos e observados serão retidos por no máximo 70-80 anos em MD e 10 anos nas demais populações analisadas (ver Figura I.7). Já níveis de  $H_e$  e  $H_o$  iguais ou superiores a 90% só serão retidos em MD nos próximos 100 anos, em PB no máximo até os próximos 70 anos e nas demais populações, no máximo, nos próximos 30-40 anos, considerando que não haja diminuição no tamanho populacional.

Em populações com tamanhos reduzidos, como a maioria das populações desse estudo, o número de alelos, em comparação com a heterozigosidade, é mais sensível à perda de variação genética (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010). Esse resultado é esperado, pois a riqueza alélica tende a diminuir mais rapidamente do que a heterozigosidade em populações que sofreram gargalos ou eventos de efeito fundador (GREENBAUM *et al.*, 2014). Isso ocorre porque tais fenômenos podem reduzir o número de alelos presentes em uma população, o que por sua vez reduz a riqueza alélica. A heterozigosidade, por outro lado, pode não ser afetada tanto por esses eventos inicialmente porque é baseada na proporção de indivíduos heterozigotos em vez do número de alelos. No entanto, a rápida e acentuada perda de alelos em todas as populações, incluindo MD, além da acentuada perda de heterozigosidade nos próximos 30-40 anos na maioria das populações demonstra um prognóstico preocupante para a espécie. Manter níveis de diversidade genética adequados reduz o risco de depressão endogâmica, que pode diminuir a aptidão e a sobrevivência de indivíduos e populações (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; OLDENBROEK, 2017). Neste sentido, apesar dessas simulações não incluírem os efeitos de seleção, migração e mutação em seus modelos, em um cenário mais próximo à realidade das populações naturais, os dados indicam baixa viabilidade para a grande maioria das populações analisadas, e conseqüentemente do potencial adaptativo da espécie para persistir ao longo do tempo e enfrentar eventuais mudanças nas condições ambientais, incluindo novas ameaças, como a presença de patógenos, entre outras (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Em relação à demografia histórica, não foram encontrados dados na literatura que reportem eventos de detecção de redução populacional em outras espécies animais para o período encontrado de 5-7 mil anos atrás. No entanto, estudos demonstram que durante o Quaternário houve sucessivas expansões e retrações da Mata Atlântica, e que no Holoceno Médio, entre 7 e 5 mil anos atrás, houve um período mais seco que levou a regressões drásticas nas florestas na América do Sul (LEDRU *et al.*, 2016; PRADO *et al.*, 2013). Essas alterações climáticas e reduções na floresta podem ter ocasionado perda de habitat e redução populacional para o MLP, que combinadas a fatores mais contemporâneos, discutidos no presente trabalho, moldaram os atuais baixos níveis de diversidade genética observados nas populações de vida livre remanescentes desta espécie.

## **I.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nossos resultados demonstram que os fragmentos estudados possuem baixos níveis de diversidade genética e que os padrões de estruturação encontrados estão associados aos baixos índices de fluxo gênico e indicam um possível efeito de isolamento causado pela fragmentação do habitat. A médio prazo, esta baixa diversidade genética, associada aos reduzidos tamanhos populacionais, na grande maioria das populações remanescentes, e ao baixo fluxo genético entre os fragmentos e/ou a ausência deste, podem colocar em risco a viabilidade da espécie, causando extinções locais nas próximas décadas. Assim, são necessárias medidas de manejo para garantir a sobrevivência do MLP na natureza, visando reestabelecer o fluxo gênico entre populações mais ameaçadas, com o objetivo de reter e/ou restaurar a diversidade genética e diminuir os efeitos negativos da depressão endogâmica e perda de *fitness* atrelados aos baixos níveis de diversidade genética.

Neste sentido, em termos de unidades de manejo populacional, recomendamos que MD, PB e SM sejam manejadas como uma única unidade; que An e Gu constituam outra unidade; e que haja um esforço para reconectar CB e Bu entre si, e estes à An e Gu, e, posteriormente, destes a outros fragmentos do Pontal, já que haplótipos comuns ao Alto e ao Pontal do Paranapanema demonstram sinais de conectividade histórica entre as regiões. Adicionalmente, a evidência e ausência de estruturação genética dentro do Pontal apontadas, respectivamente, pelos métodos de Pritchard e colaboradores (2000) e de

Evanno e colaboradores (2005), indicam a necessidade de manutenção e reforço dos corredores florestais já existentes no Pontal para que estes fragmentos permaneçam conectados, e promovam a dispersão e fluxo gênico efetivo entre suas populações, diminuindo o processo de estruturação aqui detectado nas das abordagens empregadas. Por outro lado, a maior fragmentação na região do Alto demonstra a necessidade de atenção e urgência para direcionar ações para reflorestamento e conectividade nessa área, especialmente pelos altos valores de heterozigosidade e riqueza de alelos observados em CB e Bu, respectivamente.

Além disso, políticas para garantir a proteção de áreas de ocorrência atual da espécie, que não estão atualmente em unidades de conservação, precisam ser adotadas para que tais populações remanescentes não aumentem seu risco de extinção local. Recomenda-se também que esforços para amostrar e analisar um maior número de grupos viventes no fragmento MD, além de populações da região do Médio Paranapanema, sejam priorizados para aumentar a representatividade da amostragem e acessar a diversidade genética, e seu padrão de distribuição, ao longo de toda área de ocorrência atual do MLP. Por fim, estudos que contemplem a prospecção de marcadores não-neutros também possibilitarão uma avaliação da diversidade genética adaptativa, permitindo assim investigar sinais de seleção diferencial e avaliar o potencial adaptativo da espécie perante as modificações climáticas e ambientais prementes, inerentes ao Antropoceno (KIRK; FREELAND, 2011).

Por fim, considerando as ações previstas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Primatas da Mata Atlântica e da Preguiça-de-coleira (PAN PPMA/ICMBio), que inclui o MLP como uma das espécies alvo, os resultados desse trabalho são uteis para auxiliar os seguintes objetivos e ações previstas: OBJETIVO 1: (ação 1.1) identificar áreas importantes para as espécies alvo do PAN, (ação 1.3) implementar projetos de restauração ecológica para conexão de fragmentos ou ampliação de habitat, (ação 1.6) propor e articular ações para minimizar o impacto de empreendimentos lineares na conectividade de populações através da implantação de passagens de fauna e rotas alternativas; OBJETIVO 2: (ação 2.1) manejar populações dos táxons alvo do PAN visando sua viabilidade, (ação 2.2) elaborar chaves de decisão para destinação (*ex situ* e *in situ*) de indivíduos/grupos dos táxons do PAN, e (ação 2.3) planejar o estabelecimento de populações *ex situ* com base na ação 2.2.

## I.7. REFERÊNCIAS

ACEVEDO-GARCÉS, Y. A.; VALENCIA, L. M.; DI FIORE, A.; ACEVEDO-CENDELES, L. D.; ROJAS, W.; BOCK, B.; OSPINA, O.; ÁLVAREZ, J.; SOTO-CALDERÓN, I. D. Current and historical genetic structure of the white-footed tamarin (*Saguinus leucopus*). *Em: NARDELLI, M.; TÚNEZ, J. I. Molecular Ecology and Conservation Genetics of Neotropical Mammals*. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 171–197.

ALIAGA-SAMANEZ, G. G.; BULHÕES JAVAROTTI, N.; ORECIFE, G.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; PISSINATTI, A.; MONTICELLI, C.; CRISTINA MARQUES, M.; GALBUSERA, P.; GALETTI, P. M.; DOMINGUES DE FREITAS, P. Genetic diversity in ex situ populations of the endangered *Leontopithecus chrysomelas* and implications for its conservation. **PLOS ONE**, v. 18, n. 8, p. e0288097, 2 ago. 2023. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0288097>>.

ALLENDORF, F. W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. **Zoo Biology**, v. 5, n. 2, p. 181–190, 1986. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/zoo.1430050212>>.

ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A.; LUIKART, G. **Genomics and the future of conservation genetics** *Nature Reviews Genetics*. Malden, USA. Wiley-Blackwell Publishing, 17 out. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrg2844>>.

ALMEIDA-ROCHA, J. M. de; PERES, C. A.; OLIVEIRA, L. C. Primate responses to anthropogenic habitat disturbance: A 55antropical meta-analysis. **Biological Conservation**, v. 215, p. 30–38, nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000632071630893X>>.

ALMEIDA-ROCHA, J. M.; SOARES, L. A. S. S.; ANDRADE, E. R.; GAIOTTO, F. A.; CAZETTA, E. The impact of anthropogenic disturbances on the genetic diversity of terrestrial species: A global meta-analysis. *Molecular Ecology*, vol. 29, no. 24, p. 4812–4822, 3 Dec. 2020. DOI 10.1111/mec.15688. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.15688>.

ARAÚJO, S. A. C. **Conhecer para preservar: arqueologia e inclusão social na bacia do Paranapanema superior**. 2012. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/71/71131/tde-19062012-141802/>>.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Boston, MA: Springer US, 1994. V. 3232-5059-32–5059 p.

AYALA-BURBANO, P. A.; CALDANO, L.; JUNIOR, P. M. G.; PISSINATTI, A.; MARQUES, M. C.; WORMELL, D.; DOMINGUES DE FREITAS, P. Genetic assessment for the endangered black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), Callitrichidae, Primates. **American Journal of Primatology**, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajp.22719>>.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–31, maio 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

BRUNER, A. G.; GULLISON, R. E.; RICE, R. E.; DA FONSECA, G. A. B. Effectiveness of parks in protecting tropical biodiversity. *Science*, vol. 291, no. 5501, p. 125–128, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.291.5501.125>.

CALDANO, L. T. P.; MONTICELLI, C.; GALETTI, P. M. Jr. Demography of the Black Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan) in Capão Bonito National Forest (State of São Paulo). *Neotropical Primates*, v. 23, n. 1, p. 40–41, 2016. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/11505/0>>.

CLARK, R. W.; BROWN, W. S.; STECHERT, R.; ZAMUDIO, K. R. Roads, Interrupted Dispersal, and Genetic Diversity in Timber Rattlesnakes. *Conservation Biology*, vol. 24, no. 4, p. 1059–1069, 15 Aug. 2010. DOI 10.1111/j.1523-1739.2009.01439.x. Available at: <https://conbio.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1523-1739.2009.01439.x>.

COIMBRA-FILHO, A. F. Acêrca da redescoberta de *Leontideus chrysopygus* (Mikan, 1823) e apontamentos sôbre sua ecologia (Callitrichidae, Primates). *Revista brasileira de biologia*, v. 30, n. 4, p. 609–615, 1970a.

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

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, v. 144, n. 4, p. 2001–2014, 1 dez. 1996. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/genetics/144.4.2001>>. Acesso em: 9 jul. 2023.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O. G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*, v. 22, n. 5, p. 1185–1192, 2005.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, v. 14, n. 8, p. 2611–20, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15969739>>.

FORERO-SÁNCHEZ, F. **Análises de Viabilidade Populacional no Planejamento para a Conservação do Mico-Leão-Preto**. 2020. Instituto de Pesquisas Ecológicas - IPÊ, Nazaré Paulista, 2020. Disponível em: <<https://escas.org.br/index.php/mestrado/profissional/produtos-finais>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, v. 143, n. 9, p. 1919–1927, set. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000632071000234X>>.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.

GALBUSERA, P. H. A.; GILLEMOT, S. Polymorphic microsatellite markers for the endangered golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae). *Conservation Genetics*, v. 9, n. 3, p. 731–733, 7 jun. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10592-007-9370-7>>.

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

GREENBAUM, G.; TEMPLETON, A. R.; ZARMI, Y.; BAR-DAVID, S. Allelic Richness following Population Founding Events – A Stochastic Modeling Framework Incorporating Gene Flow and Genetic Drift. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115203, 19 dez. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0115203>>.

HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L. A.; CLOBERT, J.; DAVIES, K. F.; GONZALEZ, A.; HOLT, R. D.; LOVEJOY, T. E.; SEXTON, J. O.; AUSTIN, M. P.; COLLINS, C. D.; COOK, W. M.; DAMSCHEN, E. I.; EWERS, R. M.; FOSTER, B. L.; JENKINS, C. N.; KING, A. J.; LAURANCE, W. F.; LEVEY, D. J.; MARGULES, C. R.; MELBOURNE, B. A.; NICHOLLS, A. O.; ORROCK, J. L.; SONG, D. X.; TOWNSHEND, J. R. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth’s ecosystems. **Science Advances**, v. 1, n. 2, 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1500052>>. Acesso em: 9 jul. 2023.

JENTZSCH, I. M. V.; BAGSHAW, A. T.; BUSCHIAZZO, E.; MERKEL, A.; GEMMELL, N. J. Evolution of Microsatellite <scp>DNA</scp>. *Em: Encyclopedia of Life Sciences*. [s.l.] Wiley, 2013.

KEYGHOBADI, N. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. **Canadian Journal of Zoology**, v. 85, n. 10, p. 1049–1064, 2007.

KEYGHOBADI, N.; ROLAND, J.; MATTER, S. F.; STROBECK, C. Among- and within-patch components of genetic diversity respond at different rates to habitat fragmentation: an empirical demonstration. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1562, p. 553–560, 7 mar. 2005. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2004.2976>>.

KIRK, H.; FREELAND, J. R. Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 12, no. 6, p. 3966–3988, 14 Jun. 2011. DOI 10.3390/ijms12063966. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/6/3966>.

KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Micos-leões: biologia e conservação**. [s.l.] Editora S. Institution, 2008. 568 p.

KUO, C.-H.; JANZEN, F. J. Bottlesim: a bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 4, p. 669–673, out. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-8286.2003.00532.x>>.

LEDRU, M. P.; MONTADE, V.; BLANCHARD, G.; HÉLY, C. Long-term Spatial Changes in the Distribution of the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 48, n. 2, p. 159–169, 1 mar. 2016.

LI, Y.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453–2465, 9 dez. 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>>.

LIMA, F.; DA SILVA, I. C.; MARTINS, C. S.; VALLADARES-PADUA, C. B. On the occurrence of the black-lion-tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*) in Buri, São Paulo, Brazil. **Neotropical Primates**, v. 11, n. 2, p. 144–145, 2003.

MARTINS, M. M.; GALETTI JUNIOR, P. M. Informative microsatellites for genetic population studies of black-faced lion tamarins (*Leontopithecus caissara*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 173–175, 22 dez. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572011000100030&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572011000100030&lng=en&tlng=en)>.

MELO-CARRILLO, A.; DUNN, J. C.; CORTÉS-ORTIZ, L. Low genetic diversity and limited genetic structure across the range of the critically endangered Mexican howler monkey (*Alouatta palliata mexicana*). **American Journal of Primatology**, v. 82, n. 8, p. 1–10, 2020.

MEYER, A. L. S.; PIE, M. R.; PASSOS, F. C. Assessing the exposure of lion tamarins (*Leontopithecus spp.*) to future climate change. **American Journal of Primatology**, v. 76, n. 6, p. 551–562, 2014.

MICKELBERG, J. L. Understanding and managing isolation in a fragmented population of golden lion tamarins, *Leontopithecus rosalia*. p. 1–186, 2011.

MILLS, L. S. Some matchmaking advice when translocated immigrants are a population's last hope. **Animal Conservation**, v. 20, n. 1, p. 12–13, fev. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/acv.12333>>.

MORAES, A. M.; DE SOUZA LIMA, J.; ROCHA ALEXANDRE, B.; AYALABURBANO, P. A.; DE FREITAS, P. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; MIYAKI, C. Y. Genetic Management Applied to Conservation of Reduced and Fragmented Wild Populations. *Em: Conservation Genetics in the Neotropics*. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 227–249.

MORAES, A. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; GALETTI, P. M.; NIEBUHR, B. B.; ALEXANDRE, B. R.; MUYLAERT, R. L.; GRATIVOL, A. D.; RIBEIRO, J. W.; FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, M. C. Landscape resistance influences effective dispersal of endangered golden lion tamarins within the Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 224, p. 178–187, 1 ago. 2018.

MORAES, A. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; RIBEIRO, M. C.; GRATIVOL, A. D.; DA S. CARVALHO, C.; DIETZ, J. M.; KIERULFF, M. C. M.; FREITAS, L. A.; GALETTI, P. M. Temporal genetic dynamics of reintroduced and translocated populations of the endangered golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**, v. 18, n. 5, p. 995–1009, 25 out. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10592-017-0948-4>>.

NASCIMENTO, A. T. A.; NALI, C.; DA FONSECA, G. A. B. Dispersal, group formation and kinship in the black-faced lion tamarin (*Leontopithecus caissara*). *Folia Primatologica*, vol. 85, no. 4, p. 216–227, 2014. DOI 10.1159/000363058. Available at: <https://www.karger.com/Article/FullText/363058>. OLDENBROEK, J. K. **Genomic management of animal genetic diversity**. Brill | Wageningen Academic, 2017.

PARANHOS, K. M. **Estimativas populacionais para espécies raras: o mico-leão-preto**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, p. 53. 2006.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; VALLADARES-PADUA, C.; BURRELL, A. S.; DI FIORE, A.; SATKOSKI, J.; VAN COEVERDEN DE GROOT, P. J.; BOAG, P. T.; MELNICK, D. J. Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 2, p. 198–201, 4 mar. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-8286.2005.00875.x>>.

PRADO, L. F.; WAINER, I.; CHIESSI, C. M.; LEDRU, M. P.; TURCQ, B. A mid-Holocene climate reconstruction for eastern South America. **Climate of the Past**, v. 9, n. 5, p. 2117–2133, 2013. Acesso em: 12 abr. 2023.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 1 jun. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/genetics/article/155/2/945/6048111>>.

REZENDE, G. C. **Mico-leão-preto: A história de sucesso na conservação de uma espécie ameaçada**. Matrix Editora, 2014. 176 p.

REZENDE, G. C.; KNOGGE, C.; PASSOS, F.; LUDWIG, G.; OLIVEIRA, L. C.; JERUSALINSKY, L.; MITTERMEIER, R. A. *Leontopithecus chrysopygus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2020**, v. 8235, p. e.T11505A17935400, 2020. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/11505/17935400>>.

RODRIGUES, E. R.; CULLEN, L.; BELTRAME, T. P.; MOSCOGLIATO, A. V.; DA SILVA, I. C. Economic evaluation of agroforestry systems for recovering forest reserves in Pontal of the Paranapanema, São Paulo State. **Revista Arvore**, v. 31, n. 5, p. 941–948, 2007.

SALLES-OLIVEIRA, I.; MACHADO, T.; RODRIGUES, K.; BANCI, S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; JOSÉ, M.; SILVA, J. Genetic variability, management, and conservation implications of the critically endangered Brazilian pitviper *Bothrops insularis*. **12870 | Ecology and Evolution**, v. 10, p. 12870–12882, 2020. Disponível em: <[www.ecolevol.org](http://www.ecolevol.org)>.

SARANHOLI, B.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; GALETTI, P. Evidence of Recent Fine-Scale Population Structuring in South American Puma concolor. **Diversity**, v. 9, n. 4, p. 44, 12 out. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-2818/9/4/44>>.

SHAFER, C. L. National Park and reserve planning to protect biological diversity: some basic elements. **Landscape and Urban Planning**, v. 44, n. 2–3, p. 123–153, 1999.

SMA/SP, S. do M. A. Meio Ambiente Paulista: Relatório de Qualidade Ambiental. **Secretaria do**, 2018. Disponível em: <[http://s.ambiente.sp.gov.br/cpla/RQA\\_2018.pdf](http://s.ambiente.sp.gov.br/cpla/RQA_2018.pdf)>.

TABARFTT, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. Challenges and Conservation in for Opportunities the Brazilian Biodiversity Forest Atlantic. v. 19, n. 3, p. 695–700, 2016.

TEMPLETON, A. R.; SHAW, K.; ROUTMAN, E.; DAVIS, S. K. The Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 77, n. 1, p. 13, 1990. Acesso em: 5 abr. 2023.

VALLADARES-PADUA, C.; PADUA, S. M.; CULLEN, L. Within and surrounding the Morro do Diabo State Park: biological value, conflicts, mitigation and sustainable development alternatives. **Environmental Science & Policy**, v. 5, n. 1, p. 69–78, fev.

2002. Disponível em:  
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1462901102000199>>.

WANG, J. The computer program <scp>structure</scp> for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 5, p. 981–990, 7 set. 2017. Disponível em:  
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-0998.12650>>.



## **Capítulo II**

### **Estrutura sócio-reprodutiva do mico-leão-preto**

## Capítulo II: Estrutura sócio-reprodutiva do mico-leão-preto

### RESUMO

Embora a monogamia seja considerada rara dentre os mamíferos, caracterizar com precisão o tipo de sistema sexual das espécies é uma tarefa difícil, dada a dificuldade de observação dos comportamentos reprodutivos em vida livre. Neste contexto, o uso de ferramentas genéticas pode auxiliar a produzir dados sobre as relações de parentesco, e assim permitir inferir sobre os sistemas reprodutivos. O mico-leão-preto (MLP), *Leontopithecus chrysopygus*, é um primata neotropical ameaçado de extinção, endêmico da Mata Atlântica do estado de São Paulo, que tem sido considerado monogâmico. Dados observacionais recentes, no entanto, sugerem reproduções extra-par. Neste trabalho, nós analisamos marcadores de microssatélites e a região controle do DNA mitocondrial (Dloop) para estabelecer o grau de parentesco em dez grupos de vida-livre do MLP e confirmar a contribuição materna, respectivamente, com o objetivo de compreender melhor aspectos relativos ao comportamento sócio-reprodutivo dessa espécie. Nossos achados confirmaram a existência de relações monogâmicas em cinco grupos, e sugeriram relações poligâmicas em quatro grupos. Nós também investigamos evidências de escolha de par para acasalamento baseada no grau de parentesco, entretanto, não encontramos nenhuma correlação, sugerindo que nesta espécie, a formação dos casais reprodutores parece ocorrer independente do grau de relacionamento entre machos e fêmeas. Estes resultados são importantes para aumentar o conhecimento sobre a biologia do MLP e dos calitriquídeos, sendo também de especial relevância para estudos que visem o manejo e conservação da espécie.

**Palavras-chave:** poligamia, parentesco, comportamento sócio-reprodutivo

## II. 1. INTRODUÇÃO

A observação das interações reprodutivas no habitat natural de uma espécie tem sido considerada uma tarefa desafiadora para muitas taxa animais (FITZSIMMONS, 1998), incluindo primatas (DI FIORE, 2003; PEDERSEN; BOOMSMA, 1999). Por isso, abordagens baseadas na análise de DNA vêm se tornando uma estratégia alternativa e eficiente para auxiliar os estudos observacionais em campo (DI FIORE, 2003). Análises empregando marcadores microssatélites têm sido as mais amplamente utilizadas para compreender questões relacionadas aos sistemas sociais em mamíferos, incluindo distintos grupos, como carnívoros (e.g. *Crocuta crocuta* – HÖNER *et al.*, 2007), lagomorfos (e.g. *Ochotona curzoniae* – YIN *et al.*, 2009), roedores (e.g. *Microtus ochrogaster* – OPHIR *et al.*, 2008), musaranhos (e.g. *Crocidura russula* – FAVRE *et al.*, 1997) e primatas (e.g. *Plecturocebus cupreus* – DOLOTOVSKAYA; ROOS; HEYMANN, 2020; *Phaner furcifer* – SCHÜLKE; KAPPELER; ZISCHLER, 2004; *Aotus azarae* – HUCK *et al.*, 2014).

Conhecer o tipo de sistema sócio-reprodutivo de uma espécie pode auxiliar a compreender aspectos relativos à dinâmica populacional, além da estrutura e diversidade genética (KAPPELER; SCHAİK, 2001). A formação de casais e escolha de parceiros deve maximizar os benefícios genéticos e de aptidão, resultando em aumento da saúde genética da prole (DOLOTOVSKAYA; ROOS; HEYMANN, 2020). Um baixo número de casais reprodutores em uma população pode, por exemplo, resultar no aumento de acasalamentos entre indivíduos mais relacionados, fazendo com que as taxas de endogamia também aumentem (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Desta forma, é esperado que, teoricamente, indivíduos geneticamente menos relacionados gerem proles com combinações genéticas de maior aptidão (DOLOTOVSKAYA; ROOS; HEYMANN, 2020). Neste contexto, em teoria, evitar o acasalamento entre indivíduos aparentados ou mais proximamente relacionados poderia otimizar a compatibilidade genética e evitar a depressão endogâmica (PARROTT; WARD; TEMPLE-SMITH, 2007; PUSEY; WOLF, 1996; TREGENZA; WEDELL, 2000).

A hipótese de que a escolha do acasalamento pode ser influenciada pelo parentesco genético do casal já foi testada em algumas espécies, porém, apenas alguns estudos demonstraram indícios significativos de existência de uma possível “fuga da endogamia” (e.g. *Mandrillus sphinx* – SETCHELL *et al.*, 2010; *Loxodonta africana* – SIMMONS, 1991 e *Gryllus bimaculatus* – ARCHIE *et al.*, 2007). Em primatas, estas

questões vêm sendo investigadas de forma ainda incipiente, especialmente em espécies raras e de baixa densidade populacional, como os micos-leões, nos quais os estudos genético-populacionais se restringem em grande parte a análises de diversidade e estrutura genética (AYALA-BURBANO, *et al.*, 2017; 2020; PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003), dado o intenso impacto negativo da perda e fragmentação de habitat nas populações dessas espécies, as quais, em geral, apresentam tamanhos populacionais pequenos e ausência ou redução de fluxo gênico, fatores estes que podem aumentar as taxas de endocruzamento (BALKENHOL; PARDINI; CORNELIUS, 2013; DIXO *et al.*, 2009). Neste contexto, sistemas diversos de acasalamento poderiam ser estratégias alternativas para promover um aumento na diversidade genética das progênes dentro dos grupos familiares (RODA; PONTES, 1997).

Embora a monogamia seja descrita para cerca de 29% das espécies de primatas estudadas até o momento (OPIE *et al.*, 2013; VAN SCHAIK; KAPPELER, 2013), copulações extra-par em táxons considerados monogâmicos já foram relatadas em algumas espécies neotropicais (e.g. *Saguinus mystax*, GARBER *et al.*, 1993; *Saguinus fuscicollis*, GOLDIZEN *et al.*, 1996), incluindo o mico-leão-dourado *Leontopithecus rosalia* (DIETZ; BAKER, 1993) e mais recentemente o mico-leão-preto *L. chrysopygus* (GARCIA *et al.*, 2021). Apesar disso, muito pouco se sabe sobre a frequência desses eventos e essas espécies continuam sendo consideradas monogâmicas, assim como outros calitriquídeos (Callitrichidae, Platyrrhini).

Os micos-leão-pretos (MLP) vivem em grupos sociais geralmente compostos por dois a oito indivíduos, dos quais apenas uma fêmea e um macho são considerados os reprodutores (COIMBRA-FILHO, 1976; KLEIMAN; RYLANDS, 2004; RYLANDS *et al.*, 1996). A gestação tem duração de 125-132 dias, sendo que as concepções ocorrem geralmente entre os meses de abril a junho e os nascimentos de agosto a outubro (FRENCH, 2008), podendo gerar *twins* e *triplets* (KLEIMAN; RYLANDS, 2004). No presente trabalho nós empregamos análises genético-moleculares em distintos grupos de vida livre desta espécie, com o objetivo de estabelecer as prováveis relações de parentesco entre os indivíduos de distintos grupos familiares e inferir sobre o sistema sócio-reprodutivo do MLP. Adicionalmente nós também investigamos evidências de acasalamentos preferenciais baseados na escolha de parceiros com menor grau de relacionamento. Nós hipotetizamos que a escolha de múltiplos parceiros e o acasalamento entre indivíduos menos relacionados podem ser estratégias utilizadas por esta espécie

para evitar a perda de diversidade genética e o aumento da endogamia em suas populações.

## II.2. MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem biológica e a metodologia empregada neste capítulo estão descritas nos itens 3.1-3.4 e 3.6 desta dissertação.

## II. 3. RESULTADOS

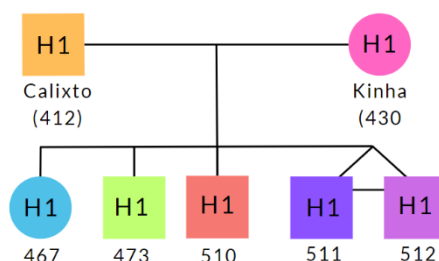
### II.3.1. Validação do painel de microssatélite

Para validar o painel de microssatélite utilizado neste trabalho para estabelecimento das relações de parentesco, primeiramente, foram realizadas análises em um grupo familiar de MLPs mantido sob cuidado humano na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP, SP). De acordo com os registros genealógicos do *Studbook* da espécie (WORMELL; MARQUES, 2020), este grupo é formado por sete indivíduos, sendo um casal reprodutor (Kinha e Calixto) e cinco filhotes descendentes (467, 473, 510, 511 e 512) (Tabela II.1). As análises para estabelecimento das relações de parentesco incluíram como pais/mães candidatos todos os machos (Calixto e 473) e fêmeas (Kinha e 467) do grupo em idade adulta, sem informação *a priori*, para simular os parâmetros considerados nas análises de grupos de vida-livre, em que não se tem conhecimento prévio sobre as relações de parentesco. Os resultados obtidos, com os locos utilizados, atribuíram 100% dos descendentes deste grupo, como prováveis filhos dos pais verdadeiros, com intervalos de confiança variando em geral de 95% (\*) a 90% (+), sendo que um descendente apresentou valor menor que 90% (-) (Tabela II.1 e Figura II.1). As análises de parentesco, em conjunto com as informações do *Studbook*, permitiram confirmar a existência de *twins* (511 e 512) nesta família. Além disso, utilizamos os dados de haplótipos mitocondriais para descartar eventuais erros de registro genealógico, tendo sido verificada a presença de um único haplótipo (H1) nesse grupo.

**Tabela II.1.** Resultado da análise de parentesco realizada no programa CERVUS da família cativa “Kinha x Calixto” mantida sob cuidado humano na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Trio confiança: \* >95%, 95%< + >90% e - <90%. LOD: logaritmo natural (log na base e) da razão de verossimilhança geral.

Filhos	Sexo	Mãe Candidata	Pai Candidato	Trio LOD score	Trio top LOD	Trio confidence
467	Fêmea	430 (Kinha)	412 (Calixto)	6.54E+00	6.54E+00	*
473	Macho	430 (Kinha)	412 (Calixto)	1.74E+00	1.74E+00	-
510	Macho	430 (Kinha)	412 (Calixto)	3.81E+00	3.81E+00	+
511	Macho	430 (Kinha)	412 (Calixto)	3.81E+00	3.81E+00	+
512	Macho	430 (Kinha)	412 (Calixto)	3.45E+00	3.45E+00	+

**Figura II.1.** Heredograma da família cativa “Kinha x Calixto” da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) atribuída através das análises de parentesco realizadas no programa CERVUS.



#### II.4.2. Análises de parentesco e inferências sócio-reprodutivas

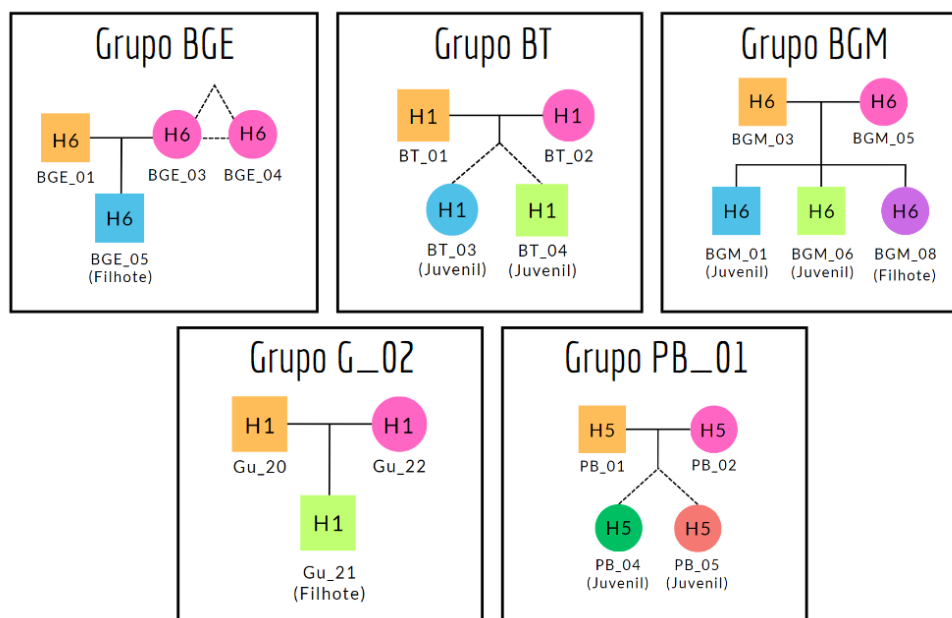
A partir dos dados de microssatélites, de 23 possíveis proles (*offspring*), sendo 10 filhotes e 13 juvenis, foi possível atribuir a maternidade e a paternidade, respectivamente, para 20 e 18 indivíduos (*offspring*) pertencentes a nove dos 14 grupos sociais analisados. Os grupos de SM\_02 e MD não evidenciaram valores com confiabilidade acima de 90% e os grupos CB\_02, SM\_01 e BG\_04 não possuem filhotes ou juvenis. Os resultados evidenciaram a formação de um total de 13 possíveis casais reprodutores nestes grupos, tendo sido encontradas congruências com os haplótipos mitocondriais identificados (H1-H7) para as prováveis relações estabelecidas entre irmãos e entre filhos e prováveis mães atribuídas pela análise de parentesco (Tabela II.2). Dados relativos à faixa etária dos animais também foram coincidentes com as aferições, as quais estabeleceram os possíveis pais para todos os dos filhotes amostrados.

Em cinco grupos analisados, BGE, BGM, BT (Buri), Gu\_02 (Guareí), PB (Ponte Branca) foram observadas relações monogâmicas, sendo identificado apenas um macho e uma fêmea como prováveis pais dos animais indicados como progênie (Figura II.2).

**Tabela II.2.** Valores de LOD e Delta para a atribuição de parentesco realizadas pelo programa Cervus. Código de identificação dos indivíduos (ID). Os indivíduos considerados gêmeos foram marcados com \*. Delta: diferença entre as razões de verossimilhança para dois pais candidatos mais prováveis. LOD: logaritmo natural (log na base e) da razão de verossimilhança geral. TC: Trio Confidence.

ID do Grupo	ID	Sexo	Faixa Etária	Haplótipo	Mãe atribuída	Pai atribuído	LOD	TC	Delta	TC
BGE	BGE_05	Macho	Filhote	6	BGE_03*/ BGE_04*	BGE_01	1.73E-01	*	1.88E+01	*
BT	BT_03*	Fêmea	Juvenil	1	BT_02	BT_01	1.39E+01	*	3.66E-01	+
	BT_04*	Macho	Juvenil	1	BT_02	BT_01	1.39E+01	*	3.66E-01	+
BGM	BGM_01	Macho	Juvenil	6	BGM_05	BGM_03	1.67E+01	*	1.01E+00	+
	BGM_06	Macho	Juvenil	6	BGM_05	BGM_03	8.17E+00	*	4.63E+00	*
	BGM_08	Fêmea	Filhote	6	BGM_05	BGM_03	1.29E+01	*	3.88E+00	*
An	ASF_01	Macho	Juvenil	1	ASF_04	ASF_06	3.42E+00	*	1.14E+01	*
	ASF_05	Macho	Juvenil	1	ASF_04	ASF_03	1.95E+00	*	1.36E+01	*
Gu_01	G_06	Macho	Filhote	1	G_04	G_07	6.08E+00	*	8.58E-01	+
	G_08	Fêmea	Juvenil	1	G_18	G_07	1.26E+01	*	8.12E-01	+
	G_10	-	Filhote	1	G_18	G_07	1.06E+01	*	8.12E-01	+
	G_17	Macho	Juvenil	1	G_18	G_19	1.33E+01	*	5.83E+00	*
Gu_02	G_21	Macho	Filhote	1	G_22	G_20	6.84E+00	*	2.16E+00	*
Gu_03	G_11*	Macho	Filhote	1	G_15	G_14	1.25E+01	*	4.82E+00	*
	G_12*	Macho	Filhote	1	G_15	G_14	1.25E+01	*	4.82E+00	*
	G_16	Fêmea	Filhote	1	G_15	G_13	9.81E+00	*	6.81E-01	*
PB	PB_04*	Fêmea	Juvenil	5	PB_02	PB_01	1.03E+01	*	6.80E-01	*
	PB_05*	Fêmea	Juvenil	5	PB_02	PB_01	1.03E+01	*	6.80E-01	*
CB_01	CB_04	Macho	Filhote	2	-	CB_03	1.10E+00	*	1.12E+01	*
	CB_05	Fêmea	Filhote	7	-	CB_03	1.10E+00	*	1.09E+01	*
SM_02	SM_04	Macho	Filhote	-	-	-	-	-	-	-
MD	MD_09	-	Juvenil	-	-	-	-	-	-	-
	MD_10	-	Juvenil	-	MD_11	MD_06	1.05E+01	-	2.82E-01	-

**Figura II.2.** Heredograma dos grupos BGE, BT e BGM de Buri (Bu), Gu\_01 de Guareí (Gu), PB de Ponte Branca (PB) e CB\_02 de Capão Bonito (CB) atribuídos através das análises de parentesco realizadas no programa CERVUS, evidenciando apenas relações monogâmicas. Haplótipos: H1, H2, H6.

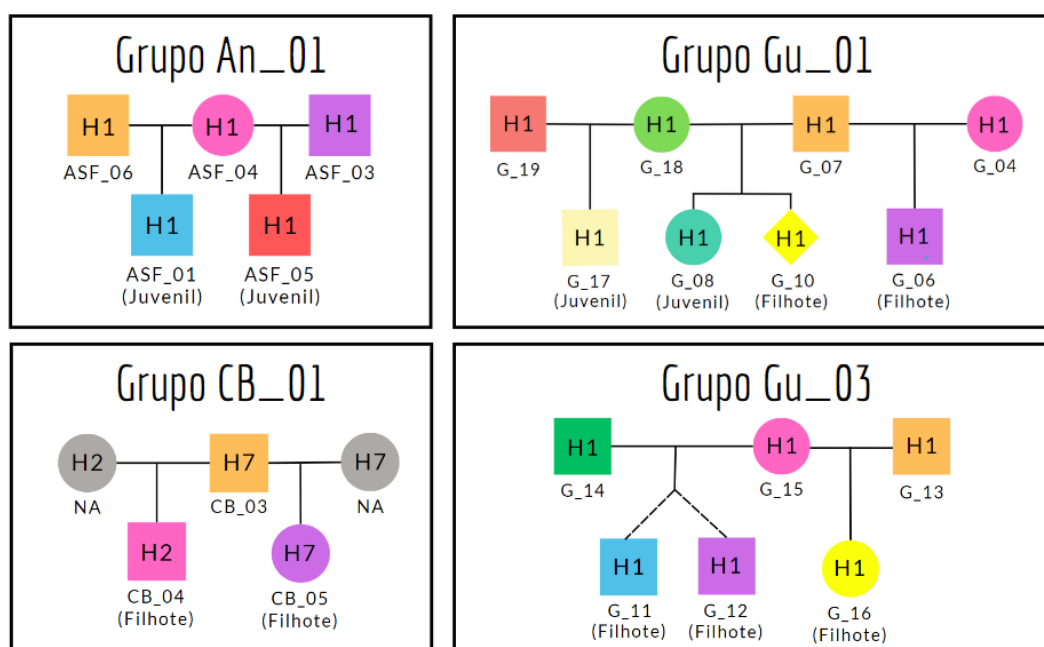


No grupo BGE de Buri, duas fêmeas (BGE\_03 e BGE\_04) foram atribuídas como possíveis mães de um filhote (BGE\_05), sendo que o valor de Delta (diferença entre as

razões de verossimilhança para dois pais candidatos mais prováveis) foi igual a zero, indicando as duas fêmeas como mães mais prováveis. Este resultado se deve possivelmente ao fato dessas fêmeas possuírem todos os genótipos idênticos, sugerindo uma relação de irmãs gêmeas (*twins*), com possibilidade destas serem inclusive gêmeas idênticas. Adicionalmente, foram identificados outros indivíduos com genótipos idênticos em três grupos pertencentes a Buri (BT\_03 e BT\_04), Guareí (G\_11 e G\_12) e Ponte Branca (PB\_04 e PB\_05). Esses resultados também indicam a provável existência de gêmeos, embora não possamos descartar a possibilidade de ser um artefato decorrente do baixo polimorfismo observado nestes grupos.

A despeito disso, relações de poligamia foram sugeridas em quatro grupos, sendo um deles de Angatuba (An), dois de Guareí (Gu\_01, Gu\_03) e um de Capão Bonito (CB\_01), nos quais foi indicado que tanto machos quanto fêmeas se reproduziram com mais de um parceiro para originar a possível prole atribuída (Figura II.3).

**Figura II.3.** Heredograma dos grupos An\_01 de Angatuba (An), Gu\_01 e Gu\_03 de Guareí (Gu) e CB\_01 de Capão Bonito (CB) atribuídos através das análises de parentesco realizadas no programa CERVUS. H1-H7 indicam o haplótipo do indivíduo. Os círculos indicam fêmeas e os quadrados indicam machos. As linhas tracejadas indicam uma provável relação de gêmeos. As fêmeas destacadas em cinza se referem a indivíduos não amostrados (NA), embora uma das fêmeas tenha sido avistada durante a captura do grupo.



No grupo CB\_01 de Capão Bonito, não foi possível realizar a atribuição de maternidade devido à ausência de fêmeas capturadas nesse grupo. No entanto, a

existência de filhotes com haplótipos diferentes (CB\_04 e CB\_01– H2; CB\_02 – H1 e CB\_05 – H7), e o mesmo pai atribuído (CB\_03), sugere a existência de três fêmeas se reproduzindo com este macho, indicando assim uma relação de poliginia. No grupo Gu\_01 de Guareí foram observadas possíveis relações poligâmicas envolvendo duas fêmeas (G\_04 e G\_18) e dois machos (G\_07 e G\_19). Por fim, no grupo de Angatuba e no grupo Gu\_03 de Guareí foram sugeridas relações de poliandria, em que a fêmea se acasala com dois machos. No entanto, em Gu\_03, dados de campo registraram que os três filhotes possuem a mesma idade biológica (Culot, L. *comunicação pessoal*), desta forma, o relacionamento paternal atribuído entre os indivíduos G\_13 e G\_16 pode ser devido ao baixo polimorfismo nesse grupo ou a uma possível relação de irmãos-completos.

#### **II.4.2. Escolha de parceiro baseada em parentesco**

Os índices de parentesco estimados entre os pares de acasalamento variaram de - 0.64 (Gu\_07 e Gu\_18) e 0.94 (G\_15 e G\_13), considerando o método proposto por Li *et al* (1993); e 0.00 (Gu\_07 e Gu\_18; Gu\_20 e G\_21) e 1 (G\_15 e G\_13; PB\_01 e PB\_02), considerando o método proposto por Wang (2002) (Tabela II.3). Apesar da variação nos valores estimados, não foram encontradas, porém, evidências significativas de que a escolha de parceiros seja baseada em parentesco, já que não houve diferenças significativas entre o parentesco de pares de acasalamento reais e pares de acasalamento simulados (Tabela II.4). Em relação aos haplótipos mitocondriais, com exceção do grupo CB\_02, em que o macho CB\_03 (H7), indicado como provável pai do filhote CB\_04 (H2), necessariamente precisou se acasalar com uma fêmea com o haplótipo H2, todas as relações atribuídas corroboram os resultados de parentesco estabelecidos para os dados microssatélites (Tabela II.2).

**Tabela II.3.** Índices de relacionamento, segundo o método de Li et al (1993) e Wang (2002), e haplótipos do Dloop para indivíduos atribuídos como prováveis casais reprodutores.

ID do Grupo	Fragmento	Mãe	Pai	Haplótipo mtDNA		Índice de Relacionamento	
				Mãe	Pai	Li	Wang
BGE	Buri	BGE_03	BGE_01	6	6	0.22	0.09
		BGE_04	BGE_01	6	6	0.22	0.09
BT	Buri	BT_02	BT_01	1	1	0.47	0.67
BGM	Buri	BGM_05	BGM_03	6	6	0.18	0.19
An	Angatuba	ASF_04	ASF_03	1	1	0.33	0.45
		ASF_04	ASF_06	1	1	0.33	0.26
Gu1	Guareí	G_04	G_07	1	1	-0.49	0.30
		G_18	G_07	1	1	-0.64	0.00
		G_18	G_19	1	1	0.60	0.32
Gu2	Guareí	G_20	G_22	1	1	0.45	0.00
Gu3	Guareí	G_15	G_13	1	1	0.94	1.00
		G_15	G_14	1	1	0.38	0.15
PB	Ponte Branca	PB_01	PB_02	5	5	0.86	1.00
CB_01	Capão Bonito	Fêmea_01	CB_03	2	7	-	-
		Fêmea_02	CB_03	7	7	-	-

**Tabela II.4.** Valores de relacionamento (R) e probabilidade associada (P-value), estimados para os fragmentos analisados, considerando os pares reprodutores atribuídos e a simulação.

Fragmento	Pares	Simulação	P-value
An	0.33	-0.39	0.905
Bu	0.29	0.00	0.924
Gu	0.21	0.18	0.514
PB	0.86	0.18	0.751

### II.4.3. Composição do Grupo

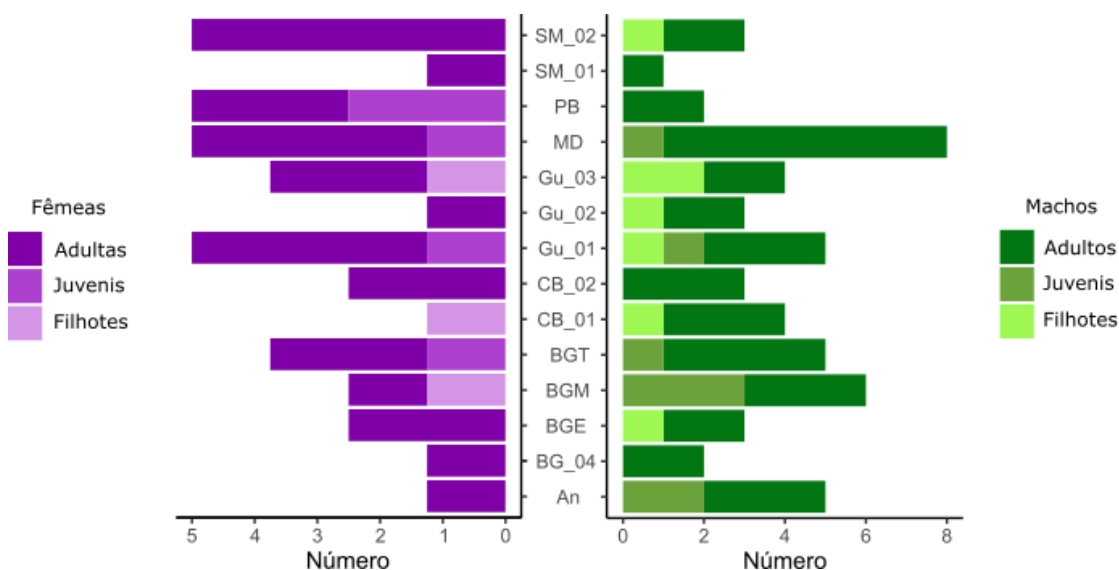
Com base nos dados obtidos em campo, foi possível observar que o número de indivíduos dos grupos variou de 15 (MD\_01) a 2 (SM\_01), com uma média de 6,6 indivíduos por grupo (Tabela II.5).

**Tabela II.5.** Composição dos grupos de *Leontopithecus chrysopygus* em relação ao número de indivíduos e o número de machos e fêmeas por cada faixa etária (adultos, jovens e filhotes).

Grupos	Total	Adultos		Juvenil		Filhotes	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
CB_01	5	3	0	0	0	1	1
CB_02	5	3	2	0	0	0	0
Gu_01	10	3	3	1	1	1	0
Gu_02	5	2	1	0	0	1	0
Gu_03	6	2	1	0	0	2	1
SM_01	2	1	1	0	0	0	0
SM_02	8	2	4	0	0	1	0
MD_01	15	7	3	1	1	0	0
PB_01	6	2	2	0	2	0	0
BGM	8	3	1	3	0	0	1
BT	8	4	2	1	1	0	0
BGE	6	2	2	0	0	1	0
BG_04	3	2	1	0	0	0	0
An	6	3	1	2	0	0	0
<b>Total</b>		39	24	8	5	7	3
<b>Razão Sexual</b>		1,63		1,6		2,3	

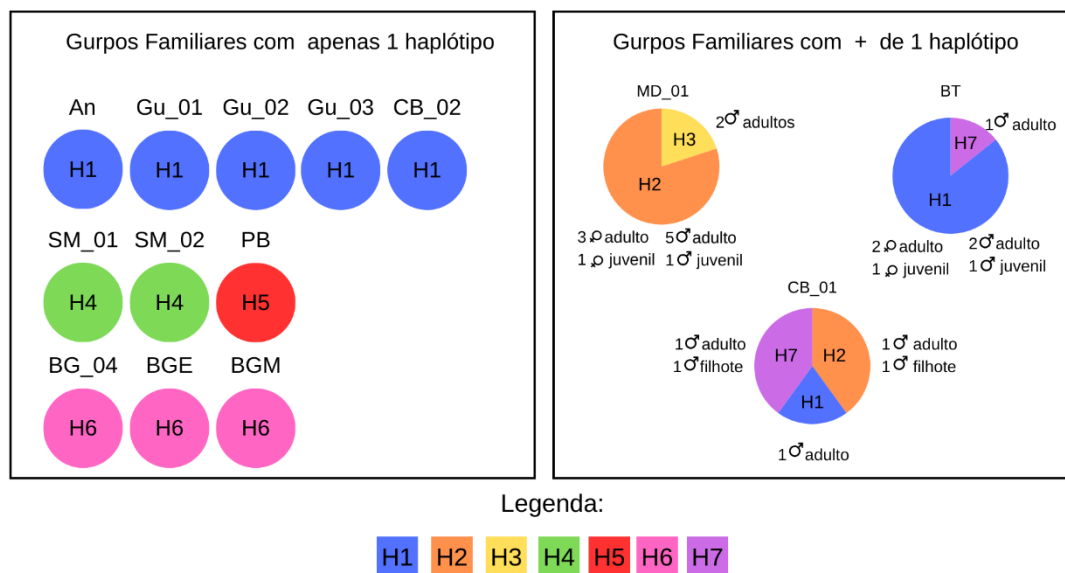
Em nossa amostragem o número de machos foi maior que o número de fêmeas para todas as faixas etárias analisadas. A razão sexual, calculada pelo total de machos em relação ao total de fêmeas, para cada faixa etária, foi de 1,64 machos por fêmea para indivíduos adultos, 1,60 machos por fêmeas para os juvenis e 2.33 para os filhotes (Tabela II.5 e Figura II.4)

**Figura II.4.** Gráfico com o número de indivíduos para cada faixa etária (adultos, juvenis e filhotes) por cada grupo de vida-livre de *Leontopithecus chrysopygus*.



Em 11 grupos analisados, todos os indivíduos apresentavam o mesmo haplótipo. No entanto, em três grupos (MD\_01, BT e CB\_01) foram encontrados indivíduos adultos com haplótipos diferentes (Figura II.5, Tabela II.6), sugerindo a existência de possíveis dispersores. No grupo MD\_01, embora o sexo de um indivíduo não tenha sido identificado dois dos três indivíduos que possuem o haplótipo H3 são machos adultos. No grupo BT, o indivíduo que possui o haplótipo H1 é um macho adulto. Em CB\_01, o indivíduo que possui o haplótipo H1 é um macho adulto, enquanto o haplótipo H2 esta presente em um macho adulto e um macho filhote, e o haplótipo H7 em um macho adulto e outro macho filhote.

**Figura II.5** Representação dos haplótipos encontrados nos indivíduos dos grupos familiares de *Leontopithecus chrysopygus*. As diferentes cores representam os sete haplótipos encontrados no trabalho (H1 – H7). An: Grupo de Angatuba; Gu\_01, Gu\_02, Gu\_03: Grupos de Guareí; CB\_01, CB\_02: Grupos de Capão Bonito; PB: Grupo de Ponte Branca; BG\_04, BGE, BGM e BT: Grupos de Buri; SM\_01 e SM\_02: Grupos de Santa Maria e MD: Grupo de Morro do Diabo.



**Tabela II.6.** Lista de haplótipos (H1-H7) encontrados para os indivíduos de *Leontopithecus chrysopygus* estudados.

Haplótipos	Indivíduos
H1	CB_01; CB_02; CB_06; CB_07; CB_08; CB_09; CB_10 ASF_01; ASF_02; ASF_03; ASF_04; ASF_05; ASF_06; BGT_01; BT_01; BT_02; BT_03; BT_04; BT_05; BT_06; G_11; G_12; G_13; G_14; G_15; G_16; G_17; G_18; G_19; G_20; G_21; G_22; Gu_213; Gu_348; Gu_349; Gu_350; Gu_351; Gu_352; Gu_353; Gu_440; Gu_441;
H2	MD_02; MD_03; MD_04; MD_05; MD_07; MD_08; MD_09; MD_10; MD_11; MD_B; MD_C; MD_D; CB_01; CB_04;
H3	MD_01; MD_06; MD_A;
H4	SM_144; SM_254; SM_281; SM_929; SM_980; SM_04; SM_06; SM_08; SM_09; SM_10;
H5	PB_01; PB_02; PB_03; PB_04; PB_05; PB_06;
H6	BGM_01; BGM_02; BGM_03; BGM_04; BGM_05; BGM_06; BGM_08; BGC_01; BG_13; B_14; B_15; BGE_03; BGE_04; BGE_05; BG3_01; BG3_02;
H7	CB_03; CB_05; BT_07

## II.5. DISCUSSÃO

Nossos achados sugerem que os MLPs não possuem um sistema social estritamente monogâmico, podendo apresentar também relações de poligamia, que incluem tanto a poliginia quanto a poliandria, como observado em alguns grupos familiares analisados. Notamos também que os casos de flexibilização da monogamia foram indicados nos fragmentos de Guareí, Capão Bonito e Angatuba, todos localizados no Alto Paranapanema, em áreas bastante antropizadas e com alto grau de perturbação (CULOT, *et al.*, 2015; CALDANO, *et al.*, 2016). Adicionalmente, os dados genéticos indicaram dispersão de ambos os sexos, no entanto, não foram encontradas evidências de que a escolha de parceiro seja baseada no grau de parentesco entre machos e fêmeas. Diferentes grupos evidenciaram a presença de machos adultos com haplótipos distintos dos do grupo familiar. Por outro lado, no grupo CB\_01, filhotes com haplótipos distintos (H7 e H2) foram encontrados, indicando a existência de fêmeas reprodutoras com haplótipos distintos. É importante salientar o fato de o H7 aparecer apenas neste grupo e em Bu, e a despeito de não termos amostrado as possíveis fêmeas reprodutoras deste grupo, conforme representado na figura II.2, uma delas foi avistada fugindo durante a captura dos animais nas atividades de campo (CALDANO, *et al.*, 2016).

Segundo Dewsbury (1987), para confirmar a monogamia em uma espécie é necessário seguir três critérios principais, a saber: (i) exclusividade do casal no acasalamento, (ii) associação do par e (iii) união dos esforços do casal no cuidado parental. Apesar da clareza desses critérios, definir a monogamia em vertebrados tem sido considerada uma tarefa desafiadora para populações de vida-livre, já que, o primeiro critério é difícil de ser confirmado, uma vez que cópulas furtivas podem não ser observadas na natureza. Desta forma, a utilização de ferramentas moleculares para confirmar se o macho identificado como possível reprodutor, pelas observações em campo, é realmente o pai da prole tem sido cada vez mais adotadas (SCHÜLKE; KAPPELER; ZISCHLER, 2003; MUNSHI-SOUTH, 2006; BARELLI *et al.*, 2013).

Na natureza, casos de poliginia já foram sugeridas para o mico-leão-dourado na Reserva Poços das Antas (RJ), em que esse comportamento foi encontrado em 10% das amostras analisadas, nesse caso, as fêmeas reprodutoras eram mães e filhas (DIETZ; BAKER, 1993). Mais recentemente, observações em campo em um grupo social de MLPs em Angatuba (SP), registraram quatro filhotes simultâneos, durante dois anos

consecutivos, sendo, com base nessa observação, sugerida a possibilidade de poliginia (GARCIA *et al.*, 2021). Apesar disso, informações precisas ainda são escassas para o gênero.

Em calitriquídeos a existência de sistemas de acasalamentos não-monogâmicos parece estar relacionada a fatores demográficos e ecológicos associados como prováveis causas da flexibilização do comportamento sexual (DIGBY; FERRARI, 1994; RYLANDS, 1996). Em calitriquídeos mantidos em condições *ex-situ*, os casos de poliandria já reportados na literatura indicaram que o acasalamento de uma fêmea com mais de um macho ocorreu quando houve a entrada de um macho não aparentado no grupo (KOENIG; ROTHE, 1991; PRICE; MCGREW, 1991). Sabe-se, que o acasalamento de indivíduos mais aparentados pode ocasionar o aumento na endogamia e na homozigose, favorecendo o aparecimento de genótipos recessivos deletérios (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Níveis de diversidade genética reduzidos e altas taxas de endogamia têm sido descritos para populações de vida-livre do MLP (AYALA-BURBANO, *et al.*, 2017; 2020; PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003). Apesar disso, em nosso estudo nós não observamos indícios de que as escolhas dos pares de acasalamento ocorram preferencialmente entre casais menos relacionados. Por outro lado, os dados encontrados aqui, indicam que a flexibilização do sistema de acasalamento no MLP, pode estar relacionada ao isolamento causado pela fragmentação do habitat e consequentemente sua saturação, que resulta na diminuição no sucesso da dispersão e limitação da reprodução fora do grupo natal (BAKER; DIETZ; KLEIMAN, 1993), uma vez que os fragmentos mais alterados acusaram os casos de poliginia. Ainda assim, os dados sugerem que ocorra a dispersão de ambos os sexos entre grupos distintos em um mesmo fragmento, uma vez que os haplótipos menos frequentes nos grupos familiares foram atribuídos principalmente aos machos adultos, e que houve a reprodução de duas fêmeas com haplótipos distintos em um dos grupos amostrados. Embora a literatura já tenha reportado casos de dispersão de machos e fêmeas em *Leontopithecus* (MORAES *et al.*, 2018, NASCIMENTO; NALI; FONSECA, 2014; MARTINS *et al.*, 2015, PAULA, 2013) e em outros calitriquídeos e.g. *Saguinus mystax* - GARBER *et al.*, 2016; LÖTTKER; HUCK; HEYMANN, 2004), estes estudos são escassos no gênero, sendo de especial relevância para melhor compreensão de aspectos relacionados ao comportamento e biologia do MLP.

Os resultados obtidos neste trabalho também adicionam informações relevantes sobre gestação gemelar nos MLPs, uma vez que indicaram que dos 23 filhotes e/ou juvenis amostrados, seis são possivelmente provenientes de gestações gêmeares. Em calitriquídeos a gestação de gêmeos é comum, devido a adaptações evolutivas que resultam na ovulação de múltiplos óvulos em cada ciclo reprodutivo, proporcionando assim que fecundações múltiplas ocorram com maior frequência (HARRIS *et al.*, 2014). Entretanto, registros compilados de distintos grupos e populações avaliadas contemporaneamente também são extremamente raros na literatura.

Quanto a composição dos grupos, o número médio de indivíduos em cada grupo foi consistente com os dados encontrados em estudos anteriores, que indicam que os grupos de MLPs são compostos por 2 a 8 animais (PASSOS 1992, VALLADARES-PADUA 1993, PARANHOS 2006, CALDANO, 2014, CULOT *et al.* 2019). No entanto, já foram registrados grupos com um número maior de indivíduos (GARCIA *et al.*, 2021), como os grupos aqui estudados, Gu\_01 e MD\_01, que possuíam 10 e 15 animais, respectivamente. Em relação à razão sexual, em grupos de MLPs mantidos no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ, RJ) foram registrados o nascimento de mais filhotes do sexo masculino (65 machos: 44 fêmeas – 1,47) (FRENCH *et al.*, 1996), corroborando o maior número de machos encontrado dentre os filhotes analisados nesse estudo. Segundo os autores, ao longo do primeiro ano de vida, as ninhadas mantinham aproximadamente 60% de machos (FRENCH *et al.*, 1996). Adicionalmente, um viés sexual similar para maior proporção de machos foi relatado também no mico-leão-dourado (DIETZ; BAKER, 1993). No lêmure-rato-vermelho *Microcebus rufus*, esse viés masculino foi atribuído a maior dispersão dos machos e filopatria das fêmeas (ATSALIS, 2000).

Apesar de evidências da dispersão de ambos os sexos, há uma maior tendência de machos emigrarem e imigrarem mais do que as fêmeas. Essa tendência pode ser explicada por duas principais razões: o padrão de herança feminina e a criação de vagas reprodutivas externas (PAULA, 2013; BAKER *et al.*, 2002). A dispersão sexual em calitriquídeos parece ser um processo complexo e variável, que depende de vários fatores demográficos e ambientais (MARTINS *et al.*, 2014). Além disso, a dispersão pode ser influenciada pela presença de indivíduos aparentados no grupo, pela qualidade do habitat e pela disponibilidade de parceiros sexuais (BOWLER & BENTON, 2005), como parece ser o caso evidenciado no presente estudo.

## II. 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho acrescentam informações relevantes sobre os padrões sócio-reprodutivos e de composição dos grupos do MLP. Os nossos achados indicaram a flexibilização do sistema reprodutivo do MLP, sugerindo que a poligamia, incluindo tanto poligenia quanto a poliandria, é uma estratégia reprodutiva presente nesta espécie. Além disso, os dados de composição dos grupos evidenciaram um viés populacional masculino, sendo encontrado um maior número de machos em todas as faixas etárias analisadas, com uma relação sexual de 1,6 (indivíduos maduros), e a ocorrência de *twins* em 26% dos filhotes e juvenis analisados. Tais informações são relevantes para aumentar o conhecimento sobre a biologia do MLP e consequentemente auxiliar nas ações de manejo e conservação da espécie.

## II.7. REFERÊNCIAS

ALLENDORF, F. W.; HOHENLOHE, P. A.; LUIKART, G. **Genomics and the future of conservation genetics**. *Nature Reviews Genetics*. Malden, USA. Wiley-Blackwell Publishing, 17 out. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrg2844>>.

ARCHIE, E. A.; HOLLISTER-SMITH, J. A.; POOLE, J. H.; LEE, P. C.; MOSS, C. J.; MALDONADO, J. E.; FLEISCHER, R. C.; ALBERTS, S. C. Behavioural inbreeding avoidance in wild African elephants. *Molecular Ecology*, v. 16, n. 19, p. 4138–4148, 2007.

ATSALIS, S. Spatial distribution and population composition of the brown mouse lemur (*Microcebus rufus*) in Ranomafana National Park, Madagascar, and its implications for social organization. *American Journal of Primatology*, v. 51, n. 1, p. 61–78, maio 2000. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(200005\)51:1%3C61::AID-AJP5%3E3.0.CO;2-2](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2345(200005)51:1%3C61::AID-AJP5%3E3.0.CO;2-2)>.

AYALA-BURBANO, P. A.; CALDANO, L.; JUNIOR, P. M. G.; PISSINATTI, A.; MARQUES, M. C.; WORMELL, D.; DOMINGUES DE FREITAS, P. Genetic assessment for the endangered black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), Callitrichidae, Primates. *American Journal of Primatology*, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajp.22719>>.

AYALA-BURBANO, P. A.; GALETTI JUNIOR, P. M.; WORMELL, D.; PISSINATTI, A.; MARQUES, M. C.; DE FREITAS, P. D. Studbook and molecular analyses for the endangered black-lion-tamarin; an integrative approach for assessing genetic diversity and driving management in captivity. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 6781, 22 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32321949>>.

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

BALKENHOL, N.; PARDINI, R.; CORNELIUS, C.; FERNANDES, F.; SOMMER, S. Landscape-level comparison of genetic diversity and differentiation in a small mammal inhabiting different fragmented landscapes of the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Genetics**, v. 14, n. 2, p. 355–367, 8 abr. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10592-013-0454-2>>.

BARELLI, C.; MATSUDAIRA, K.; WOLF, T.; ROOS, C.; HEISTERMANN, M.; HODGES, K.; ISHIDA, T.; MALAIVIJTNOND, S.; REICHARD, U. H. Extra-pair paternity confirmed in wild white-handed gibbons. **American Journal of Primatology**, v. 75, n. 12, p. 1185–1195, dez. 2013.

BOWLER, D. E.; BENTON, T. G. Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. **Biological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 205–225, maio 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1017/S1464793104006645>>.

CALDANO, L. T. P. **Censo populacional e avaliação da variabilidade genética das populações de mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan, 1823) na Floresta Nacional de Capão Bonito - SP**. 2014. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, ., 2014.

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

COIMBRA-FILHO, A. F. **Os sagüis do gênero *Leontopithecus* Lesson, 1840 (*Callithricidae* - *Primates*)**. 1976. Tese (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976.

CULOT, L.; GRIESE, J.; KNOGGE, C.; TONINI, M.; MULATO, M.; ESTEVAM, C. G.; LOPES, B. P.; MANTOVANI, B.; SILVA, B.; HELIODORA, B.; GARCIA, F. D. O.; CRISTINA, R. New Records, Reconfirmed Sites and Proposals for the Conservation of Black Lion Tamarin ( *Leontopithecus chrysopygus* ) in the Middle and Upper. **Neotropical Primates**, v. 22, n. 1, p. 32–39, 2015.

DEWSBURY, D. A. The comparative psychology of monogamy. **Nebraska Symposium on Motivation. Nebraska Symposium on Motivation**, v. 35, p. 1—50, 1987. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/3332030>>.

DI FIORE, A. **Molecular Genetic Approaches to the Study of Primate Behavior, Social Organization, and Reproduction** *American Journal of Physical Anthropology* John Wiley & Sons, Ltd, 1 jan. 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajpa.10382>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

- DIETZ, J. M.; BAKER, A. J. Polygyny and female reproductive success in golden lion tamarins, *Leontopithecus rosalia*. **Animal Behaviour**, v. 46, n. 6, p. 1067–1078, 1 dez. 1993. . Acesso em: 28 nov. 2021.
- DIGBY, L. J.; FERRARI, S. F. Multiple breeding females in free-ranging groups of *Callithrix jacchus*. **International Journal of Primatology**, v. 15, n. 3, p. 389–397, 1994.
- DIXO, M.; METZGER, J. P.; MORGANTE, J. S.; ZAMUDIO, K. R. Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. **Biological Conservation**, v. 142, n. 8, p. 1560–1569, ago. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006320708004540>>.
- DOLOTOVSKAYA, S.; ROOS, C.; HEYMANN, E. W. Genetic monogamy and mate choice in a pair-living primate. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77132-9>>.
- FAVRE, L.; BALLOUX, F.; GOUDET, J.; PERRIN, N. Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocidura russula*: Evidence from field data and microsatellite patterns. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 264, n. 1378, p. 127–132, 1997.
- FITZSIMMONS, N. N. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (*Chelonia mydas*). **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 575–584, 1998.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. [s.l.] Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.
- FRENCH, J. A.; DE VLEESCHOUWER, K.; BALES, K.; HEISTERMANN, M. Lion tamarin reproductive biology. **Lion Tamarins: Biology and Conservation**, p. 475p., 2008.
- FRENCH, J. A.; PISSINATTI, A.; COIMBRA-FILHO, A. F. Reproduction in captive lion tamarins (*Leontopithecus*): Seasonality, infant survival, and sex ratios. **American Journal of Primatology**, v. 39, n. 1, p. 17–33, 1996. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1996\)39:1%3C17::AID-AJP2%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2345(1996)39:1%3C17::AID-AJP2%3E3.0.CO;2-V)>.
- GARBER, P. A.; ÓN, F. E.; MOYA, L.; PRUETZ, J. D. Demographic and reproductive patterns in moustached tamarin monkeys (*Saguinus mystax*): Implications for reconstructing platyrrhine mating systems. **American Journal of Primatology**, v. 29, n. 4, p. 235–254, 1993.
- GARBER, P. A.; PORTER, L. M.; SPROSS, J.; DI FIORE, A. Tamarins: Insights into monogamous and non-monogamous single female social and breeding systems. **American Journal of Primatology**, v. 78, n. 3, p. 298–314, 2016.
- GARCIA, F. de O.; DO PRADO, B. H. S.; SOUZA, E. de J.; MACHADO, V.; ALBINO, C. V.; ROCHA, V. J. Nest box use and polygyny in an endangered primate species: The black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Oecologia Australis**, v. 25, n. 1, p. 166–173, 2021.

GOLDIZEN, A. W. Facultative polyandry and the role of infant-carrying in wild saddle-back tamarins (*Saguinus fuscicollis*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 20, n. 2, p. 99–109, 1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00572631>>.

HÖNER, O. P.; WACHTER, B.; EAST, M. L.; STREICH, W. J.; WILHELM, K.; BURKE, T.; HOFER, H. Female mate-choice drives the evolution of male-biased dispersal in a social mammal. **Nature**, v. 448, n. 7155, p. 798–801, 2007.

HUCK, M.; FERNANDEZ-DUQUE, E.; BABB, P.; SCHURR, T. Correlates of genetic monogamy in socially monogamous mammals: insights from Azara's owl monkeys. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1782, p. 20140195, 7 maio 2014. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2014.0195>>.

KAPPELER, P. M.; VAN SCHAIK, C. P. Evolution of primate social systems. **International Journal of Primatology**, v. 23, n. 4, p. 707–740, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015520830318>>.

KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Lion Tamarins: Biology and Conservation**. Washington: Smithsonian, 2004. v. 381459–1460 p.

KOENIG, A.; ROTHE, H. Social relationships and individual contribution to cooperative behaviour in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Primates**, v. 32, n. 2, p. 183–195, 1991.

LI, C. C.; WEEKS, B. E.; CHAKRAVARTI, A. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. **Human Heredity**, v. 43, n. 1, p. 45–52, 1 jan. 1993. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1159/000154113>>. Acesso em: 20 jul. 2023.

LÖTTKER, P.; HUCK, M.; HEYMANN, E. W. Demographic parameters and events in wild moustached tamarins (*Saguinus mystax*). **American Journal of Primatology**, v. 64, n. 4, p. 425–449, 2004.

MARTINS, M. M.; NASCIMENTO, A. T. A.; NALI, C.; VELASTIN, G. O.; MANGINI, P. B.; VALLADARES-PADUA, C. B.; GALETTI, P. M. A test for sex-biased dispersal in the black-faced lion tamarin (*Leontopithecus caissara*): inferences from microsatellite markers. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 50, n. 1, p. 14–20, 2 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01650521.2014.978660>>. Acesso em: 7 maio. 2023.

MORAES, A. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; GALETTI, P. M.; NIEBUHR, B. B.; ALEXANDRE, B. R.; MUylaert, R. L.; GRATIVOL, A. D.; RIBEIRO, J. W.; FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, M. C. Landscape resistance influences effective dispersal of endangered golden lion tamarins within the Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 224, p. 178–187, 1 ago. 2018.

MUNSHI-SOUTH, J. Extra-pair paternity and the evolution of testis size in a behaviorally monogamous tropical mammal, the large treeshrew (*Tupaia tana*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 62, n. 2, p. 201–212, 2007. . Acesso em: 19 jul. 2023.

NASCIMENTO, A. T. A.; NALI, C.; DA FONSECA, G. A. B. Dispersal, Group Formation and Kinship in the Black-Faced Lion Tamarin (*Leontopithecus caissara*). **Folia Primatologica**, v. 85, n. 4, p. 216–227, 2014. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/363058>>.

OPHIR, A. G.; PHELPS, S. M.; SORIN, A. B.; WOLFF, J. O. Social but not genetic monogamy is associated with greater breeding success in prairie voles. **Animal Behaviour**, v. 75, n. 3, p. 1143–1154, 2008.

OPIE, C.; ATKINSON, Q. D.; DUNBAR, R. I. M.; SHULTZ, S. Male infanticide leads to social monogamy in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 33, p. 13328–13332, 13 ago. 2013.

PARANHOS, K. M. **Estimativas populacionais para espécies raras: o mico-leão-preto**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, p. 53. 2006.

PARROTT, M. L.; WARD, S. J.; TEMPLE-SMITH, P. D. Olfactory cues, genetic relatedness and female mate choice in the agile antechinus (*Antechinus agilis*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, n. 7, p. 1075–1079, 2007.

PASSOS, F. C.; ALHO, C. J. R. Importância de diferentes microhabitats no comportamento de forrageio por presas do mico-leão-preto, *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan) (Mammalia, Callitrichidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. suppl 1, p. 335–342, jul. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-81752001000500029&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752001000500029&lng=pt&tlng=pt)>.

PAULA, V. R. **Comportamento de dispersão dos micos-leões-dourados (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus, 1766) reintroduzidos e seus descendentes nascidos em vida livre** (Academic Dissertation). Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2013.

PEDERSEN, J. S.; BOOMSMA, J. J. Genetic analysis of colony structure in polydomous and polygynous ant populations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 66, n. 1, p. 115–144, 1999.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; VALLADARES-PADUA, C.; BURRELL, A. S.; DI FIORE, A.; SATKOSKI, J.; VAN COEVERDEN DE GROOT, P. J.; BOAG, P. T.; MELNICK, D. J. Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 2, p. 198–201, 4 mar. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-8286.2005.00875.x>>.

PRICE, E. C.; MCGREW, W. C. Departures from monogamy in colonies of captive cotton-top tamarins. **Folia Primatologica**, v. 57, n. 1, p. 16–27, 1991.

PUSEY, A.; WOLF, M. Inbreeding avoidance in animals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 5, p. 201–206, 1 maio 1996. . Acesso em: 7 maio. 2023.

- REZENDE, G. C.; SOBRAL-SOUZA, T.; CULOT, L. Integrating climate and landscape models to prioritize areas and conservation strategies for an endangered arboreal primate. **American Journal of Primatology**, v. 82, n. 12, p. 1–9, 2020.
- RODA, S. A.; PONTES, A. R. M. Polygyny and Infanticide in Common Marmosets in a Fragment of the Atlantic Forest of Brazil. **Folia Primatologica**, v. 69, n. 6, p. 372–376, 1998. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/21655>>.
- RYLANDS, A. B. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in callitrichidae. **American Journal of Primatology**, v. 38, n. 1, p. 5–18, 1996.
- SALTZMAN, W.; SCHULTZ-DARKEN, N. J.; ABBOTT, D. H. Behavioural and endocrine predictors of dominance and tolerance in female common marmosets, *Callithrix jacchus*. **Animal Behaviour**, v. 51, n. 3, p. 657–674, mar. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003347296900706>>.
- SCHÜLKE, O.; KAPPELER, P. M.; ZISCHLER, H. Small testes size despite high extra-pair paternity in the pair-living nocturnal primate *Phaner furcifer*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 55, n. 3, p. 293–301, jan. 2004.
- SETCHELL, J. M.; CHARPENTIER, M. J. E.; ABBOTT, K. M.; WICKINGS, E. J.; KNAPP, L. A. Opposites attract: MHC-associated mate choice in a polygynous primate. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, n. 1, p. 136–148, 2010.
- SIMMONS, L. M. Female choice and the relatedness of mates in the field cricket, *Gryllus bimaculatus*. **Animal Behaviour**, v. 41, n. 3, p. 493–501, 1991.
- TREGENZA, T.; WEDELL, N. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 8, p. 1013–1027, 2000.
- VALLADARES-PADUA, C. **The ecology, behavior and conservation of the black lion tamarins (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan, 1823)**. 1993. 1993.
- VAN SCHAIK, C. P.; KAPPELER, P. M. The evolution of social monogamy in primates. *Em: Monogamy: Mating Strategies and Partnerships in Birds, Humans and Other Mammals*. [s.l.] American Association for the Advancement of Science, 2013. p. 59–80.
- WANG, J. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 1203–1215, 2002.
- WORMELL, D.; MARQUES, M. C. International Studbook for the Black Lion Tamarin, *Leontopithecus chrysopygus*, 2020. n. June, 2020.
- YIN, B.; YANG, S.; WEI, W.; ZHANG, Y. Male reproductive success in plateau pikas (*Ochotona curzoniae*): A microsatellite analysis. **Mammalian Biology**, v. 74, n. 5, p. 344–350, 2009.

## 5. CONCLUSÕES

Os objetivos propostos no presente trabalho foram alcançados conforme, as principais conclusões apresentadas abaixo:

**Objetivo 1.** Caracterizar a diversidade e estrutura genética de distintas populações do mico-leão-preto, provenientes do Alto e do Pontal do Paranapanema, através de análises de *loci* de microssatélites e da região Dloop do DNA mitocondrial.

- As populações remanescentes de MLP apresentaram no geral baixos níveis de diversidade genética e padrões de estruturação genética, com ambos os marcadores utilizados
- As regiões do Pontal e do Alto Paranapanema evidenciaram sinais de diferenciação genética histórica, embora haplótipos comuns a ambas as regiões tenham sido encontrados, ainda que em fragmentos desconectados e geograficamente distantes, indicando a existência de haplótipos ancestrais e/ou uma possível conectividade;
- O maior grau de estruturação, acessado com marcadores de microssatélites, sugere os efeitos da fragmentação do habitat promovendo um aumento na diferenciação genética das populações, possivelmente, associada à interrupção ou diminuição na dispersão e fluxo gênico.

**Objetivo 2.** Identificar padrões demográficos populacionais relacionados a eventos históricos que expliquem o padrão de diversificação observado nas populações contemporâneas.

- Foi evidenciada uma redução demográfica populacional, que se iniciou há cerca de cinco mil anos, período coincidente com alterações climáticas e paisagísticas ocorridas no Holoceno.

**Objetivo 3.** Realizar simulações para o futuro, visando prever a viabilidade de populações remanescentes, considerando a retenção da diversidade genética nos próximos 100 anos.

- Com exceção do fragmento do Morro do Diabo, nenhum outro fragmento analisado conseguirá reter 90% da diversidade genética ao longo de 100 anos, comprometendo assim a viabilidade das populações em curto e médio prazo.

**Objetivo 4.** Estabelecer as relações de parentesco dentro dos grupos familiares e caracterizar a estrutura matrilinear, combinando dados mitocondriais e de microssatélites para inferir sobre aspectos relacionados ao sistema sócio-reprodutivo da espécie;

- Foram encontradas evidências de dispersão de ambos os sexos e de poligamia, demonstrando a flexibilidade no sistema social da espécie; , entretanto não foram encontradas evidências de que a escolha de parceiros seja influenciada pelo parentesco genético entre o casal reprodutor.

Ao atingir estes objetivos, conseguimos responder às seguintes hipóteses de trabalho:

**Hipótese I.** As populações remanescentes de *L. chrysopygus* evidenciam sinais de diferenciação genética entre as regiões do Alto e do Pontal do Paranapanema (SP)?

- Sim, entretanto, não há um padrão explícito de estruturação do Alto e Baixo e sim dentro do Alto e dentro do baixo, mostrando que o grau de desconectividade destes fragmentos aumenta a diferenciação populacional

**Hipótese II.** A espécie *L. chrysopygus* apresenta um sistema sócio-reprodutivo diversificado, no qual podem ocorrer a poliginia e/ou poliandria?

- Sim, observamos indícios de poligamia, tanto de poliandria, quanto de poliginia, ou seja, uma fêmea se reproduzindo com mais de um macho, e um macho se reproduzindo com mais de uma fêmea, respectivamente.

**Hipótese III.** A diversidade genética de populações que ocupam fragmentos maiores tende a ser maior que a de populações restritas a fragmentos menores?

- Sim. Foi verificada correlação positiva e significativa entre a heterozigosidade observada e a área do fragmento, ou seja, populações de fragmentos maiores tendem a ter maior diversidade; além disso, foi verificada correlação negativa e significativa entre o coeficiente de endogamia e a área do fragmento; ou seja, áreas menores tendem a ter populações mais endogâmicas.

**Hipótese IV.** As populações remanescentes de *L. chrysopygus* com tamanhos reduzidos possuem capacidade de retenção de diversidade genética que assegure sua viabilidade nos próximos 100 anos?

- Não, com exceção da população de Morro do Diabo, nenhuma outra população remanescente de MLPs estudada apresenta viabilidade em termos de retenção da diversidade genética e manutenção do potencial evolutivo da espécie para persistir nos próximos 100 anos.

## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-GARCÉS, Y. A.; VALENCIA, L. M.; FIORE, A. DI; ACEVEDO-CENDALES, L. D.; ROJAS, W.; BOCK, B.; OSPINA, O.; ÁLVAREZ, J.; SOTO-CALDERÓN, I. D. Current and historical genetic structure of the white-footed tamarin (*Saguinus leucopus*). Em: NARDELLI, M.; TÚNEZ, J. I. (Eds.). **Molecular Ecology and Conservation Genetics of Neotropical Mammals**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 171–197.
- ARIF, I. A.; KHAN, H. A.; BAHKALI, A. H.; HOMAIDAN, A. A. AL; FARHAN, A. H. AL; SADOON, M. AL; SHOBRAK, M. DNA marker technology for wildlife conservation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 219–225, jul. 2011.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Boston, MA: Springer US, 1994. v. 32
- AYALA-BURBANO, P. A.; CALDANO, L.; JUNIOR, P. M. G.; PISSINATTI, A.; MARQUES, M. C.; WORMELL, D.; DOMINGUES DE FREITAS, P. Genetic assessment for the endangered black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823), Callitrichidae, Primates. **American Journal of Primatology**, 2017.
- BAKER, A.; BALES, K. L.; DIETZ, J. M. Mating system and group dynamics in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). Em: KLEIMAN, DEVRA G; RYLANDS, A. B. (Ed.). **Lion Tamarins: Biology and Conservation**. 1. ed. Smithsonian Institution Scholarly Press, 2002.
- BAKER, A. J.; BALES, K.; DIETZ, J. M. Sistemas de acasalamento e dinâmicas de grupo em micos-leões. **Micos Leões: Biologia e Conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 2008.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1 jan. 1999.
- BEAUMONT, M. A.; NICHOLS, R. A. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 263, n. 1377, p. 1619–1626, 22 dez. 1996.
- BELAY, G.; MORI, A. Intraspecific phylogeographic mitochondrial DNA (D-loop) variation of Gelada baboon, *Theropithecus gelada*, in Ethiopia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 7, p. 554–561, 2006.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., & DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>
- BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLOS Computational Biology**, v. 15, n. 4, p. e1006650, 8 abr. 2019.
- CARVALHO, C. T. DE; CARVALHO, C. F. DE. A organização social dos saús-pretos, (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan), na reserva em Teodoro Sampaio, São Paulo (Primates Callitrichidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 6, n. 4, p. 707–717, 1989.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Os sagüis do gênero *Leontopithecus* Lesson, 1840 (Callithricidae - Primates)**. [s.l.] Tese (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976.

CORANDER, J.; MARTTINEN, P.; SIRÉN, J.; TANG, J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2008.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001–2014, 1 dez. 1996.

CULOT, L. et al. New Records Reconfirmed Sites and Proposals for the Conservation of Black Lion Tamarin ( *Leontopithecus chrysopygus* ) in the Middle and Upper. **Neotropical Primates**, v. 22, n. 1, p. 32–39, 2015.

DIETZ, J. M.; BAKER, A. J. Polygyny and female reproductive success in golden lion tamarins, *Leontopithecus rosalia*. **Animal Behaviour**, v. 46, n. 6, p. 1067–1078, 1 dez. 1993.

DOLOTOVSKAYA, S.; ROOS, C.; HEYMANN, E. W. Genetic monogamy and mate choice in a pair-living primate. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O. G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 5, p. 1185–1192, 2005.

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

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

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–20, jul. 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 117693430500100, 9 jan. 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

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

FORERO-SÁNCHEZ, F. **Análises de Viabilidade Populacional no Planejamento para a Conservação do Mico-Leão-Preto**. Dissertação (Mestrado em Ecologia)—Nazaré Paulista: Instituto de Pesquisas Ecológicas - IPÊ, 2020.

FRANCIS, R. M. pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 1, p. 27–32, 1 jan. 2017.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.

FRASIER, T. R. STORM: software for testing hypotheses of relatedness and mating patterns. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 6, p. 1263–1266, 1 nov. 2008.

FREITAS, P. D. DE; MENDEZ, F. L.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; GALETTI, P. M.; COUTINHO, L. L.; PISSINATTI, A.; BUSTAMANTE, C. D. Next-Generation Sequencing of the Complete Mitochondrial Genome of the Endangered Species Black Lion Tamarin *Leontopithecus chrysopygus* (Primates) and Mitogenomic Phylogeny Focusing on the Callitrichidae Family. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 8, n. 6, p. 1985–1991, 1 jun. 2018.

FU, Y.-X. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1 out. 1997.

GALBUSERA, P. H. A.; GILLEMOT, S. Polymorphic microsatellite markers for the endangered golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae). **Conservation Genetics**, v. 9, n. 3, p. 731–733, 7 jun. 2008.

GARCIA, F. DE O.; PRADO, B. H. S. DO; SOUZA, E. DE J.; MACHADO, V.; ALBINO, C. V.; ROCHA, V. J. Nest box use and polygyny in an endangered primate species: The black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Oecologia Australis**, v. 25, n. 1, p. 166–173, 2021.

GARZA, J. C.; WILLIAMSON, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 305–318, 1 fev. 2001.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 6, p. 485–486, nov. 1995.

HARRIS, R. A.; TARDIF, S. D.; VINAR, T.; WILDMAN, D. E.; RUTHERFORD, J. N.; ROGERS, J.; WORLEY, K. C.; AAGAARD, K. M. Evolutionary genetics and implications of small size and twinning in callitrichine primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. 1467–1472, 2014.

HAYAISHI, S.; KAWAMOTO, Y. Low genetic diversity and biased distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Japanese macaque (*Macaca fuscata yakui*) on Yakushima Island. **Primates**, v. 47, n. 2, p. 158–164, abr. 2006.

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

HUCK, M.; ROOS, C.; HEYMANN, E. W. Spatio-genetic population structure in mustached tamarins, *Saguinus mystax*. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 132, n. 4, p. 576–583, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVAVEIS, Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa Nº 5 De 13 De Maio De 2021. Dispõe sobre as diretrizes, prazos e os procedimentos para a operacionalização dos Centros de Triagem de Animais Silvestres (Cetas) do Ibama, bem como para a destinação de animais silvestres apreendidos, resgatados ou entregues espontaneamente a esses centro, 2021. Disponível em:

[https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao\\_normativa/2021/I\\_N\\_ibama\\_05\\_2021\\_diretrizes\\_operacionalizacao\\_cetas.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2021/I_N_ibama_05_2021_diretrizes_operacionalizacao_cetas.pdf).

INSTITUTO SOS MATA ATLÂNTICA. **Instituto SOS Mata Atlântica**. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/noticias/desmatamento-da-mata-atlantica-cresce-em-dez-estados/>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

JAVAROTTI, N. B. **Estrutura genética e relações de parentesco no mico leão preto (*Leontopithecus chrysopygus*) inferidas por marcadores de microssatélites**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/14322>>. Acesso em: 4 abr. 2023

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, 14 fev. 2007.

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

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

KUO, C.-H.; JANZEN, F. J. Bottlesim: a bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 4, p. 669–673, out. 2003.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

LEITE, D. A.; KEUROGHLIAN, A.; RUFO, D. A.; MIYAKI, C. Y.; BIONDO, C. Genetic evidence of promiscuity in a mammal without apparent sexual dimorphism, the white-lipped peccary (*Tayassu pecari*). **Mammalian Biology**, v. 92, n. 1, p. 111–114, 2018.

LI, C. C.; WEEKS, B. E.; CHAKRAVARTI, A. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. **Human Heredity**, v. 43, n. 1, p. 45–52, 1 jan. 1993.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 1 jun. 2009.

LINO, A.; FONSECA, C.; ROJAS, D.; FISCHER, E.; RAMOS PEREIRA, M. J. A meta-analysis of the effects of habitat loss and fragmentation on genetic diversity in mammals. **Mammalian Biology**, v. 94, p. 69–76, 2019.

LIS, J. T. [42] Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. Em: **Methods in enzymology**. [s.l.] Elsevier, 1980. v. 65p. 347–353.

MAMEDE-COSTA, A. C.; GOBBI, N. The black lion tamarin *Leontopithecus chrysopygus* - Its conservation and management. **Oryx**, v. 32, n. 4, p. 295–300, 1998.

MARSDEN, P. D. A Primatologia no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 202–202, set. 1985.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular ecology**, v. 7, n. 5, p. 639–655, 1998.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Portaria MMA Nº 148, de 7 de junho de 2022. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P\\_mma\\_148\\_2022\\_altera\\_anexos\\_P\\_mma\\_443\\_444\\_445\\_2014\\_atualiza\\_especies\\_ameacadas\\_extinc\\_ao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2020/P_mma_148_2022_altera_anexos_P_mma_443_444_445_2014_atualiza_especies_ameacadas_extinc_ao.pdf)

MODENA, P. Z. **Estrutura matrilinear de populações ex situ e in situ do mico leão preto (*Leontopithecus chrysopygus* Mikan, 1823) e insights para seu manejo.** 2021. Dissertação (Mestrado em Conservação da Fauna) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/15000>>. Acesso em: 4 abr. 2023

OLIVEIRA, D. P.; MARIONI, B.; FARIAS, I. P.; HRBEK, T. Genetic evidence for polygamy as a mating strategy in caiman crocodilus. **Journal of Heredity**, v. 105, n. 4, p. 485–492, 1 jul. 2014.

PASSOS, F. C.; LUDWIG, G.; KNOGGE, C.; OLIVEIRA, L. C. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Leontopithecus chrysopygus* (Mikan, 1823) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. [http://www.icmbio.gov.br/portal\\_antigo/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-deconservacao/7211-mamiferos-leontopithecus-chrysopygus-mico-leao-preto.html](http://www.icmbio.gov.br/portal_antigo/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-deconservacao/7211-mamiferos-leontopithecus-chrysopygus-mico-leao-preto.html) Oficina de Avaliação do Estado de Conservação de Primatas Brasileiros. Data de realização: 30 de julho a 03 de agosto de 2012. Local: Iperó, SP.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. R. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288–295, mar. 2006.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; VALLADARES-PADUA, C.; BURRELL, A. S.; FIORE, A. DI; SATKOSKI, J.; COEVERDEN DE GROOT, P. J. VAN; BOAG, P. T.; MELNICK, D. J. Dinucleotide microsatellite primers designed for a critically endangered primate, the black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 2, p. 198–201, 4 mar. 2005.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Editora UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná, Brasil, p. 343–380, 2003.

PEW, J.; MUIR, P. H.; WANG, J.; FRASIER, T. R. related: An R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 3, p. 557–561, 2015.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502–503, 1999.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 1 jun. 2000.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 1 set. 2018.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. LogCombiner v1. 8.2. **LogCombinerv1**, v. 8, p. 656, 2015.

RAMESH, P.; MALLIKARJUNA, G.; SAMEENA, S.; KUMAR, A.; GURULAKSHMI, K.; REDDY, B. V.; REDDY, P. C. O.; SEKHAR, A. C. Advancements in molecular marker technologies and their applications in diversity studies. **Journal of Biosciences**, v. 45, n. 1, p. 123, 25 dez. 2020.

REZENDE, G. C. **Mico-leão-preto: A história de sucesso na conservação de uma espécie ameaçada**. 1 ed ed. São Paulo: Matrix Editora, 2014.

REZENDE, G. C.; KNOGGE, C.; PASSOS, F.; LUDWIG, G.; OLIVEIRA, L. C.; JERUSALINSKY, L.; MITTERMEIER, R. A. *Leontopithecus chrysopygus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2020**, v. 8235, p. e.T11505A17935400, 2020.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, jun. 2009.

RIBEIRO, M. C.; MARTENSEN, A. C.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M.-J. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. Em: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Eds.). **Biodiversity Hotspots**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 405–434.

RODA, S. A.; PONTES, A. R. M. Polygyny and Infanticide in Common Marmosets in a Fragment of the Atlantic Forest of Brazil. **Folia Primatologica**, v. 69, n. 6, p. 372–376, 1998.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 552–569, 1 maio 1992.

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.

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

SOARES, P.; ERMINI, L.; THOMSON, N.; MORMINA, M.; RITO, T.; RÖHL, A.; SALAS, A.; OPPENHEIMER, S.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. B. Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock. **The American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 6, p. 740–759, 12 jun. 2009.

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

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–595, 1 nov. 1989.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

VALLADARES-PADUA, C. **The ecology, behavior and conservation of the black lion tamarins (*Leontopithecus chrysopygus*, Mikan, 1823)**. [s.l: s.n.].

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

VELTRONI, Y. **Estrutura genética matrilinear e relações de parentesco no mico leão preto, *Leontopithecus chrysopygus* (Primates) uma espécie ameaçada que apresenta sistema de reprodução cooperativa**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2018.

WANG, W.; ZHENG, Y.; ZHAO, J.; YAO, M. Low genetic diversity in a critically endangered primate: Shallow evolutionary history or recent population bottleneck? **BMC Evolutionary Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 26 jun. 2019.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela SI.2.** Valores de diversidade genética baseadas em dados de microssatélites. N: número da amostra; Na: número de alelos; Ne: número efetivo de alelos, Ra: riqueza alélica; Ho: heterozigosidade observada, He: heterozigosidade esperada, FIS: coeficiente de endogamia; PDH: valores de p para o déficit de heterozigotos para o coeficiente de endogamia FIS; PEH: valores de p para o excesso de heterozigotos para o coeficiente de endogamia FIS, \*Estatisticamente valores significativos

<b>Pontal do Paranapanema</b>									
<b>Fazenda Santa Maria - SM</b>									
<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Ra</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>P<sub>DH</sub></b>	<b>P<sub>EH</sub></b>
Lchu6	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Lchu7	9	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Lchu8	9	2,000	1,800	0,444	0,444	1,998	0,059	0,6935	0,8455
Leon2	7	2,000	1,849	0,714	0,459	2,000	-0,5	1,0000	0,3435
Leon3	9	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon11	9	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1,000	1,0000	0,0130
Leon15	9	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon21	9	2,000	1,976	0,667	0,494	2,000	-0,297	0,9513	0,4416
Leon30	9	2,000	1,976	0,889	0,494	2,000	-0,778	1,0000	0,0481
Leon31	9	2,000	1,117	0,111	0,105	1,556	0,000	1,0000	1,0000
Leon35	8	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1,000	1,0000	0,0208
<b>Média</b>		<b>1,636</b>	<b>1,520</b>	<b>0,439</b>	<b>0,272</b>	<b>1,596</b>	<b>-0,570</b>	<b>1,0000</b>	<b>0,0006*</b>
<b>Ponte Branca - PB</b>									
<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Ra</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>P<sub>DH</sub></b>	<b>P<sub>EH</sub></b>
Lchu6	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Lchu7	6	2,000	1,385	0,333	0,278	1,985	-0,111	1,0000	0,9058
Lchu8	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon2	6	3,000	2,323	0,833	0,569	2,833	-0,389	0,9260	0,2403
Leon3	6	2,000	1,180	0,167	0,153	1,833	0	1,0000	1,0000
Leon11	6	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1	1,0000	0,0695
Leon15	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon21	6	2,000	1,180	0,167	0,153	1,833	0	1,0000	1,0000
Leon30	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon31	6	2,000	2,000	0,667	0,500	2,000	-0,250	0,9260	0,5851
Leon35	5	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1,000	1,0000	0,1299
<b>Média</b>		<b>1,727</b>	<b>1,461</b>	<b>0,379</b>	<b>0,241</b>	<b>1,680</b>	<b>-0,506</b>	<b>0,9987</b>	<b>0,0039</b>
<b>Parque Estadual do Morro do Diabo - MD</b>									
<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Ra</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>P<sub>DH</sub></b>	<b>P<sub>EH</sub></b>
Lchu6	5	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1	1,0000	0,1266
Lchu7	11	3,000	2,689	0,545	0,628	2,931	0,178	0,2929	0,8805
Lchu8	9	2,000	1,976	0,889	0,494	2,000	-0,778	1,0000	0,0481
Leon2	11	3,000	2,659	0,455	0,624	2,958	0,315	0,1221	0,9701
Leon3	8	3,000	1,910	0,625	0,477	2,839	-0,250	1,0000	0,4266
Leon11	9	3,000	2,418	0,889	0,586	2,925	-0,471	1,0000	0,0565
Leon15	11	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon21	7	3,000	1,815	0,429	0,449	2,868	0,122	0,4584	0,8318
Leon30	7	2,000	1,690	0,571	0,408	1,999	-0,333	1,0000	0,5364
Leon31	11	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon35	11	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
<b>Média</b>		<b>2,182</b>	<b>1,832</b>	<b>0,491</b>	<b>0,379</b>	<b>2,138</b>	<b>-0,243</b>	<b>0,9903</b>	<b>0,0104</b>
<b>Alto Paranapanema</b>									
<b>Floresta Nacional de Capão Bonito - CB</b>									
<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Ra</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>P<sub>DH</sub></b>	<b>P<sub>EH</sub></b>
Lchu6	10	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1	1,0000	0,0045
Lchu7	10	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1	1,0000	0,0052
Lchu8	10	2,000	1,471	0,400	0,320	1,957	-0,2	1,0000	0,7032

Leon2	10	2,000	1,923	0,800	0,480	2,000	-0,636	1,0000	0,1136
Leon3	10	2,000	1,923	0,800	0,480	2,000	-0,636	1,0000	0,0831
Leon11	10	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1	1,0000	0,0065
Leon15	10	2,000	1,923	0,400	0,480	2,000	0,217	0,5013	0,9195
Leon21	10	3,000	2,381	1,000	0,580	2,763	-0,698	1,0000	0,0045
Leon30	10	2,000	2,000	1,000	0,500	2,000	-1	1,0000	0,0071
Leon31	10	3,000	2,062	0,800	0,515	2,498	-0,516	1,0000	0,0831
Leon35	10	2,000	1,600	0,500	0,375	1,984	-0,286	1,0000	0,5344
<b>Média</b>		<b>2,182</b>	<b>1,935</b>	<b>0,791</b>	<b>0,475</b>	<b>2,109</b>	<b>-0,633</b>	<b>1,0000</b>	<b>0,0006*</b>

**Angatuba - An**

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	Ra	F <sub>IS</sub>	P <sub>DH</sub>	P <sub>EH</sub>
Lchu6	6	2,000	1,600	0,167	0,375	2,000	0,615	0,2714	1,0000
Lchu7	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Lchu8	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon2	5	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon3	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon11	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon15	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon21	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon30	5	2,000	1,471	0,400	0,320	2,000	-0,143	1,0000	0,8740
Leon31	6	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon35	5	2,000	1,923	0,400	0,480	2,000	0,273	0,6305	0,9474
<b>Média</b>		<b>1,273</b>	<b>1,181</b>	<b>0,088</b>	<b>0,107</b>	<b>1,273</b>	<b>0,275</b>	<b>0,2734</b>	<b>0,8740</b>

**Buri - Bu**

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	Ra	F <sub>IS</sub>	P <sub>DH</sub>	P <sub>EH</sub>
Lchu6	23	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Lchu7	22	3,000	2,118	0,409	0,528	2,640	0,247	0,1136	0,9532
Lchu8	23	3,000	2,095	0,522	0,523	2,693	0,024	0,5169	0,6799
Leon2	21	2,000	1,960	0,571	0,490	1,999	-0,143	0,8584	0,4526
Leon3	22	3,000	2,463	0,727	0,594	2,742	-0,202	0,9312	0,1591
Leon11	23	3,000	2,438	0,957	0,590	2,785	-0,608	1,0000	0,0006
Leon15	21	2,000	1,265	0,238	0,210	1,763	-0,111	1,0000	0,7656
Leon21	21	3,000	1,463	0,286	0,316	2,113	0,121	0,4662	0,8825
Leon30	19	3,000	2,168	0,579	0,539	2,705	-0,048	0,6987	0,5312
Leon31	22	4,000	1,988	0,545	0,497	3,066	-0,075	0,8006	0,4318
Leon35	20	3,000	2,100	0,250	0,524	2,676	0,541	0,0026	1,0000
<b>Média</b>		<b>2,727</b>	<b>1,914</b>	<b>0,462</b>	<b>0,437</b>	<b>2,380</b>	<b>-0,033</b>	<b>0,7006</b>	<b>0,3000</b>

**Guareí - Gu**

Locus	N	Na	Ne	Ho	He	Ra	F <sub>IS</sub>	P <sub>DH</sub>	P <sub>EH</sub>
Lchu6	18	2,000	1,906	0,667	0,475	1,997	-0,378	0,9857	0,1396
Lchu7	18	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Lchu8	20	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon2	19	2,000	1,054	0,053	0,051	1,263	0,000	1,0000	1,0000
Leon3	18	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon11	18	2,000	1,314	0,278	0,239	1,826	-0,133	1,0000	0,7377
Leon15	19	2,000	1,111	0,105	0,100	1,462	-0,029	1,0000	0,9766
Leon21	20	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon30	18	3,000	1,476	0,389	0,323	2,160	-0,178	1,0000	0,4701
Leon31	18	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	-	NA	NA
Leon35	18	4,000	3,560	0,333	0,719	3,729	0,557	0,0013	1,0000
<b>Média</b>		<b>1,818</b>	<b>1,402</b>	<b>0,166</b>	<b>0,173</b>	<b>1,585</b>	<b>0,072</b>	<b>0,2620</b>	<b>0,8292</b>