

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
LUCAS ARAUJO FREITAS

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
MICO-LEÃO-DOURADO (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766)

RIO DE JANEIRO – RJ

2012

LUCAS ARAUJO FREITAS

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
MICO-LEÃO-DOURADO (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Orientador: Dr. Carlos Eduardo Guerra Schrago

Co-orientadora: Dr^a. Adriana Daudt Grativol

Rio de Janeiro
2012

Freitas, Lucas Araujo

Diversidade e estrutura genética de populações de Mico-Leão-Dourado (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766) / Lucas Araújo Freitas. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biologia, 2012.

xv, 45 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Carlos Eduardo Guerra Schrago e Adriana Daudt Grativol. Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Instituto de Biologia, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2012.

Referências bibliográficas: f. 52 - 56

1. *Leontopithecus* - genética. 2. Variação - genética. 3. Genótipo. 4. Repetições de Microssatélites. 5. Habitat. 6. Manejo de Espécimes. 7. Extinção Biológica. 8. Genética Populacional. 9. Pesquisa em Genética – história. 10. Primatas. 11. Animais. 12. Biologia - Tese. I. Schrago, Carlos Eduardo Guerra. II. Grativol, Adriana Daudt. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, FM, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. IV. Título.

LUCAS ARAUJO FREITAS

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
MICO-LEÃO-DOURADO (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Aprovada em 13 de agosto de 2012.

Dr. Carlos Eduardo Guerra Schrago, doutor em Ciências (Genética) - UFRJ

Dr^a. Adriana Daudt Grativol, doutora em Biociências e Biotecnologia - UENF

Dr. Carlos Eduardo de Viveiros Grelle, doutor em Ciências (Zoologia) - UFRJ

Dr. Carlos Ramón Ruiz-Miranda, doutor em *Animal Behaviour* - UENF

Dr^a. Leila Maria Pessôa, doutora em Ciências (Zoologia) - UFRJ

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Carlos Eduardo Guerra Schrago, primeiramente por me aceitar como aluno. Além disso, na minha opinião, ele é um exemplo para todos do mundo acadêmico e uma pessoa que admiro bastante. Aprendi muito com as suas aulas e com as conversas. Quem sabe chego lá quando crescer?

A minha co-orientadora, Adriana Daudt Grativol, pela confiança depositada para prosseguir com o projeto do mico-leão-dourado.

Ao professor Carlos Ramón Ruiz-Miranda, pelas poucas, porém muito válidas discussões sobre o andamento do projeto.

Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, por ter me dado o privilégio de estudar uma das ideias mais poderosas já pensadas até o dia de hoje.

Aos professores da banca, Carlos Eduardo de Viveiros Grelle, Leila Maria Pessôa e Carlos Ramón Ruiz-Miranda, por aceitarem serem membros da banca e pela contribuição que, certamente, será dada ao final do trabalho.

Aos suplentes, Paulo Sérgio D'Andrea e Wilson Jose Eduardo Moreira da Costa, por aceitarem o convite.

Ao Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela estrutura laboratorial que permitiu realizar a maior parte desse trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo uso do sequenciador automático ABI 3500.

A Associação Mico-Leão-Dourado, FAPERJ, CNPq, FNMA pelo apoio financeiro.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Às pessoas, tanto do Laboratório de Ciências Ambientais da UENF, como do Laboratório de Biologia Evolutiva Teórica e Aplicada da UFRJ que me ajudaram durante o projeto.

Aos meus amigos, que sempre quebraram vários galhos e me ajudaram sempre que precisei. Não vou citar nomes, pois acabarei esquecendo alguém.

À minha namorada, Gabriela Calegario, por me aguentar durante todos esses anos e nunca ter desistido de mim.

À minha família, que sempre apoiou as minhas decisões e pela certeza que tenho de poder contar com eles para qualquer coisa.

RESUMO

Freitas, Lucas Araujo. **Diversidade e Estrutura Genética de populações de Mico-Leão-Dourado (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766)**. Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Biologia Evolutiva) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766) é um primata endêmico da Floresta Atlântica com distribuição original restrita a zona costeira do estado do Rio de Janeiro entre 22°S e 23°S com ocorrência central na bacia do Rio São João. Devido a destruição do seu habitat, sua população selvagem foi estimada entre 200 e 600 indivíduos nas décadas de 1960 e 1970 com os indivíduos distribuídos em apenas sete dos 24 municípios da sua abrangência original. Atualmente, com o apoio de ações conservacionistas, a quantidade de indivíduos é estimada em 1.500 indivíduos em 12.000ha de florestas fragmentadas. Dentro destas ações, ressalta-se a reintrodução de espécimes oriundos de zoológicos, que além de contribuir com o aumento do número de indivíduos, incrementaram a diversidade genética da população na natureza. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de uma população selvagem e uma reintroduzida e verificar a “efetividade” da reintrodução do ponto de vista genético. Foram utilizados nove marcadores de microssatélite e 78 indivíduos dessas populações junto com indivíduos do litoral e do Zoológico de Niterói, cuja origem é desconhecida. A H_o e H_e mais altas foram encontradas na população reintroduzida (0,28 e 0,42, respectivamente) juntamente com o maior número médio de alelos por locus (4,11). Esse resultado é esperado ao associar esses números com a história dessa população, composta por indivíduos de zoológicos, pois animais de zoológicos geralmente possui uma diversidade genética extremamente baixa. Sendo formada por indivíduos de diferentes zoológicos, é natural que haja uma baixa H_o em relação a H_e e um alto número de alelos, já que cada grupo, provavelmente, possuía diferentes alelos. A baixa diversidade genética da população selvagem indica um alto grau de isolamento geográfico. A análise de estrutura genética mostra um K (número de populações) ideal de 6, porém não é possível diferenciar os grupos dentro da população reintroduzida, sugerindo

que a população está com um alto grau de *admixture*. Do ponto de vista genético, essa *admixture* é um sinal positivo, já que problemas comuns em pequenas populações, como expressão de alelos deletérios, podem ser amenizados.

Palavras-chave: mico-leão-dourado, genética da conservação, reintrodução, estrutura genética, microssatélites.

ABSTRACT

Freitas, Lucas Araujo. **Genetic diversity and structure in Golden Lion Tamarin (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766) populations.** Rio de Janeiro, 2012. Master's thesis (Master of Science in Biodiversity and Evolutionary Biology) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The golden-lion-tamarin (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766) (GLT) is an endemic primate from Brazilian Atlantic forest with an original range limited to the coastal zone of Rio de Janeiro state between 22°S and 23°S, mainly in the Rio São João basin. Due its habitat deforestation and fragmentation, the natural GLT population was estimated between 200 and 600 individuals in the 1960 and 1970 decades and they were distributed in seven from 24 cities of their original distribution. Nowadays, with conservationist efforts, there are 1,500 individuals in 12,000ha of fragmented forests. Among these efforts, we can highlight the reintroduction of captive individuals that helped increasing the number of GLT in the forests and carried a new genetic charge to the wild population. So, the aim of this study was assess the genetic diversity from a wild and a reintroduced population and verify the efficiency of the reintroduction from the genetic point of view. There were utilized nine microsatellite markers and 78 individuals from these populations plus individuals from Rio de Janeiro state litoral and Niterói Zoo. The highest H_o and H_e were found in the reintroduced population (0.28 and 0.42, respectively) both with the higher average number of alleles per locus (4.11). This result is expected by associating these numbers with the history of this population that is composed by captive individuals from different zoos. Animals from zoo are characterized by low genetic variability, so is natural that this population has a lower H_o relative with the H_e and a high number of alleles. The low genetic diversity from the wild population can show an elevated degree of isolation and also, it can reflect the low number of individuals in this population. The genetic structure analysis shows a $K = 6$ (number of populations), however it is not possible identify the groups inside the reintroduced population, suggesting that this population has an elevated genetic admixture. From the genetic point of view,

this admixture is well regarded, since common problems in small populations, like the expression of deleterious recessive alleles can be reduced.

Keywords: Golden lion tamarin, conservation genetics, reintroduction, genetic structure, microsatellite.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mico-Leão-Dourado. Foto de Ltshears. Distribuída a sob a licença Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported. 16
- Figura 2.** Mapa com a distribuição original do Mico-Leão-Dourado (área rachurada). Fonte: (KIERULFF; RYLANDS, 2003). 17
- Figura 3.** Mapa das Unidades de Manejo da Metapopulação do Mico-Leão-Dourado. Neste estudo foram analisadas: Pirineus, Gaviões (população selvagem da Serra) e Imbaú (população reintroduzida); unidades de manejo dentro do círculo vermelho. Fonte: MICKELBERG (2011) 25
- Figura 4.** Mapa com a localização das fazendas com indivíduos reintroduzidos utilizadas neste estudo: (2) Santa Helena, (15) Afetiva, (16) Pacoty e (28) Imbaú. Fonte: OLIVEIRA; KIERULFF; *et al.* (2008). 26
- Figura 5.** Saída do programa Geneland para inferir o número correto de grupos das amostras. À esquerda, o resultado do melhor número de grupos a cada iteração e à direita os grupos organizados por histograma de densidade. 39
- Figura 6.** Saída do programa Structure com $K = 6$. Cada barra representa um indivíduo e a sua probabilidade de pertencer a um grupo genético. Cada cor representa um K . Grupo 1 = Serra, grupo 2 = Imbaú, grupo 3 = Litoral e grupo 4 = Zoo. Pode-se observar dois grupos na população da Serra, um grupo do Litoral e um grupo do Zoo. Entretanto não é possível observar dois grupos determinantes na população de Imbaú, indicando um alto grau de *admixture*. 40
- Figura 7.** Saída do programa Structure com $K = 4$. Cada barra representa um indivíduo e a sua probabilidade de pertencer a um grupo genético. Cada cor representa um K . Grupo 1 = Serra, grupo 2 = Imbaú, grupo 3 = Litoral e grupo 4 = Zoo. 40
- Figura 8.** Saída do Structure quando foi informado a localidade geográfica a priori. (A) $K = 4$, (B) $K = 6$. Cada barra representa a proporção de um indivíduo pertencer a determinado grupo genético. É possível observar uma melhor resolução com $K = 6$, resultado que mostra mais indivíduos migrantes e misturados. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da reação de PCR para todos os loci estudados.	30
Tabela 2. Continuação das características da reação de PCR para todos os loci estudados.	31
Tabela 3. Locus onde foram observados alelos nulos nas populações da Serra, Imbaú e quando todos os indivíduos foram colocados juntos.	35
Tabela 4. Valores de F_{ST} entre os quatro grupos estudadas.	36
Tabela 5. Medidas de diversidade de nove <i>loci</i> para as quatro populações estudadas. Número de indivíduos estudados por locus (N) e população, número de alelos (N_a), riqueza alélica (RA), heterozigosidade observada (H_o) e Heterozigosidade esperada (H_e).	37
Tabela 6. Frequência de alelos e distribuição de alelos privados e <i>loci</i> monomórficos. Em azul, alelos privados e em rosa, <i>loci</i> monomórficos para a população.	38
Tabela 7. Número médio de alelos, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada de trabalhos do gênero <i>Leontopithecus</i> , de espécies com populações pequenas e de espécies com populações reintroduzidas.	43
Tabela 8. Lista do indivíduos, localização e grupos. A primeira coluna representa a ordem na análise dos dados. Já o ID campo mostra o código do indivíduo no campo e no laboratório.	57

LISTA DE SIGLAS

MLD	Mico-Leão-Dourado
PCMLD	Programa de Conservação do Mico-Leão-Dourado
AMLD	Associação Mico-Leão-Dourado
PHVA	<i>Population and Habitat Viability Assessment</i>
APA	Área de Proteção Ambiental
RPPNs	Reservas Particulares do Patrimônio Natural
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
LCA	Laboratório de Ciências Ambientais
PCR	Reação de Cadeia Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
F	<i>Forward</i>
R	<i>Reverse</i>
F_{ST}	Índice de Fixação (<i>Fixation Index</i>)
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	mililitro
μ L	microlitro
M	mol
$^{\circ}$ C	graus centígrados
s	segundos
x g	gravidade
rpm	rotações por minuto
min	minuto
μ M	micromolar
sec	segundo
U	unidade
ha	hectare
$\ln P(D)$	Logaritmo natural da probabilidade do dado
ΔK	valor da segunda ordem de mudança da probabilidade de distribuição de cada K dividido pelo seu desvio padrão.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O MICO-LEÃO-DOURADO	16
1.2 METAPOPOPULAÇÃO	19
1.3 PROBLEMAS DA BAIXA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES PEQUENAS	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 ÁREA DE ESTUDO	24
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS	27
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA	27
3.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO	28
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3.5.1 Análises Básicas de Genética de Populações	32
3.5.2 Estrutura Genética	33
4 RESULTADOS	35
4.1 ANÁLISES BÁSICAS DE GENÉTICAS DE POPULAÇÕES	35
4.2 ESTRUTURA GENÉTICA	39
5 DISCUSSÃO	43
5.1 DIVERSIDADE GENÉTICA	43
5.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E ALELOS NULOS .	46
5.3 ESTRUTURA GENÉTICA	46
5.4 SUPORTE A ESTRATÉGIA DE METAPOPOPULAÇÃO	48
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO A – LISTA DOS INDIVÍDUOS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 O MICO-LEÃO-DOURADO

O mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*, Linnaeus 1766) (MLD) (Figura 1) é um primata endêmico da Floresta Atlântica de baixada. O gênero *Leontopithecus* é composto por mais três espécies: mico-leão-da-cara-dourada (*L. chrysomelas*, Kuhl 1820), mico-leão-da-cara-preta (*L. caissara*, Lorini & Persson 1990) e mico-leão-preto (*L. chrysopygus*, Mikan 1823). A área de ocorrência original do mico-leão-dourado é controversa, tendo alguns autores (Ruschi, Von Ihering) reportado a presença de micos-leões-dourados no estado do Espírito Santo (RYLANDS *et al.*, 2008). Entretanto, por não existir dados suficientes da ocorrência neste estado, o consenso é que a área de ocorrência original seja de fato as florestas da costa do estado do Rio de Janeiro em altitudes de até 300 m, incluído nessas florestas as restingas (PESSÔA *et al.*, 2010; RYLANDS *et al.*, 2008) (Figura 2).



Figura 1. Mico-Leão-Dourado. Foto de Ltshears. Distribuída a sob a licença Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported.

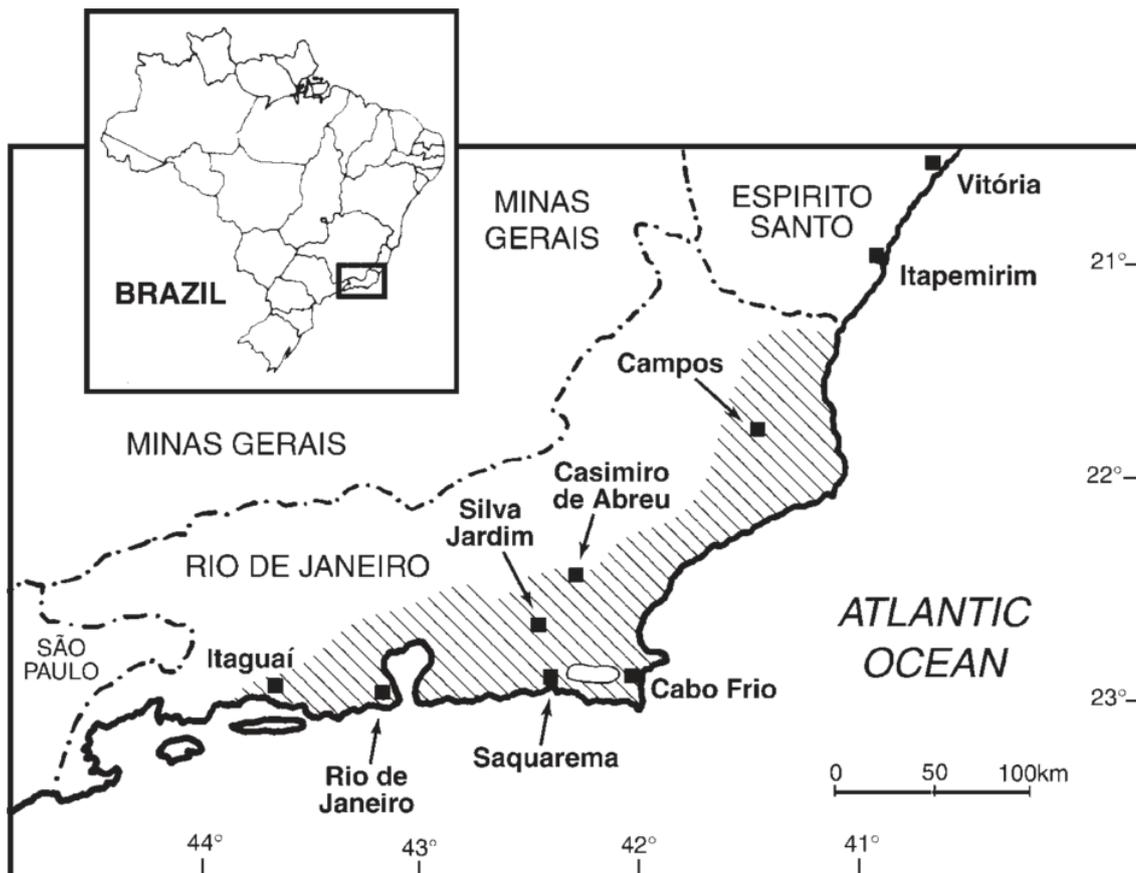


Figura 2. Mapa com a distribuição original do Mico-Leão-Dourado (área rachurada). Fonte: (KIERULFF; RYLANDS, 2003).

A primeira referência citando o MLD é do padre Antonio Pigafetta, cronista da viagem de Fernão de Magalhães, em dezembro de 1519. Existem relatos de MLD em pinturas (séculos XVI e XVII) e em trabalhos descritivos no século XVIII, incluindo a descrição de Linnaeus em 1766. Seu nome deriva de uma referência por M. J. Brisson deste mesmo século: “Le petit singe-lion”. No início do século XIX, durante a viagem do príncipe Maximilian zu Wied pelo sudeste brasileiro, a espécie foi considerada comum (RYLANDS *et al.*, 2008).

Durante a década de 1960, Coimbra-Filho alertou sobre o declínio da população de MLD na natureza. Nessa década, ele viajou por vários municípios do atual estado do Rio de Janeiro a procura de populações remanescentes e, além de verificar uma população extremamente baixa (entre 200-600 indivíduos), observou a destruição da Floresta Atlântica, habitat do MLD. Em 1972, foi realizada a conferência intitulada *Saving the Lion Marmoset*, momento-chave em que os poucos dados disponíveis foram revisados por 28

pesquisadores europeus, norte-americanos e brasileiros. Recomendações de longo prazo para pesquisa e conservação foram estabelecidas, tendo como coordenadora do manejo e pesquisa da população de cativeiro a pesquisadora Devra Kleiman, do Smithsonian National Zoo. Sob sua tutela, a população de cativeiro cresceu rapidamente de 70 para 500 indivíduos (BALLOU, *et al.*, 2008; KIERULFF *et al.*, 2012).

Desde a década de 1960 Coimbra-Filho estava selecionando áreas onde ainda existiam MLDs para a implantação de uma reserva. O melhor local encontrado foi no entorno do Rio Iguape, no Poço da Anta, onde duas áreas para o estabelecimento da reserva foram escolhidas. Porém, no ano seguinte (1970), as duas áreas foram destruídas. Assim, uma terceira área foi escolhida, no município de Silva Jardim, RJ. Entretanto, apenas em 1974, o decreto criando a Reserva Biológica de Poço das Antas foi assinado. Essa foi a primeira unidade de conservação desta categoria no Brasil (KIERULFF *et al.*, 2012; RYLANDS *et al.*, 2008).

Em 1983, teve início o Programa de Conservação do Mico-Leão-Dourado (PCMLD). Esse programa estabeleceu projetos de longo prazo sobre demografia e a sócio-ecologia dos MLDs. O PCMLD também estabeleceu um programa de reintrodução e um programa de educação ambiental comunitária (RYLANDS *et al.*, 2008). O programa de reintrodução de indivíduos de cativeiro começou em 1984 e durou até o ano 2000, tendo neste ano a população selvagem atingido um total de 359 micos vivos oriundos do programa (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). O principal objetivo do PCMLD é estabelecer 2.000 indivíduos em 25.000 ha de habitat protegido e conectado até o ano de 2025 (meta 2025) e assim garantir uma população com 95% de probabilidade de sobreviver durante 100 anos mantendo 98% de sua variabilidade genética (HOLST *et al.*, 2006). Em 1992 é criada a Associação Mico-Leão-Dourado (AMLD) com o intuito de gerir o PCMLD (RYLANDS *et al.*, 2008).

Durante o levantamento da população selvagem de MLD realizado por (KIERULFF; RYLANDS, 2003), foram observados grupos isolados em pequenos fragmentos, além de outras três populações principais. Juntamente

com o tamanho dos fragmentos e o péssimo estado de conservação desses fragmentos, a constatação de uma área de 2.400 ha sem ocorrência de MLD levou à decisão de translocação de seis grupos dos pequenos fragmentos para essa área, a Fazenda União em 1994. Em abril de 1998, a Fazenda União foi transformada em Reserva Biológica União (RYLANDS *et al.*, 2008).

1.2 METAPOPLAÇÃO

Em 2005, no último *Population and Habitat Viability Assessment* (PHVA) realizado para o gênero *Leontopithecus*, os principais problemas encontrados para o MLD foram a falta de uma paisagem interligada e a falta de um plano de manejo de metapopulação (HOLST *et al.*, 2006). Durante esse PHVA, os MLDs foram divididos em 18 populações, sendo seis dessas populações consideradas provavelmente viáveis em longo prazo, se conectadas. Posteriormente, a população da Serra foi dividida em duas: Serra dos Gaviões e Pirinéus (Figura 3). Todas as populações provavelmente viáveis estão inseridas dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) da bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, criada em 2002 (FERNANDES *et al.*, 2008).

O desmatamento, a construção de estradas e outras atividades antrópicas atuam “quebrando” uma área florestal em diversos fragmentos. Agora, a população que ocupava uma área florestal contígua, está dividida em várias populações menores, podendo ou não haver dispersão entre os fragmentos. Quando existe dispersão entre esses fragmentos, a população como um todo recebe o nome de metapopulação (HANSKI, 1998). Esse conceito é importante, pois caso essas populações fossem manejadas isoladamente, o risco de extinção seria maior, já que pequenas populações estão sujeitas a problemas característicos, como: endocruzamento e conseqüentemente a expressão de alelos deletérios, deriva genética e catástrofes ambientais. Quando as populações estão inseridas dentro do conceito de metapopulação, esses problemas são amenizados (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A Floresta Atlântica é um exemplo de mosaico florestal, sendo inclusa como um dos 34 *hotspots* de biodiversidade do planeta. Para ser considerado

um *hotspot*, a região necessita apresentar pelo menos 1.500 plantas vasculares endêmicas e ter perdido pelo menos 70% da sua cobertura original (MITTERMEIER *et al.*, 2005). Devido a esta devastação e a elevada fragmentação, com mais da metade dos seus remanescentes distribuídos em fragmentos menores que 50 ha (RIBEIRO *et al.*, 2009), o MLD tem hoje a sua distribuição dentro do contexto de metapopulação. As sete populações provavelmente viáveis estão distribuídas de maneira isolada uma da outra, entretanto para que a meta 2025 seja alcançada, desde 1996 estão implantados corredores florestais ligando algumas dessas populações e outros corredores estão em fase de implantação (FERNANDES *et al.*, 2008).

Além dos corredores florestais, é imprescindível citar o importante papel das Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPNs) dentro do plano de metapopulação do MLD, sendo tão importantes quanto os corredores florestais na função de proteger o habitat. Dos 25.000 ha necessários para se atingir a meta 2025, 8.700 ha correspondem as Reservas Biológicas Poço das Antas e União. O restante necessário está localizado dentro de propriedades particulares e para que a meta seja alcançada, a AMLD desde 1993 oferece a Linha de Incentivo à criação de RPPNs na bacia do Rio São João. Até o final de 2006, 15 RPPNs já haviam sido criadas dentro da bacia do Rio São João, totalizando mais de 2.400 ha de área florestal (FERNANDES *et al.*, 2008).

1.3 PROBLEMAS DA BAIXA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES PEQUENAS

Talvez a parte mais importante dentro do plano de manejo metapopulação do MLD seja a avaliação da diversidade genética dessas populações (GRATIVOL *et al.*, 2008). O resultado desta avaliação trará um suporte eficiente para o manejo, já que o MLD é uma espécie distribuída em pequenas populações e com um habitat extremamente fragmentado. Nessas condições, virtualmente qualquer espécie é susceptível a dois problemas que aumentam o risco de extinção: depressão endogâmica e perda de diversidade genética. A depressão endogâmica acarretará efeitos negativos na reprodução e sobrevivência, como: baixa sobrevivência da prole, baixa qualidade do

esperma e problemas de cruzamento. Já a perda de diversidade genética diminui a capacidade da população em responder a mudanças ambientais, podendo ser mais afetadas por predadores, parasitas e eventuais mudanças climáticas (FRANKHAM, 2003, 2005; O'BRIEN, 2003).

Além da depressão endogâmica e da baixa diversidade genética, outro fator pode afetar populações pequenas: a invasão de espécies exóticas, que eventualmente irão competir por recursos. No caso do MLD, as espécies exóticas são do gênero *Callithrix* (saguis), incluindo híbridos (DE MORAIS JR. *et al.*, 2008). Existem relatos de grandes liberações desses animais por funcionários do IBAMA entre os anos de 1983-1987 na região da Serra dos Gaviões e em Silva Jardim. Entrevistas com moradores e proprietários de fazendas na região da bacia do rio São João mostram que a liberação de saguis já é uma situação comum e dados moleculares sugerem que a introdução desses primatas na bacia do rio São João ocorreu mais de uma vez. Além da competição, os saguis podem facilitar e até mesmo transmitir parasitas e patógenos para o MLD (DE ANDRADE, 2006; DE MORAIS JR. *et al.*, 2008).

Um tema que foi amplamente debatido dentro da genética de conservação foi se problemas não relacionados à genética aumentavam o risco de extinção de determinadas populações antes dos problemas de endocruzamento e baixa diversidade genética surgirem (FRANKHAM, 2003, 2005; LANDE, 1988; SPIELMAN *et al.*, 2004). No cenário de LANDE (1988), problemas demográficos teriam um efeito mais imediato que problemas genéticos, e com isso levariam as populações ao colapso antes das desordens genéticas surgirem. Atualmente, esse cenário é refutado (FRANKHAM, 2009; FRANKHAM, 2005; SPIELMAN *et al.*, 2004). Esses autores mostraram que o endocruzamento e a baixa diversidade genética aumentam o risco de extinção tanto em populações de cativeiro, como em populações selvagens (FRANKHAM, 2009; FRANKHAM, 2005).

Com essa questão definida, dados moleculares ganharam peso dentro da biologia da conservação. Hoje, eles são imprescindíveis para os tomadores de decisão avaliarem as melhores maneiras de se manejar uma população,

focando no aumento do potencial adaptativo e na restauração da variabilidade genética (FRANKHAM, 2009; WEEKS *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética de uma população selvagem e de uma população reintroduzida de MLD juntamente com indivíduos oriundos do litoral e do Zoológico de Niterói. As populações selvagem (Serra) e reintroduzida (Imbaú) estão sendo definidas como indivíduos dentro de cada unidade de manejo. O grupo do litoral é representado por indivíduos encontrados na costa fluminense. Já os indivíduos do zoológico de Niterói são espécimes apreendidos oriundos da população selvagem.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar parâmetros básicos de genética de populações (diversidade alélica, Índice de Fixação (F_{ST}) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW));
- Estimar a estrutura genética das populações estudadas de mico-leão-dourado;
- Verificar se a reintrodução está sendo bem sucedida do ponto de vista genético.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área deste estudo concentra-se nos remanescentes da floresta Atlântica onde ainda ocorrem os MLD, localizada dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, RJ. Das sete unidades de manejo definidas *pele Population and Habitat Viability Assessment* (PHVA) de 2005 (HOLST *et al.*, 2006), três foram consideradas: Pirinéus, Gaviões e Imbaú (Figura 3 e Figura 4). Dentro deste PHVA, a população da Serra (Pirinéus e Gaviões) foi considerada prioritária por se tratar de uma população selvagem e que nunca foi monitorada, sendo assim escolhida como objeto de estudo desse trabalho. A população de Imbaú foi escolhida por ser uma população reintroduzida, possibilitando deste modo, verificar a conectividade entre essas unidades de manejo através do fluxo gênico. Também foram analisadas amostras recebidas do litoral e do Zoológico de Niterói. Esses últimos indivíduos foram apreendidos de forma ilegal e levados para o zoológico.

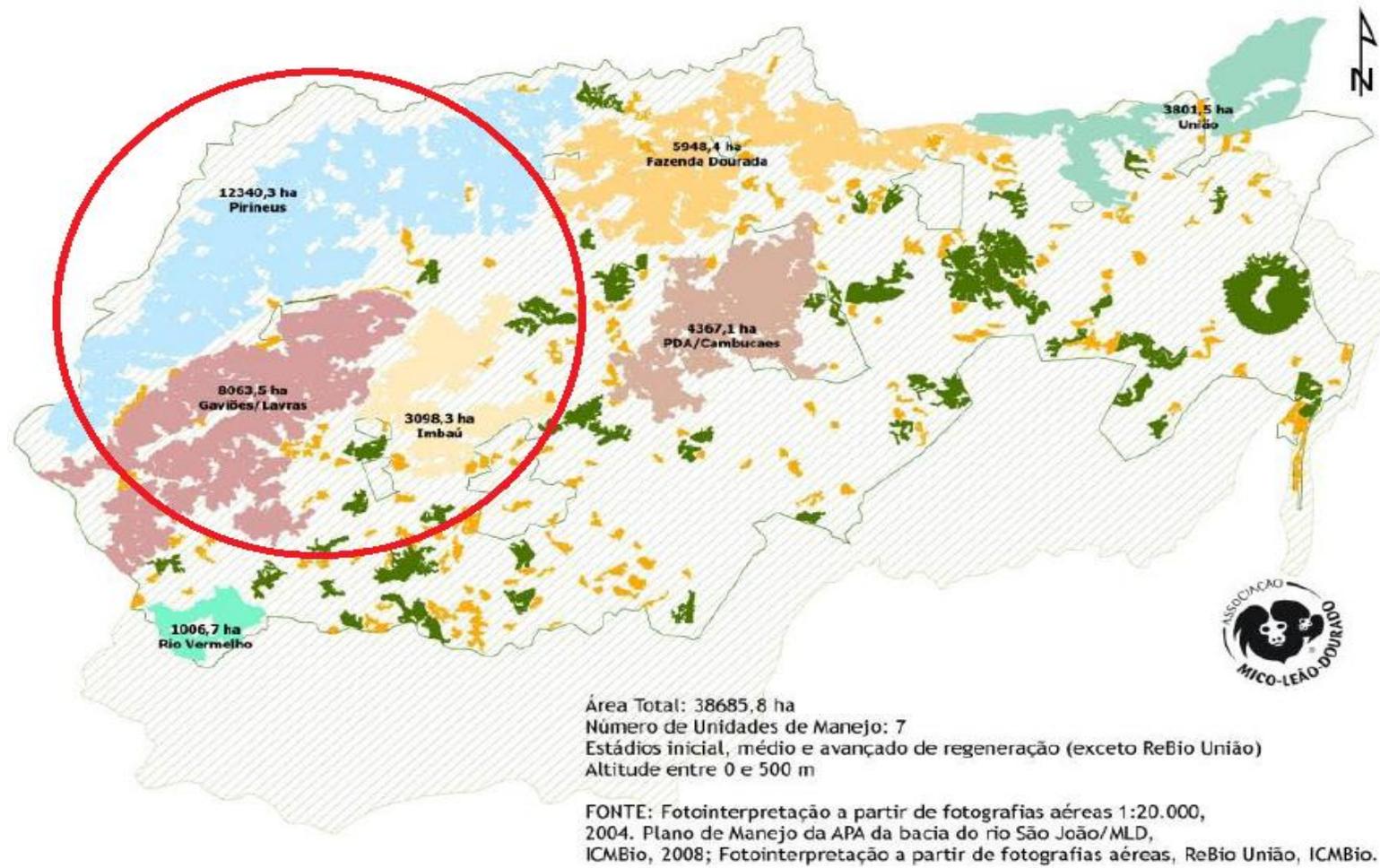


Figura 3. Mapa das Unidades de Manejo da Metapopulação do Mico-Leão-Dourado. Neste estudo foram analisadas: Pirineus, Gaviões (população selvagem da Serra) e Imbaú (população reintroduzida); unidades de manejo dentro do círculo vermelho. Fonte: MICKELBERG (2011)

Localização das Fazendas de Reintrodução

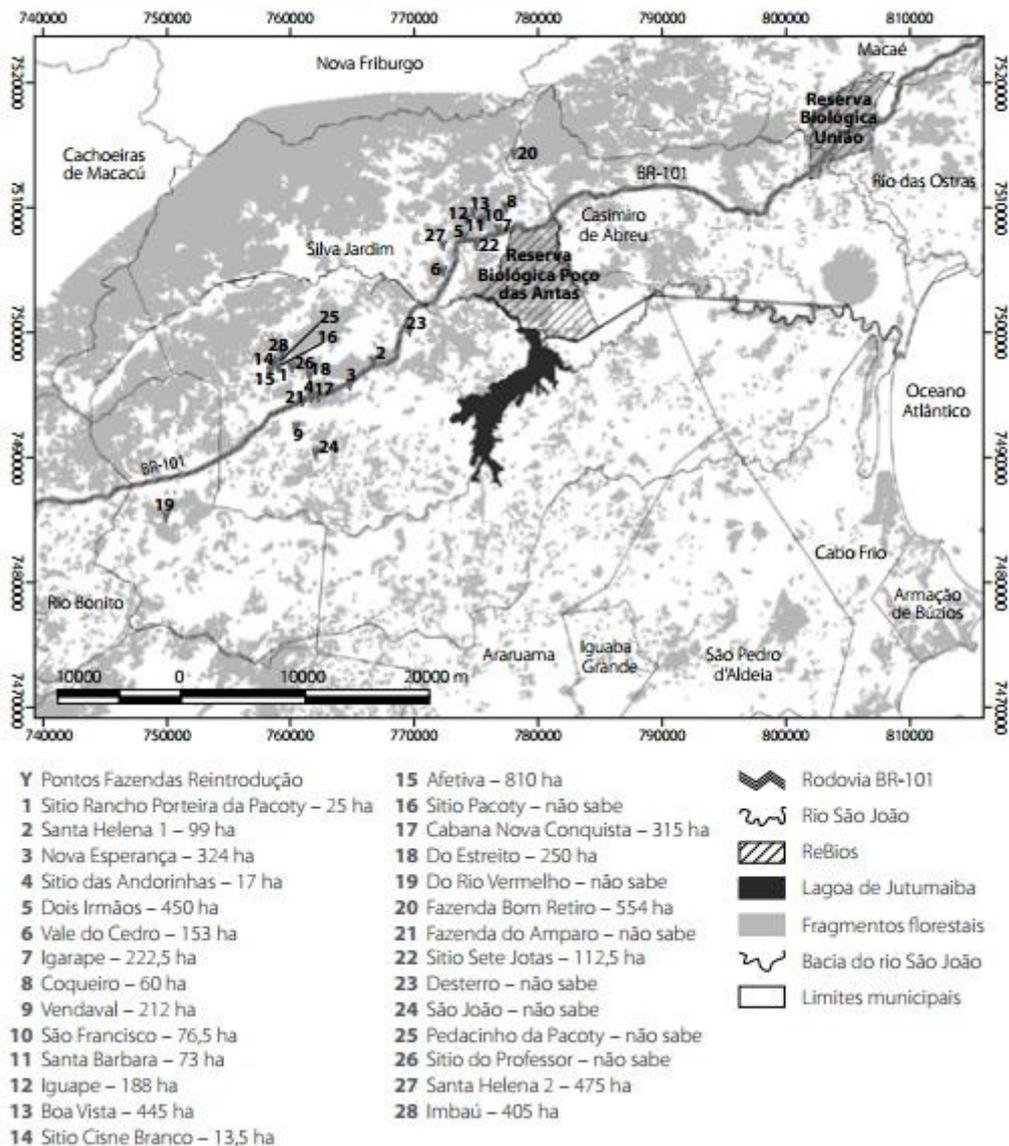


Figura 4. Mapa com a localização das fazendas com indivíduos reintroduzidos utilizadas neste estudo: (2) Santa Helena, (15) Afetiva, (16) Pacoty e (28) Imbaú. Fonte: OLIVEIRA; KIERULFF; *et al.* (2008).

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Todas as 116 amostras (de pêlo) utilizadas neste estudo foram coletadas pela equipe de campo da AMLD durante o período de 1996 até 2007 seguindo o protocolo de coleta da mesma e estocadas na Coleção de DNA da fauna e flora selvagens, credenciada como fiel depositária no CGEN, no Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. As amostras foram estocadas em potes contendo sílica para evitar o acúmulo de umidade que aumenta a degradação do DNA.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído no LCA a partir do pêlo dos indivíduos utilizando o kit de extração “DNeasy® Blood & Tissue Kit “ (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante: “Purification of total DNA from nails, hair, or feathers using the DNeasy® Blood & Tissue Kit”. No primeiro passo, aproximadamente 30 pelos foram colocados em um micro tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de tampão ATL, 20 µL de proteinase K e 20 µL de 1 M ditioneitol (DTT). Em seguida a amostra foi incubada a 56 °C durante a noite em um banho seco de bloco onde era eventualmente misturada. Após o pêlo ter sido completamente digerido as amostras foram agitadas em vortex por 15 s e então foi adicionado 300 µL de tampão AL. Imediatamente após essa etapa, as amostras foram agitadas em vortex e depois foi adicionado 300 µL de álcool 100% em cada uma e novamente elas foram agitadas.

Em seguida, o conteúdo do tubo foi transferido para uma coluna “DNeasy Mini spin column” com tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 min. Após, o sobrenadante e o tubo coletor foram descartados e a coluna foi colocada em outro tubo coletor, onde foi adicionado 500 µL de tampão AW1 e centrifugado a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 min. Novamente, o tubo coletor e o sobrenadante foram descartados e a coluna foi colocada em outro tubo coletor, onde foi adicionado 500 µL de tampão AW2 e centrifugado a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 3 min para secar a membrana. Depois do tubo coletor e o sobrenadante ter sido descartado, o “DNeasy Mini

spin column” foi colocado em um micro tubo de 1,5 mL limpo de onde foi adicionado 200 μ L de tampão AE diretamente na membrana e incubado a temperatura ambiente durante 1 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 min.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO

Foram utilizados um total de nove marcadores de microssatélite desenvolvidos para o gênero *Leontopithecus*: Lch μ 1, Lch μ 2, Lch μ 3, Lch μ 4, Lch μ 5, Lch μ 6, Lch μ 9 (GALBUSERA; GILLEMOT, 2007), Lr.P2BH6 e Lr.P5BE6 (GRATIVOL *et al.*, 2001). Os cinco primeiros (Lch μ 1-Lch μ 5) são tetranucleotídeos, os demais são dinucleotídeos.

Para a Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR em inglês) de todos os iniciadores, foi efetuada uma reação com três iniciadores: iniciador *Forward* (F) com adição da cauda M13, iniciador *Reverse* (R) e o iniciador M13 marcado com uma fluorescência utilizando o termociclador TC412. Essa reação desenvolvida por (SCHUELKE, 2000) visa baratear o custo da PCR. Este método é mais barato, pois a fluorescência está marcada no iniciador M13, podendo assim ser compartilhada por mais de um marcador.

O iniciador F tem a sequência da cauda M13 adicionada para que ele possa anelar com a sequência do iniciador M13, assim temos um ciclo de PCR específico para os iniciadores F e R e outro ciclo para os iniciadores F e M13. A proporção de iniciadores utilizados no mix para que o iniciador F se esgotasse e deixasse disponível a cauda M13 foi: 15(R):1(F):15(M13). O mix foi realizado da seguinte maneira: 50 μ L M13 [10 μ M], 3,375 μ L F [10 μ M], 50 μ L R [10 μ M] e 396,625 μ L de água ultra pura totalizando 500 μ L de mix.

As reações de PCR continham um volume total de 10 μ L e foi composta por dois conjuntos de ciclos com temperaturas de anelamento diferentes: o primeiro conjunto com 30 ciclos foi realizado para a amplificação utilizando o iniciador específico de cada alelo. Já o segundo conjunto com 10 ciclos buscou

a amplificação utilizando o iniciador M13. As características das nove reações estão contidas nas Tabela 1 e Tabela 2.

Após a PCR, as amostras e o controle negativo foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2% para fins de otimização e observar o resultado do controle negativo da PCR. Todo o procedimento de PCR e eletroforese em gel foi realizado no LCA. Depois de verificar a reação de PCR, as amostras foram divididas em dois conjuntos de acordo com a fluorescência de cada iniciador e foi utilizado um protocolo de precipitação para serem corridas no sequenciador automático ABI 3500 no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Tabela 1. Características da reação de PCR para todos os lócus estudados.

Alelo	Repetição	T°C inicial	Primeiro ciclo – 30x			Segundo ciclo – 10x			Extensão final
			Denaturação	Anelamento	Extensão	Denaturação	Anelamento	Extensão	
Lch μ 1	TETRA	94°C – 5 min	94°C – 30sec	56°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lch μ 2	TETRA	94°C – 5 min	94°C – 30sec	60°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lch μ 3	TETRA	94°C – 5 min	94°C – 30sec	60°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lch μ 4	TETRA	94°C – 5 min	94°C – 30sec	56°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lch μ 5	TETRA	94°C – 5 min	94°C – 30sec	58°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lch μ 6	DI	94°C – 5 min	94°C – 30sec	56°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lch μ 9	DI	94°C – 5 min	94°C – 30sec	58°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lr.P2BH6	DI	94°C – 5 min	94°C – 30sec	55°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min
Lr.P5BE6	DI	94°C – 5 min	94°C – 30sec	55°C – 45 sec	72°C – 45 sec	94°C – 30sec	53°C – 45 sec	72°C – 45 sec	72°C – 30 min

Tabela 2. Continuação das características da reação de PCR para todos os loci estudados.

Alelo- Fluorescência	Reagentes								
	Mix do iniciador	Tampão de PCR	MgCl ₂	dNTP	TAQ Platinum	Trehalose	BSA	H ₂ O	DNA
Lchμ1-VIC	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,4 μL (2 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	3,9 μL	1,0 μL
Lchμ2-FAM	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,3 μL (1,5 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	4,0 μL	1,0 μL
Lchμ3-FAM	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,3 μL (1,5 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	4,0 μL	1,0 μL
Lchμ4-VIC	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,4 μL (2 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	3,9 μL	1,0 μL
Lchμ5-NED	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,4 μL (2 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	3,9 μL	1,0 μL
Lchμ6-NED	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,4 μL (2 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	3,9 μL	1,0 μL
Lchμ9-FAM	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,4 μL (2 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	3,9 μL	1,0 μL
Lr.P2BH6-FAM	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,2 μL (1 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	4,1 μL	1,0 μL
Lr.P5BE6-VIC	2,0 μL (10μM)	1,0 μL (1X)	0,2 μL (1 μM)	0,5 μL (100 μM)	0,2 μL (1U)	1,0 μL	1,0 μL	4,1 μL	1,0 μL

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os arquivos .fsa gerados pelo sequenciador foram analisados utilizando o programa GeneMarker 2.0 (SoftGenetics). O resultado é exibido como um eletroferograma em que é possível observar o tamanho e intensidade de cada fragmento de acordo com a sua fluorescência. O tamanho de cada fragmento foi anotado em uma planilha do programa MS Excel®, juntamente com o indivíduo e o locus que ele representava. Devido a utilização de vários programas com diferentes formatos de entrada, também foi adotado dois programas conversores: Convert (GLAUBITZ, 2004) e PGDSpider (LISCHER; EXCOFFIER, 2012).

3.5.1 Análises Básicas de Genética de Populações

Para verificar a presença de alelos nulos, foi utilizado o programa MICRO-CHECKER 2.2. (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Este programa compara a distribuição dos genótipos observados contra a distribuição aleatória dos genótipos para estimar possíveis erros de genotipagem causados por baixa concentração de DNA, amplificação preferencial de alelos pequenos e mutações na região do iniciador que impediriam a amplificação de um dos alelos.

O programa HP-Rare (KALINOWSKI, 2005) foi utilizado para avaliar a diversidade genética de todas as populações estudadas. Foi verificado o número e a riqueza de alelos, a ocorrência de alelos privados e alelos fixados dentro de uma população. Também foi avaliada a frequência alélica utilizando o tamanho amostral mínimo para o cálculo.

O programa Arlequin 3.2.1.2 (EXCOFFIER, *et al.*, 2005) foi utilizado para estimar os valores do Índice de F_{ST} e desvios do EHW. O F_{ST} mostra o nível de diferenciação genética entre duas populações, variando de 0 (sem diferenciação) e 1 (fixação de alelos alternativos) (HOLSINGER; WEIR, 2009). O EHW mostra que populações com tamanho grande, com cruzamentos aleatórios e que não estejam sofrendo seleção tem uma frequência genotípica constante ($p^2:2pq:q^2$, no caso de dois alelos) após uma geração e essa frequência se mantém ao longo das próximas gerações. Assim, o EHW é um

bom parâmetro para se mensurar, pois em populações naturais a variação dessas frequências pode indicar que alguma dessas três prerrogativas esteja sendo violada (RIDLEY, 2006).

3.5.2 Estrutura Genética

O programa Structure 2.3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000) foi usado para verificar a estrutura genética entre as populações estudadas. Este programa utiliza uma abordagem bayesiana em que é assumido K populações, EHW e equilíbrio de ligação. Utilizando uma abordagem markoviana (*Markov Chain Monte Carlo* – MCMC), o programa calcula a probabilidade logarotimizada *a posteriori* de K, atribuindo ao K um grupo de frequências alélicas em cada locus, desta forma, indivíduos são agrupados de acordo com o seu genótipo.

Foram realizadas 10 corridas independentes com K variando de 2 a 9 com 500.000 períodos de *burn-in* e 500.000 períodos de MCMC utilizando os modelos de *admixture* e *correlated allele frequencies*. Foi realizada a média dos 10 valores de $\ln P(D)$ de cada K e depois calculado o ΔK . Com os valores de $\ln P(D)$ e ΔK , foi estimado o K mais provável. Após a escolha do K mais provável, foi efetuada uma corrida com esse K e com informação geográfica *a priori* dos indivíduos, para observar a presença de indivíduos migrantes ou misturados. Esta observação depende do valor q (HAAG *et al.*, 2010), que é a probabilidade do indivíduo ser membro do grupo: $q > 0,8$ representa um indivíduo residente, $0,2 < q < 0,8$ representa um indivíduo misturado, $q < 0,2$ representa um indivíduo migrante.

O pacote Geneland (GUILLOT *et al.*, 2005) para a linguagem R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) também foi utilizado para estimar o número de populações dos indivíduos analisados. Ele também utiliza uma abordagem bayesiana para estimar o número de grupo das amostras analisadas. Este pacote foi desenvolvido para trabalhos de genética da paisagem, porém quando os dados de localização não são informados, a sua abordagem fica similar à do Structure.

Foi realizada uma corrida com 4.000.000 períodos de MCMC, porém apenas o valor a cada 1.000 iterações foi salvo, restando um total de 40.000

períodos. Foi realizado o *burn-in* de 10.000 das iterações restantes e as análises foram efetuadas com as 30.000 iterações restantes.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES BÁSICAS DE GENÉTICAS DE POPULAÇÕES

Do total de 116 amostras, 78 foram extraídas com êxito. Essas amostras pertencem a 23 diferentes grupos sociais e a indivíduos sem origem conhecida. Os grupos com a quantidade de indivíduos em cada são: Sr. Zé (7), Sr. Irineu (2), 2 plat. ML (7), 1 plat. ML (2), plat (3), plat palmeiras (2), palmeiras (1) e Santa Fé (6) da Serra; sem origem (5), Sidnei (2), Sidnei II (2), SH 2 (3), LA 2 (6), PI (Imbaú, 2), PI (Pacoty, 1), AF (2), OL (2), PF (7), SI (1), PF2 (1), PL (4) e SH9 (1) de Imbaú; Litoral (5) e Zoológico de Nitéroí (4) (Anexo I).

Foram encontrados alelos nulos nas populações da Serra e Imbaú. Nos grupos do Litoral e do Zoológico a análise não foi possível devido a pouca quantidade de amostras. Quando todas as amostras foram analisadas juntas, também foi encontrado alelos nulos (Tabela 3).

Tabela 3. Lócus onde foram observados alelos nulos nas populações da Serra, Imbaú e quando todos os indivíduos foram colocados juntos.

	Alelos nulos		
	Serra	Imbaú	Geral
Lch μ 9	X	X	X
Lch μ 4	-	-	X
Lch μ 3	X	X	X
Lch μ 5	-	-	-
Lch μ 1	-	X	X
Lch μ 6	X	X	X
Lch μ 2	X	-	X
Lr.P2BH6	X	X	X
Lr.P5BE6	-	-	-

O número de alelos por lócus variou de dois (Lch μ 1 e Lch μ 2) a 10 (Lch μ 6), sendo encontrado um total de 45 alelos em todas as populações ($5 \pm 2,78$ alelos por lócus). O maior número médio de alelos (4,11) foi

encontrado na população de Imbaú, assim como a maior riqueza média de alelos (2,21). O número total de alelos privados foi de 15, sendo mais da metade encontrada na população de Imbaú (8). Já o número total de alelos fixados foi de 10, sendo que metade (5) foi encontrada no grupo do Zoológico (Tabela 6).

Os valores de F_{ST} foram calculados dividindo as populações em regiões geográficas (Tabela 4). A menor distância foi encontrada entre as populações de Serra e Imbaú (0,13) e a maior distância foi encontrada entre a população do Litoral e do Zoológico (0,54).

No total, nove *loci* em todas as populações se encontram fora do EHW ($p < 0,05$): quatro na população da Serra e cinco na população de Imbaú. Assim como o número médio de alelos por locus, os maiores valores de H_o (0,28) e H_e (0,42) foram encontrados na população de Imbaú. Já na população da Serra os valores foram de $H_o = 0,23$ e $H_e = 0,36$ (Tabela 5). Ao se eliminar os *loci* com menor diversidade, que por pertencerem a outra espécie podem ter um menor polimorfismo para o mico-leão-dourado (ELLEGRÉN *et al.*, 1997), os valores de H_o e H_e foram respectivamente de 0,37 e 0,60 para a população da Serra e 0,49 e 0,69 para a população de Imbaú.

Tabela 4. Valores de F_{ST} entre os quatro grupos estudadas.

	Serra	Imbaú	Litoral	Zoo
Serra	-			
Imbaú	0,13	-		
Litoral	0,24	0,21	-	
Zoo	0,34	0,35	0,54	-

Tabela 5. Medidas de diversidade de nove *loci* para as quatro populações estudadas. Número de indivíduos estudados por locus (N) e população, número de alelos (Na), riqueza alélica (RA), heterozigosidade observada (Ho) e Heterozigosidade esperada (He).

Locus	Serra (n = 30)					Imbaú (n = 39)					Litoral (n = 5)					Zoo (n = 4)				
	N	Na	RA	H _o	H _e	N	Na	RA	H _o	H _e	N	Na	RA	H _o	H _e	N	Na	RA	H _o	H _e
Lchμ9 ^{1,2}	27	3	2,18	0,18	0,5	31	2	1,98	0,23	0,51	5	1	1	0	0	3	1	1	0	0
Lchμ4	22	5	2,79	0,5	0,6	33	4	3,15	0,64	0,73	3	2	2	0	0,53	4	1	1	0	0
Lchμ3 ²	28	3	2,07	0,29	0,45	36	4	2,72	0,33	0,63	5	2	1,6	0,2	0,2	3	3	3	0	0,8
Lchμ5	25	1	1	0	0	34	2	1,09	0,03	0,03	4	3	2,5	0,25	0,46	3	2	2	0,33	0,33
Lchμ1 ²	27	1	1	0	0	37	2	1,16	0	0,05	5	2	1,87	0	0,36	4	1	1	0	0
Lchμ6 ^{1,2}	29	5	2,23	0,24	0,41	36	8	3,34	0,56	0,74	5	3	2,83	0,6	0,69	4	3	2,5	0,5	0,46
Lchμ2 ¹	27	2	1,21	0	0,07	32	1	1	0	0	5	1	1	0	0	3	1	1	0	0
Lr.P2BH6 ^{1,2}	30	4	2,57	0,1	0,59	36	8	3,06	0,36	0,66	5	3	2,86	0,4	0,71	4	2	1,96	0,5	0,43
Lr.P5BE6	30	5	2,8	0,7	0,66	39	6	2,43	0,41	0,47	5	2	1,97	0,6	0,47	4	1	1	0	0
Média	-	3,22	1,98	0,23	0,36	-	4,11	2,21	0,28	0,42	-	2,11	1,96	0,23	0,38	-	1,67	1,61	0,15	0,22

¹em desequilíbrio de HW na população da Serra ($p < 0,05$)

²em desequilíbrio de HW na população de Imbaú ($p < 0,05$)

Tabela 6. Frequência de alelos e distribuição de alelos privados e *loci* monomórficos. Em azul, alelos privados e em rosa, *loci* monomórficos para a população.

Locus	Alelos	Populações			
		Serra	Imbaú	Litoral	Zoo
Lchu9	420	0,037	0	0	0
	422	0,537	0,5	0	1
	424	0,426	0,5	1	0
Lchu4	393	0,068	0,348	0	0
	397	0,227	0,318	0,667	0
	401	0,591	0,227	0	1
	405	0,045	0,106	0,333	0
	409	0,068	0	0	0
Lchu3	324	0	0,028	0	0
	332	0,036	0,264	0	0,333
	336	0,268	0,528	0,1	0,333
	340	0,696	0,181	0,9	0,333
Lchu5	254	1	0,985	0,750	0,833
	274	0	0,015	0	0,167
	282	0	0	0,125	0
	286	0	0	0,125	0
Lchu1	206	1	0,973	0,8	1
	210	0	0,27	0,2	0
Lchu6	173	0	0,028	0	0
	177	0,034	0	0,2	0
	179	0	0,14	0	0
	183	0,034	0,14	0	0,125
	185	0,121	0,181	0,5	0
	187	0	0,042	0	0
	191	0	0	0	0,125
	193	0,759	0,389	0	0
	195	0,052	0,292	0	0,75
	197	0	0,042	0,3	0
Lchu2	312	0,963	1	1	1
	316	0,037	0	0	0
Lr.P2BH6	122	0	0,014	0	0
	124	0,033	0,028	0	0
	126	0	0,042	0	0,75
	128	0,1	0,028	0	0
	130	0,3	0,528	0,4	0
	132	0,567	0,250	0,4	0,250
	134	0	0,42	0,2	0
	136	0	0,069	0	0
Lr.P5BE6	118	0	0,013	0	0
	120	0,167	0,064	0	0
	126	0,017	0,064	0	0
	128	0,017	0	0	0
	130	0,433	0,718	0,7	0
	132	0	0,026	0	0
	134	0,367	0,115	0,3	1

4.2 ESTRUTURA GENÉTICA

O maior valor médio de $\ln P(D)$ (-891,51) e o maior valor médio de ΔK (65,54) foi encontrado no programa Structure quando $K = 6$. A análise realizada no programa Geneland também encontrou uma maior probabilidade das amostras analisadas estarem compostas em seis grupos (60%) (Figura 5). Dois dos grupos identificados foram oriundos da área geográfica correspondente a população da Serra, um do Litoral, um do Zoológico e os outros dois de Imbaú. Entretanto, os grupos encontrados em Imbaú não podem ser identificados devido a elevada “*admixture*” presente nesta população (Figura 6).

Quando $K = 4$ (de acordo com as áreas geográficas; Figura 7) também é possível observar a formação de dois grupos distintos na população da Serra, um grupo no Litoral, um grupo do Zoológico, mas nenhum grupo homogêneo identificável na população de Imbaú.

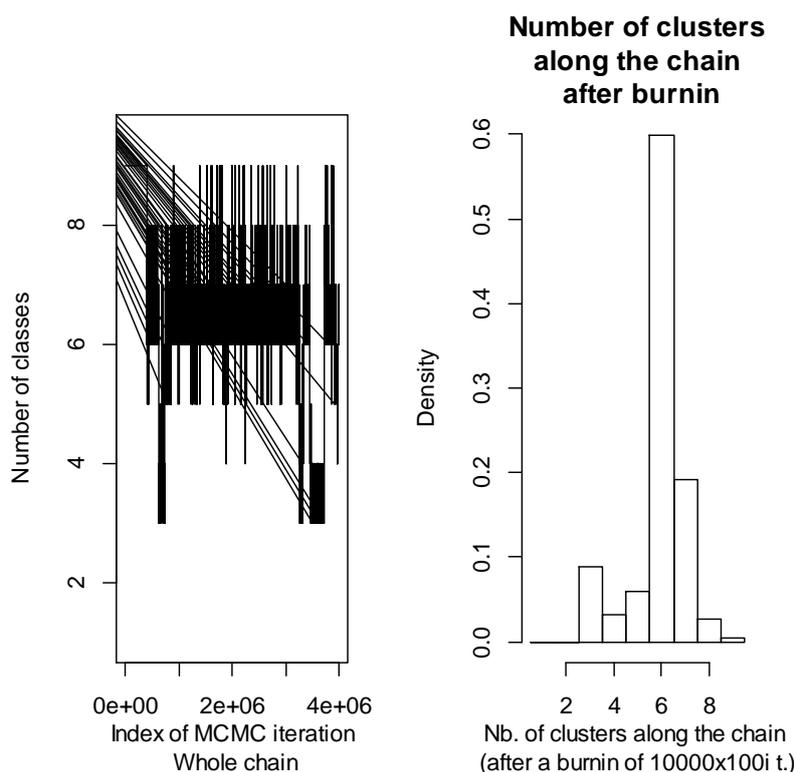


Figura 5. Saída do programa Geneland para inferir o número correto de grupos das amostras. À esquerda, o resultado do melhor número de grupos a cada iteração e à direita os grupos organizados por histograma de densidade.

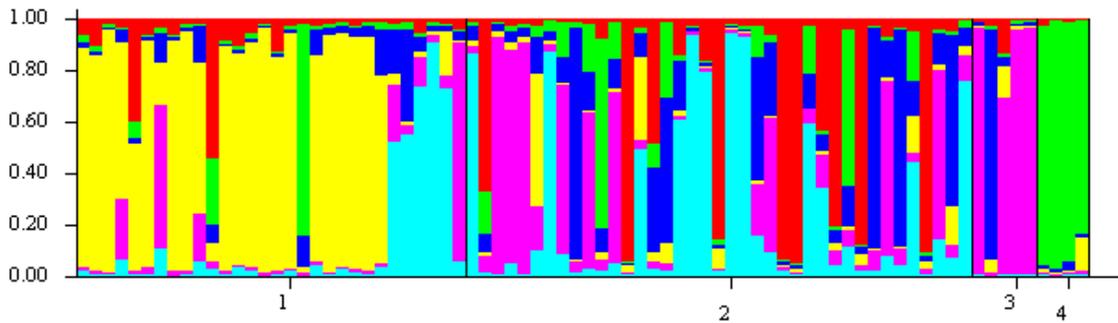


Figura 6. Saída do programa Structure com $K = 6$. Cada barra representa um indivíduo e a sua probabilidade de pertencer a um grupo genético. Cada cor representa um K. Grupo 1 = Serra, grupo 2 = Imbaú, grupo 3 = Litoral e grupo 4 = Zoo. Pode-se observar dois grupos na população da Serra, um grupo do Litoral e um grupo do Zoo. Entretanto não é possível observar dois grupos determinantes na população de Imbaú, indicando um alto grau de *admixture*.

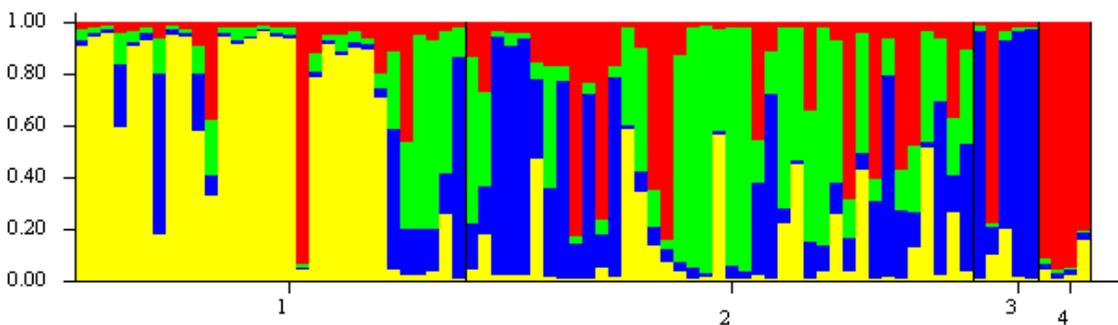


Figura 7. Saída do programa Structure com $K = 4$. Cada barra representa um indivíduo e a sua probabilidade de pertencer a um grupo genético. Cada cor representa um K. Grupo 1 = Serra, grupo 2 = Imbaú, grupo 3 = Litoral e grupo 4 = Zoo.

Quando as análises foram realizadas com a informação da população de cada indivíduo, foi possível observar uma estrutura acentuada tanto com $K = 6$ (maior probabilidade de grupos inferidos pelo Structure e Geneland) como com $K = 4$ (de acordo com as áreas geográficas) (Figura 8). Também foi possível observar indivíduos migrantes (indivíduos 18, 26, 27 e 30) e misturados (indivíduos 25, 28, 33, 35, 39, 62 e 71), sendo que em ambos os K os indivíduos migrantes e misturados foram os mesmos, exceto pelo indivíduo 71, inferido como migrante apenas com $K = 6$ e pelo indivíduo 26 que para $K = 4$ foi considerado misturado e para $K = 6$ foi considerado migrante.

A

B

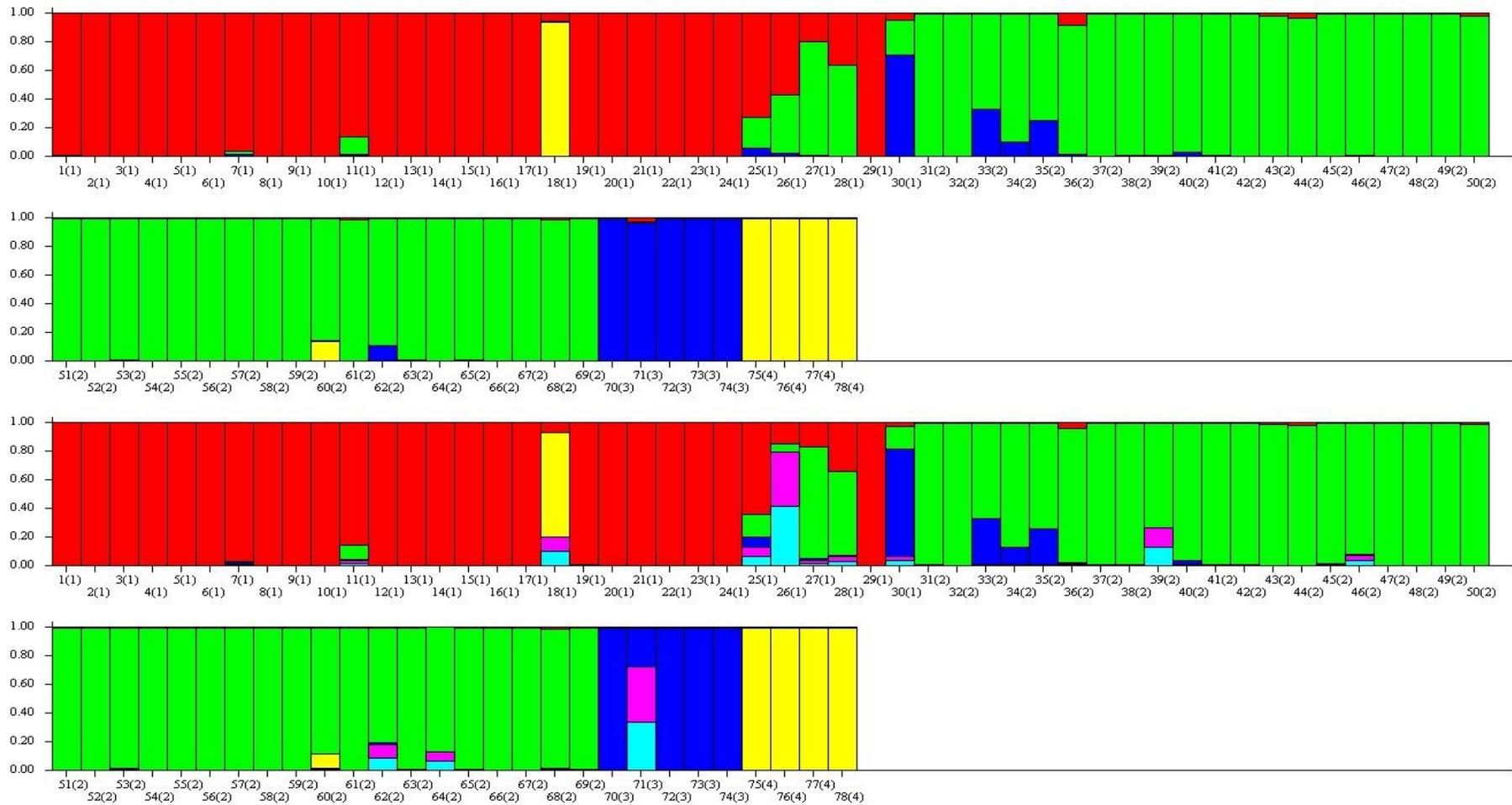


Figura 8. Saída do Structure quando foi informado a localidade geográfica a priori. (A) $K = 4$, (B) $K = 6$. Cada barra representa a proporção de um indivíduo pertencer a determinado grupo genético. É possível observar uma melhor resolução com $K = 6$, resultado que mostra mais indivíduos migrantes e misturados.

Dos indivíduos migrantes, o indivíduo 18 pertence ao grupo 2 plat. ML, já os indivíduos 26, 27 e 30 pertencem ao grupo de Santa Fé. Dos indivíduos misturados, os indivíduos 25 e 28 também pertencem ao grupo de Santa Fé. Todos esses indivíduos estão localizados dentro da região da Serra. Na população de Imbaú, os indivíduos considerados misturados foram: o indivíduo 39, que pertence ao grupo OL, os indivíduos 33 e 35, que são do grupo PI localizado na Faz. Imbaú, o indivíduo 62, pertencente ao grupo PL e o indivíduo 71 que pertence à população do Litoral.

5 DISCUSSÃO

5.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Os resultados de diversidade genética mostram uma média de H_o de apenas 0,22. Essa média fica abaixo do estudo prévio de MLD. GRATIVOL *et al.* (2001) encontraram em média uma H_o de 0,49. Em comparação com outras espécies de micos-leões, como o mico-leão-da-cara-preta ($H_o = 0,56$) e o mico-leão-da-cara-dourada ($H_o = 0,45$) o valor também foi inferior. Quanto ao número médio de alelos por locus, o mico-leão-dourado possuiu um número superior as dos Mico-Leão-da-Cara-Preta e Mico-Leão-Preto e menor que o Mico-Leão-da-Cara-Dourada (Tabela 7).

Tabela 7. Número médio de alelos, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada de trabalhos do gênero *Leontopithecus*, de espécies com populações pequenas e de espécies com populações reintroduzidas.

Espécie	NA	H_o	H_e	Fonte
Mico-Leão-Dourado*	5	0,25	0,44	Este estudo
Mico-Leão-Dourado**	6,2	0,37	0,64	Este estudo
Mico-Leão-Dourado	2,78	0,49	0,54	GRATIVOL <i>et al.</i> , 2001
Mico-Leão-da-Cara-Dourada	6	0,45	0,42	MORAES, 2011
Mico-Leão-da-Cara-Preta	2,56	0,48	0,56	MARTINS; JUNIOR, 2011
Mico-Leão-Preto	2,14	-	0,29	PEREZ-SWEENEY <i>et al.</i> , 2005
Onça-Pintada	7,2	0,68	0,73	HAAG <i>et al.</i> , 2010
Peru selvagem*	-	0,70	0,76	LATCH; RHODES, 2006
Urso-Preto*	-	0,64	0,72	ONORATO <i>et al.</i> , 2006
Red grouse*	-	0,67	0,62	MCMAHON <i>et al.</i> , 2012

NA = número médio de alelos; H_o = Heterozigosidade observada e H_e = Heterozigosidade esperada.

*espécies reintroduzidas

**excluindo os três *loci* menos diversos por terem sido desenvolvidos para outra espécie.

A comparação desses resultados pode ser melhor entendida se levarmos em conta a reintrodução que ocorreu na história do MLD. Em 1984, com o início do programa de reintrodução do MLD, animais de cativeiro foram reintroduzidos na natureza (KLEIMAN; RYLANDS, 2008). Esses animais têm diferentes origens, incluindo zoológicos. Indivíduos de zoológico frequentemente possuem uma baixa diversidade genética causada por endogamia (RALLS; BALLOU, JONATHAN, 1986). Além disso, é possível que essa baixa diversidade também tenha como fator a perda da diversidade genética devido à fragmentação da Floresta Atlântica. GRATIVOL (2003) estimou em 67% a perda da diversidade genética do MLD em nível mitocondrial.

Mesmo com o manejo genético das populações de cativeiro, este estudo mostrou uma elevada homozigose nos indivíduos reintroduzidos. Deste modo, é natural que a H_o do MLD seja baixa em relação às outras espécies, pois metade das amostras utilizadas ($N = 39$) tem origem em cativeiro e também porque os indivíduos reintroduzidos foram mantidos em seus grupos de origem, ou seja, indivíduos de um mesmo zoológico foram conservados juntos para formar a população reintroduzida (Andréia Martins, AMLD, comunicação pessoal). Essa mesma ideia explica o maior número médio de alelos por locus, pois indivíduos de diferentes lugares carregam com si diferentes alelos. Assim, é possível observar um maior número médio de alelos por locus junto com uma baixa H_o .

Diferente desse padrão é possível citar o caso da onça-pintada (HAAG *et al.*, 2010), uma espécie que também possui como característica pequenas populações e habitat fragmentado, porém não foi observado um baixo número de H_o em relação a H_e , sendo também observado um número médio de alelos semelhante ao MLD. Dessa forma, é sugerido que a reintrodução MLD foi responsável por essa baixa H_o , mesmo que número médio de alelos seja similar a das espécies citadas.

Em algumas espécies reintroduzidas é possível observar números similares aos encontrados por MORAES, 2011 e HAAG *et al.*, 2010 em relação a H_e/H_o (LATCH; RHODES, 2006; MCMAHON *et al.*, 2012; ONORATO *et al.*,

2006). Apesar da reintrodução ocorrida, os valores de H_e e H_o não foram discrepantes, possivelmente devido ao maior número de indivíduos dessas espécies, maior dispersão e/ou porque a população “fonte” continha uma alta variabilidade genética, diferente do MLD.

O trabalho anterior de MLD (GRATIVOL *et al.*, 2001) descreve valores diferentes de heterozigosidade e número médio de alelos, porém foi utilizado quatro loci específicos para a espécie e nenhuma das populações estudadas era composta por indivíduos reintroduzidos. Ao se excluir os três loci com menor diversidade, loci esses que não foram desenvolvidos para o MLD, foi observada uma $H_o = 0,37$ e uma $H_e = 0,67$. Loci de microssatélite que são desenvolvidos para uma espécie podem apresentar uma menor variabilidade quando utilizadas em outras espécies, mesmo que estas tenham uma relação filogenética próxima (ELLEGREN *et al.*, 1997). Porém, foi decidida a manutenção desses três loci, pois nenhum deles foi monomórfico e porque em dois desses loci foram encontrada variação no grupo do Litoral, sendo que dois dos cinco alelos foram privados.

A maior ocorrência de alelos privados na população de Imbaú (8), assim como o maior número médio de alelos e a baixa H_o , pode ser explicada pela reintrodução ocorrida nesta população: indivíduos de diferentes locais carregam com si diferentes alelos. É natural que Imbaú possua o maior número de alelos privados, visto que foi formado a partir da reintrodução de grupos de diferentes localidades. Analogamente, seria como se Imbaú fosse composto por indivíduos de várias populações. Ao contrário de Imbaú, é esperado que metade dos loci monomórficos tenham sido encontrados nos indivíduos do Zoológico, já que estes indivíduos são provavelmente de um mesmo grupo social, apesar de ter sua origem desconhecida. Já o grupo do Litoral apresenta dois alelos privados (no mesmo locus) e dois loci monomórficos. Apesar de ser formada por apenas cinco indivíduos neste estudo, a população do Litoral foi a que apresentou maior diversidade do DNA mitocondrial em um estudo anterior (GRATIVOL, 2003). Assim, esse baixo número de loci monomórfico encontrado dentro de um grupo social pode estar relacionada a esta maior diversidade.

5.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E ALELOS NULOS

O EHW constitui a base teórica da Genética de Populações e o estudo desse teorema é importante, pois a partir do seu padrão de frequências genotípicas ($p^2:2pq:q^2$), é possível explorar com maior clareza a genética de populações naturais. Para que uma população esteja em EHW é necessário que (1) a população não esteja sofrendo seleção, (2) que os cruzamentos estejam ocorrendo de forma aleatória e que (3) o tamanho populacional seja “infinito” (RIDLEY, 2006). O desvio das frequências do EHW é um indicador de que algum desses princípios esteja sendo violado e como se pode observar, todas as quatro populações estão fora do EHW.

A análise de alelos nulos depende do EHW, pois o programa MICRO-CHECKER calcula a quantidade de homozigotos e compara com uma distribuição aleatória dos genótipos. Assim, quando há um excesso de homozigotos o programa infere se foi devido à presença de alelos nulos, dominância de pequenos alelos ou erros associados à “gagueira”. Neste estudo, o programa acusou alelos nulos para sete dos *loci* quando todas as amostras foram testadas juntas e cinco quando foram testadas separadas (Tabela 3).

Como o programa faz uma inferência baseada na frequência de heterozigotos, foi decidido que nenhum *loci* seria eliminado da análise porque é natural que essas populações de mico-leão-dourado tenham um número mais elevado de homozigotos, devido à reintrodução ocorrida em uma das populações. Além disso, o baixo número de heterozigotos pode ser causado por endogamia e estruturação da população (HAJJI *et al.*, 2007), cujo resultado será descrito adiante.

5.3 ESTRUTURA GENÉTICA

Como duas das populações deste estudo são formadas por indivíduos de um mesmo grupo, apenas o resultado de F_{ST} entre Serra e Imbaú será considerado (Tabela 6). O valor encontrado (0,13) é condizente com a análise do STRUCTURE que mostra diferença entre essas duas populações, apesar

de um grupo da Serra ter similaridade com Imbaú, cujo resultado será descrito adiante. Resultado similar foi encontrado para o mico-leão-da-cara-dourada (0,12) (MORAES, 2011) entre duas regiões que possuem indivíduos com maior similaridade genética inferidas pelo STRUCTURE. O baixo F_{ST} do mico-leão-dourado pode ser atribuído a presença de alguma conexão entre Imbaú e Serra que possivelmente possibilitou o estabelecimento de indivíduos de Imbaú na população da Serra (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2008; ASSOCIAÇÃO MICO-LEÃO-DOURADO, 2012).

O melhor valor de K encontrado tanto pelo STRUCTURE como pelo GENELAND foi K = 6. Entretanto análises com K = 4 também foram realizadas, pois foram utilizadas amostras de áreas geográficas distintas e um grupo com origem desconhecida. Ao se analisar a Figura 6 do STRUCTURE com K = 6 é possível verificar a presença de dois grupos dentro da população da Serra, o grupo do Litoral e o grupo do Zoológico. Entretanto não é possível identificar nenhum grupo distinto dentro da população de Imbaú. Em um trabalho com populações reintroduzidas de *Mauritius Parakeet (Psittacula echo)*, RAISIN *et al.*, 2012 apresenta a estrutura genética antes e depois da reintrodução, sendo possível observar estrutura entre as populações antes da reintrodução. Após a reintrodução, não existe mais estrutura, e sim uma elevada *admixture*.

Sendo o valor ideal de K = 6, foram observados dois grupos na Serra, o grupo do Litoral e o grupo do Zoológico de Niterói. Assim, restariam dois grupos para preencher a população de Imbaú, porém devido à *admixture* dessa população, não foi possível observar esses dois grupos. Essa *admixture* corrobora com a reintrodução que ocorreu nessa área (KLEIMAN; RYLANDS, 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Imbaú foi formada com a reintrodução de indivíduos de zoológicos em 1984, porém essa reintrodução durou até 2000. Assim, é natural que alguma “mistura” tenha acontecido, devido à dispersão dos animais e também ao manejo de indivíduos entre grupos distintos (Andréia Martins, AMLD, comunicação pessoal).

Dentro da população da Serra, foram inferidos dois grupos distintos. O segundo grupo é formado por indivíduos de apenas um grupo social, correspondente à fazenda Santa Fé. A composição genética deste segundo

grupo é parecida com a composição de alguns indivíduos de Imbaú, sugerindo um deslocamento, possivelmente de Imbaú para essa região, como os resultados de indivíduos migrantes mostram. Esse fato é sustentado pela confirmação de conexões florestais existentes entre Imbaú e Serra (ASSOCIAÇÃO MICO-LEÃO-DOURADO, 2012).

Ao utilizar informação *a priori* da localização dos indivíduos e compararmos os resultados de $K = 4$ e $K = 6$, fica clara a melhor resolução da análise utilizando o resultado de $K = 6$, informando indivíduos misturados e migrantes que não aparecem com $K = 4$. Sendo assim, para a análise de migrantes esse trabalho se centrou no resultado de $K = 6$.

Dentro da população da Serra, todos os indivíduos (exceto o indivíduo 29) do grupo de Santa Fé, que nas análises sem informação *a priori* mostraram ser de um grupo separado dos demais indivíduos, foram marcados como migrantes (dois) ou misturados (três) e similares aos indivíduos de Imbaú. Esse grupo dentro da população da Serra, com identidade genética similar a indivíduos de Imbaú, sugere que houve uma migração no sentido Imbaú -> Serra, visto que não existe presença de indivíduos da Serra dentro de Imbaú.

Ainda na população da Serra, o indivíduo 18 foi geneticamente similar aos indivíduos do Zoológico de Niterói. Essa informação pode sugerir que este grupo foi capturado nessa população, porém algum membro pode não ter sido capturado e depois esse indivíduo que restou foi aceito em outro grupo, já que na época da apreensão era um macho juvenil e indivíduos nessa idade não formam grupos (Carlos Ruiz-Miranda, comunicação pessoal).

5.4 SUPORTE A ESTRATÉGIA DE METAPOPOPULAÇÃO

A análise utilizando todo o grupo social pode superestimar o valor de K (HAAG *et al.*, 2010), entretanto foi necessário usar todo o grupo para avaliar aspectos importantes como *admixture*, dispersão dentro e entre as unidades de manejo, determinar a origem de indivíduos desconhecidos e a efetividade da reintrodução do ponto de vista genético.

Esses dados dão suporte e visam auxiliar o manejo e a conservação do mico-leão-dourado através do PCMLD. Apesar de existir desde 1983, este é apenas o terceiro projeto com dados moleculares visando a conservação da espécie (GRATIVOL *et al.*, 2001; GRATIVOL, 2003) e o primeiro analisando uma população reintroduzida. Mesmo com o grande número de informações existente para as populações reintroduzidas, sendo possível inclusive realizar análises de pedigree, a biologia molecular pode ampliar e elucidar algumas questões que o esforço de campo não é capaz, como a origem de indivíduos desconhecidos e dispersão entre unidades de manejo (devido ao não monitoramento em todas elas), ou então confirmar resultados obtidos, como a baixa dispersão até mesmo dentro das unidades de manejo (MICKELBERG, 2011). Além disso, este estudo fornece suporte à abordagem de metapopulação do PCMLD.

Essa abordagem de metapopulação é necessária devido à fragmentação ocorrida na Floresta Atlântica e também pela distribuição fragmentada das populações de MLD (Figura 3). A intensa ocupação humana no litoral brasileiro, atualmente resta apenas 11,7% de sua vegetação original e a maioria dos remanescentes está contida em fragmentos menores que 50 ha. Dentro da sub-região Serra do Mar, onde o habitat do MLD está inserido, 36,5% da vegetação original permanece (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Atualmente, o maior problema do PCMLD reside na qualidade e no tamanho de habitat disponível para o MLD, pois ainda não estão disponíveis os 25.000 ha conectados requeridos para a espécie (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008) e a maior parte dos remanescentes de Floresta Atlântica estão distribuídos em fragmentos menores que 50 ha (RIBEIRO *et al.*, 2009). Além disso, mesmo que houvesse os 25.000 ha, essas áreas deveriam estar conectadas para garantir a estrutura de metapopulação dessa espécie.

O PCMLD conta atualmente com sete unidades de manejo, sendo duas formadas com indivíduos selvagens, três compostas a partir de indivíduos reintroduzidos e outras duas formadas por grupos translocados de outros fragmentos menores que não garantiriam uma população viável caso ainda estivessem separados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Junto às unidades de

manejo, corredores florestais estão sendo implantados desde 1996 para que essa abordagem de metapopulação seja estabelecida e a meta 2025 alcançada. O uso desses corredores é importante, pois é através deles que irá ocorrer a dispersão dos indivíduos, garantindo o fluxo gênico entre as unidades de manejo e a redução de endocruzamento (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; PARDINI *et al.*, 2005).

Ao se comparar a estrutura genética de Serra e Imbaú é possível observar diferenças entre a composição genética dessas duas unidades. Além de estar clara a separação como duas populações distintas (Tabela 4 e Figura 6), uma população apresenta uma alta uniformidade (Serra) e a outra apresenta uma elevada *admixture*. As características de Imbaú eram esperadas e reforçam o papel da reintrodução no aumento da variabilidade genética de populações através da adição de novos alelos na natureza (FRANKHAM *et al.*, 2008).

A uniformidade genética da Serra não era esperada por se tratar de uma população selvagem e por ser a segunda maior população de MLD existente. Possuindo essas características, esperava-se uma maior variabilidade, porém essa uniformidade indica que esta população ficou isolada das demais populações desde a fragmentação da região e que a implantação de corredores florestais está diminuindo este isolamento, já que foi possível inferir a presença de um grupo de Imbaú na população da Serra, indicando que o corredor entre essas duas unidades de manejo auxiliou indivíduos a migrarem.

A partir dos dados de Imbaú e Serra, acredita-se que as três populações reintroduzidas contenham a maior parte da diversidade genética entre as sete unidades de manejo. Assim, caso haja necessidade de translocação de indivíduos entre esses grupos, deve-se priorizar utilizar essas populações como fonte para as demais unidades.

6 CONCLUSÃO

- A diversidade genética global dos indivíduos foi extremamente baixa ($H_o = 0,25$; $H_e = 0,44$), porém condiz com o fato da atual população de MLD ser pequena, fragmentada e ser descendente de apenas 200-600 indivíduos, sendo o número efetivo (N_e) menor ainda;
- Houve estruturação entre as duas populações estudadas ($F_{ST} = 0,13$), entretanto foi possível observar um grupo de Imbaú na população da Serra, indicando uma possível migração;
- Do ponto de vista genético, a população reintroduzida apresentou uma elevada *admixture*, podendo servir como uma população fonte para as demais populações. Entretanto foi possível observar alguns grupos sociais estruturados, sugerindo que a dispersão dentro da unidade de manejo não está acontecendo livremente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. C. DE. **ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA, ATRAVÉS DO DNA MICROSSATÉLITES, DAS POPULAÇÕES DE SAGÜIS (*Callithrix spp.*) INTRODUZIDOS NA ÁREA DE OCORRÊNCIA DO MICO-LEÃO-DOURADO (*Leontopithecus rosalia*)**. [S.l.]: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006.

ASSOCIAÇÃO MICO-LEÃO-DOURADO. **Detectadas conexões entre áreas de florestas em Silva Jardim**. Disponível em: <http://www.micoleao.org.br/template.php?pagina=/ptg/associacao/noticias_visualiza.php&id=98&link=1>. Acesso em: 26 jun. 2012.

BALLOU, J. D; KLEIMAN, D. G.; MALLINSON, J. J. C. *et al.* A História, o Manejo e o Papel da Conservação de Populações de Micos-Leões em Cativeiro. In: KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. (Eds.). **Micos-Leões**. 1a. ed. Brasília: MMA, 2008. p. 136-162.

ELLEGREN, H.; MOORE, S.; ROBINSON, N.; WARD, W.; SHELDON, B. C. Microsatellite Evolution - A Reciprocal Study of Repeat Lengths at Homologous Loci in Cattle and Sheep. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 8, p. 854-860, 1997.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, jan 2005.

FERNANDES, R. V.; RAMBALDI, D. M.; TEIXEIRA, A. M. DE G. Restauração e proteção legal da paisagem - corredores florestais e RPPNs. In: DE OLIVEIRA, PAULA P.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R. (Eds.). **Conservação do mico-leão-dourado: Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. 1a. ed. Campos dos Goytacazes: Associação Mico-Leão-Dourado & Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2008. p. 160-179.

FRANKHAM, R. Inbreeding in the wild really does matter. **Heredity**, v. 104, n. 2, p. 124, 2009.

FRANKHAM, R; BALLOU, J. D; BRISCO, D. A. **Fundamentos da Genética da Conservação**. 1a. ed. [S.l.]: SBG, 2008. p. 259

FRANKHAM, R.. Genetics and conservation biology. **C. R. Biologies**, v. 326, p. S22-S29, 2003.

FRANKHAM, R.. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, p. 131-140, 2005.

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 ago 2007.

GLAUBITZ, J. C. convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 2, p. 309-310, jun 2004.

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

GRATIVOL, A. D.. **DNA ANTIGO E GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO DO MICO LEÃO DOURADO (LEONTOPITHECUS ROSALIA): ESTRUTURA GENÉTICA EM DUAS ESCALAS DE TEMPO E SUA RELAÇÃO COM A FRAGMENTAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA**. [S.l.]: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2003.

GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; TEIXEIRA, A. M. DE G.; SCHMIDT, M. A. R. Abordagem de metapopulação para a conservação dos micos-leões-dourados na paisagem fragmentada da bacia do rio São João, RJ. In: DE OLIVEIRA, P. P.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R. (Eds.). **Conservação do mico-leão-dourado: Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. 1a. ed. Campos dos Goytacazes: Associação Mico-Leão-Dourado & Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2008. p. 136-159.

GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: a computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 3, p. 712-715, set 2005.

HAAG, T.; SANTOS, A. S.; SANA, D. A. *et al.* The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). **Molecular Ecology**, v. 19, n. 22, p. 4906-4921, nov 2010.

HAJJI, G. M.; CHARFI-CHEIKROUHA, F.; LORENZINI, R. *et al.* Phylogeography and founder effect of the endangered Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*). **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n. 3, p. 659-673, 5 dez 2007.

HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, v. 396, p. 41-49, 1998.

HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F(ST). **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 9, p. 639-50, set 2009.

HOLST, B.; MEDICI, E. P.; MARINO-FILHO, O. J. *et al.* **Lion Tamarin Population and Habitat Viability Assessment Workshop 2005, final report**. Apple Valley: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, 2006. p. 193

KALINOWSKI, S. T. Hp-Rare 1.0: a Computer Program for Performing Rarefaction on Measures of Allelic Richness. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 187-189, mar 2005.

KIERULFF, M. C. M.; RYLANDS, A. B. Census and distribution of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **American Journal of Primatology**, v. 59, n. 1, p. 29-44, jan 2003.

KIERULFF, M. C. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; DE OLIVEIRA, P. P.; *et al.* The Golden lion tamarin *Leontopithecus rosalia*: a conservation success story. **International Zoo Yearbook**, v. 46, n. 1, p. 36-45, 28 jan 2012.

KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. **Micos Leões: Biologia e Conservação**. 1a. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. p. 568

LANDE, R. Genetics and Demography in Biological Conservation. **Science**, v. 241, n. 4872, p. 1455-1460, 1988.

LATCH, E. K.; RHODES, O. E. The effects of gene flow and population isolation on the genetic structure of reintroduced wild turkey populations: Are genetic signatures of source populations retained? **Conservation Genetics**, v. 6, n. 6, p. 981-997, 21 jan 2006.

LISCHER, H. E. L.; EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics**, v. 28, n. 2, p. 298-299, 15 jan 2012.

MARTINS, M. M.; JUNIOR, P. M. G. Informative microsatellites for genetic population studies of black-faced lion tamarins (*Leontopithecus caissara*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 173-175, jan 2011.

MCMAHON, B. J.; JOHANSSON, M. P.; PIERTNEY, S. B.; BUCKLEY, K.; HÖGLUND, J. Genetic variation among endangered Irish red grouse (*Lagopus lagopus hibernicus*) populations: implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, v. 13, p. 639-647, 11 jan 2012.

MICKELBERG, J. L. **UNDERSTANDING AND MANAGING ISOLATION IN A FRAGMENTED POPULATION OF GOLDEN LION TAMARINS, LEONTOPITHECUS ROSALIA**. [S.I.]: George Mason University, 2011.

MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMAN, M. *et al.* **Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions**. 1a. ed. [S.I.]: Conservation International, 2005. p. 392

MORAES, A. M. **AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE MICO-LEÃO-DA-CARA-DOURADA, LEONTOPITHECUS CHRYSOMELAS (KUHL, 1820) (PRIMATES: CALLITRICHIDAE), NO SUL DA BAHIA, BRASIL**. [S.I.]: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011.

DE MORAIS JR., M. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; GRATIVOL, A. D.; *et al.* Os sagüis, *Callithrix jacchus* e *penicillata*, como espécies invasoras na região de ocorrência do mico-leão-dourado. In: DE OLIVEIRA, P. P.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R. (Eds.). **Conservação do mico-leão-dourado: Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. 1a. ed. Campos dos Goytacazes: Associação Mico-Leão-Dourado & Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2008. p. 86-117.

DE OLIVEIRA, P. P.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R. **Conservação do mico-leão-dourado: Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. 1a. ed. Campos dos Goytacazes: Associação Mico-Leão-Dourado & Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2008. p. 200

DE OLIVEIRA, P. P.; KIERULFF, M. C. M.; LAPENTA, M. J.; MARTINS, A. F.; BECK, B. B. Técnicas de manejo para a conservação do mico-leão-dourado. In: DE OLIVEIRA, P. P.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R. (Eds.). **Conservação do mico-leão-dourado: Enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada**. 1a. ed. Campos dos Goytacazes: Associação Mico-Leão-Dourado & Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2008. p. 118-135.

ONORATO, D. P.; HELLGREN, E. C.; BUSSCHE, R. A.; DOAN-CRIDER, D. L.; SKILES, J. R. Genetic structure of American black bears in the desert southwest of North America: conservation implications for recolonization. **Conservation Genetics**, v. 8, n. 3, p. 565-576, 28 set 2006.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, set 2004.

O'BRIEN, S. J. Tears of the Cheetah. In: O'BRIEN, S. J. (Ed.). **Tears of the Cheetah: The Genetic Secrets of Our Animal Ancestors**. 1a. ed. New York: St. Martin Griffin, 2003. p. 15-34.

PARDINI, R.; DE SOUZA, S. M.; BRAGA-NETO, R.; METZGER, J. P. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. **Biological Conservation**, v. 124, n. 2, p. 253-266, jul 2005.

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

PESSÔA, L. M.; TAVARES, W. C.; GONÇALVES, P. R. Mamíferos das Restingas do Macrocompartimento Litorâneo da Bacia de Campos. In: PESSÔA, L. M.; TAVARES, W. C.; SICILIANO, S. (Eds.). **Mamíferos de Restingas e Manguezais do Brasil**. 1a. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Mastozoologia, Museu Nacional, 2010. p. 95-125.

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

RAISIN, C.; FRANTZ, A. C.; KUNDU, S. *et al.* Genetic consequences of intensive conservation management for the Mauritius parakeet. **Conservation Genetics**, v. 13, n. 3, p. 707-715, 5 fev 2012.

RALLS, K.; BALLOU, J. D. Preface to the Proceedings of the Workshop on Genetic Management of Captive Populations. **Zoo Biology**, v. 5, n. 2, p. 81-86, 1986.

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.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 752

RYLANDS, A. B.; KIERULFF, M. C. M; PINTO, L. P. DE SOUZA. Distribuição e Status dos Micos-Leões. In: KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. (Eds.). **Micos-Leões**. 1a. ed. Brasília: MMA, 2008. p. 69-104.

RYLANDS, A. B.; MALLINSON, J. J. C.; KLEIMAN, D. G. *et al.* Historia da Pesquisa e Conservação do Mico-Leão. In: KLEIMAN, D. G.; RYLANDS, A. B. (Eds.). **Micos-Leões**. 1a. ed. Brasília: MMA, 2008. p. 23-68.

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

SPIELMAN, D.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R.. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 42, p. 15261-15264, 2004.

TEAM, R. D. C. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2012.

WEEKS, A. R.; SGRO, C. M.; YOUNG, A. G. *et al.* Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. **Evolutionary Applications**, v. 4, p. 709-725, 2011.

ANEXO A – LISTA DOS INDIVÍDUOS

Tabela 8. Lista do indivíduos, localização e grupos. A primeira coluna representa a ordem na análise dos dados. Já o ID campo mostra o código do indivíduo no campo e no laboratório.

Indivíduo	ID campo	Localização	Grupo
ID1	SGLT1	Serra	Sr. Zé
ID2	SGLT2	Serra	Sr. Zé
ID3	SGLT3	Serra	Sr. Zé
ID4	SGLT4	Serra	Sr. Zé
ID5	SGLT5	Serra	Sr. Zé
ID6	SGLT6	Serra	Sr. Zé
ID7	SGLT7	Serra	Sr. Zé
ID8	SGLT10	Serra	Sr. Irineu
ID9	SGLT12	Serra	Sr. Irineu
ID10	SGLT13	Serra	2 plat. ML
ID11	SGLT14	Serra	2 plat. ML
ID12	SGLT15	Serra	2 plat. ML
ID13	SGLT16	Serra	2 plat. ML
ID14	SGLT17	Serra	2 plat. ML
ID15	SGLT18	Serra	2 plat. ML
ID16	SGLT19	Serra	2 plat. ML
ID17	SGLT21	Serra	1 plat. ML
ID18	SGLT22	Serra	1 plat. ML
ID19	SGLT24	Serra	plat
ID20	SGLT25	Serra	plat
ID21	SGLT26	Serra	plat
ID22	SGLT27	Serra	plat palmeiras
ID23	SGLT28	Serra	plat palmeiras
ID24	SGLT34	Serra	palmeiras
ID25	SGLT36	Serra	Santa fé
ID26	SGLT37	Serra	Santa fé
ID27	SGLT38	Serra	Santa fé
ID28	SGLT39	Serra	Santa fé
ID29	SGLT41	Serra	Santa fé
ID30	SGLT42	Serra	Santa fé
ID31	IGLT1	Afetiva	JG
ID32	IGLT9	Estreito	AX (sozinho)
ID33	IGLT30	Imbaú	PI
ID34	IGLT31	Imbaú	PI
ID35	IGLT32	Imbaú	PI
ID36	IGLT34	Pacoty	PI
ID37	IGLT36	Afetiva	AF
ID38	IGLT37	Afetiva	AF
ID39	IGLT2	Afetiva	OL

ID40	IGLT8	Olímpia	OL
ID41	IGLT44	Estreito	OL
ID42	IGLT45	Estreito	OL
ID43	IGLT3	St. Helena	-
ID44	IGLT14	St. Helena	SH2
ID45	IGLT15	St. Helena	SH2
ID46	IGLT16	St. Helena	SH2
ID47	IGLT19	St. Helena	LA2
ID48	IGLT20	St. Helena	LA2
ID49	IGLT21	St. Helena	LA2
ID50	IGLT22	St. Helena	LA2
ID51	IGLT23	St. Helena	LA2
ID52	IGLT24	St. Helena	LA2
ID53	IGLT59	St. Helena	PF
ID54	IGLT60	St. Helena	PF
ID55	IGLT61	St. Helena	PF
ID56	IGLT62	St. Helena	PF
ID57	IGLT50	St. Helena	PF
ID58	IGLT51	St. Helena	PF
ID59	IGLT52	St. Helena	PF
ID60	IGLT65	St. Helena	PL
ID61	IGLT66	St. Helena	PL
ID62	IGLT67	St. Helena	PL
ID63	IGLT69	St. Helena	PL
ID64	IGLT57	St. Helena	SI
ID65	IGLT64	St. Helena	PF 2
ID66	IGLT68	St. Helena	SH 9
ID67	IGLT12	St. Helena (camarão)	Sidnei II
ID68	IGLT13	St. Helena (camarão)	Sidnei II
ID69	IGLT56	St. Helena (camarão)	Sidnei II
ID70	LGLT1	-	Litoral
ID71	LGLT2	-	Litoral
ID72	LGLT3	-	Litoral
ID73	LGLT4	-	Litoral
ID74	LGLT5	-	Litoral
ID75	IGLT26	-	Zoo
ID76	IGLT28	-	Zoo
ID77	IGLT29	-	Zoo
ID78	IGLT53	-	Zoo

- representa origem ou grupo desconhecido.