

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Demografia e diversidade genética de onça-parda (*Puma concolor*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) da Estação Ecológica de Caetetus – SP e sua importância para a conservação desses felinos

Bruno Henrique Saranholi

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

São Carlos, SP

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Demografia e diversidade genética de onça-parda (*Puma concolor*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) da Estação Ecológica de Caetetus – SP e sua importância para a conservação desses felinos

Bruno Henrique Saranholi

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

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

São Carlos, SP

2013

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

S243dd Saranholi, Bruno Henrique.
Demografia e diversidade genética de onça-parda (*Puma concolor*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) da Estação Ecológica de Caetetus – SP e sua importância para a conservação desses felinos / Bruno Henrique Saranholi. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Genética de populações. 2. Genética da conservação. 3. DNA fecal. 4. Carnívoro. 5. Densidade. I. Título.

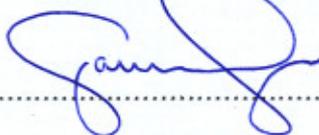
CDD: 575.15 (20^a)

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

Dissertação de Mestrado de
BRUNO HENRIQUE SARANHOLI

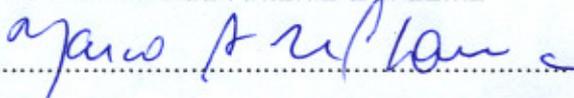
Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior



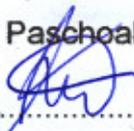
.....

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama



.....

Profa. Dra. Katia Maria Paschoaletto Micchi de Barros Ferraz



.....

Dedico este trabalho aos meus pais, Abilio e Rose, pelo carinho e apoio, e à Carla, minha inspiradora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior pela oportunidade e confiança inicial em participar do seu laboratório, antes mesmo de iniciar o projeto e, claro, pela oportunidade em poder desenvolvê-lo, estudando esses animais incríveis, nos quais sempre tive muito interesse.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida, colaborando com o desenvolvimento deste estudo.

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro.

À Estação Ecológica dos Caetetus e a todos seus funcionários que sempre nos receberam muito bem e deram total apoio às visitas a campo. Também agradeço à COTEC que nos forneceu a licença para a elaboração deste trabalho.

Ao CENAP (ICMBio), em especial ao Dr. Ronaldo Gonçalves Morato e à Dra. Beatriz de Mello Beisiegel, por terem nos recebido e colaborado com amostras utilizadas como controle.

À ONG IDEA WILD que nos forneceu equipamentos de campo.

À Dra. Renata Miotto Alonso, por fornecer alguns de seus dados permitindo a comparação entre nossas populações, contribuindo muito para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Giordano Ciocheti que gentilmente forneceu uma camera-trap, permitindo a captura de belas fotos.

Aos que me fizeram companhia durante o campo. Obrigado David Bui Van (“Carlitos”) e Carla Cristina Gestich (“Companhia especial”).

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação pelas experiências trocadas, dúvidas elucidadas e risadas.

À minha “companhia especial”, Carla, obrigado pelas discussões dos resultados, na ajuda com as dúvidas de estatística e por simplesmente sempre estar ao meu lado e por me apoiar. Obrigado, amor.

Por último, aos meus pais que são os maiores responsáveis por este trabalho se realizar, já que sem seu apoio, confiança e carinho isso nunca seria possível. Obrigado!

RESUMO

A perda e fragmentação do habitat, decorrentes da intensa intervenção antrópica, estão entre as principais ameaças às populações naturais. Espécies com baixa densidade e grandes áreas de vida, como os felinos, são ainda mais prejudicadas por essas mudanças. Na tentativa de minimizar esse impacto, a detecção da densidade populacional e a caracterização genética são necessárias para que medidas de conservação sejam propostas. Nesse sentido, o objetivo principal deste trabalho foi caracterizar populações de duas espécies de felinos, onça-parda (*Puma concolor*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) da Estação Ecológica dos Caetetus (EEC – SP, um dos últimos remanescentes de Mata Atlântica no interior do estado de São Paulo), quanto às suas características demográficas e genéticas, a partir de amostras não invasivas (fezes e pelos). Coletamos as amostras nas trilhas da EEC, das quais pudemos identificar as espécies, individualizar, sexar cada indivíduo e calcular a diversidade genética da população utilizando marcadores moleculares. A abundância foi estimada a partir do histórico de captura-recaptura com modelos de população aberta e fechada. Identificamos geneticamente 17 amostras de fezes de onça-parda e 12 de jaguatirica. Dessas amostras, individualizamos seis indivíduos de onça-parda e cinco de jaguatirica, sendo esses os tamanhos populacionais mínimos para todo o período de amostragem (18 meses, entre dezembro de 2010 a maio de 2013). Os valores de estimativa de abundância e densidade utilizando o modelo de população fechada foram mais próximos ao encontrado na individualização genética, sendo cinco indivíduos para cada espécie e densidades de 4,92/100 km² (*P. concolor*) e 19,51/100 km² (*L. pardalis*). A diversidade genética encontrada para as duas espécies foi menor quando comparada com outros trabalhos, provavelmente ao menor fluxo gênico com outras populações devido à fragmentação da paisagem. Além disso, a diversidade genética encontrada para *L. pardalis* foi menor quando comparada a *P. concolor*, possivelmente relacionado ao hábito da espécie em evitar áreas mais abertas e antropizadas, o que pode reduzir o potencial de fluxo gênico. Já para *P. concolor* foi encontrada estruturação com populações de outras localidades, mas também identificamos fluxo gênico, inclusive com relações de parentesco. Dessa forma, os resultados obtidos de demografia e diversidade genética demonstram a importância da Estação Ecológica dos Caetetus para essas espécies e também ressalta a importância da criação de medidas que permitam a viabilidade de suas populações a longo prazo, como as que facilitem fluxo gênico com indivíduos de outras localidades.

Palavras-Chave: DNA fecal. Amostras não invasivas. Conservação. Carnívoros. Densidade.

ABSTRACT

The loss and fragmentation of habitat due to intensive human intervention are the main threats to natural populations. Species with low density and large home range, like felids, are the most threatened species by these changes. In an attempt to minimize this impact, detection of population density and genetic characterization are necessary to propose conservation measures. Thus, the main objective of this study was to characterize the populations of two species of felines, cougars (*Puma concolor*) and ocelots (*Leopardus pardalis*) of Caetetus Ecological Station (EEC - SP, one of the last remnants of Atlantic Forest within the state of São Paulo), about their demographic and genetic characteristics from non-invasive samples (feces and hairs). We collected the samples on EEC tracks and identified the species, individualized each sample, sexed each individual and calculated the genetic diversity of the population using molecular markers. Abundance was estimated from the capture-recapture historic, with opened and closed population models. We identified 17 samples of feces cougar and 12 of ocelot. Of these samples, six individuals were individualized as cougar and five as ocelot, these numbers represent the minimum population sizes for the entire sample period (18 months). The values of abundance and density estimated using the model of closed population was more similar to that found in genetic individualization, five individuals for each species and densities of 4.92/100 km² (*P. concolor*) and 19.51/100 km² (*L. pardalis*). The genetic diversity of the two species was lower than that from other studies, probably due the landscape's fragmentation, which reduces the gene flow with others populations. Also, the genetic diversity for *L. pardalis* was lower than *P. concolor*, which is possibly related to the ocelot behavior of avoid opened and disturbed areas, which can reduce the potential for gene flow. Furthermore, we also observed structure of *P. concolor* from EEC with populations from other locations, but we also identified gene flow, including relatedness. Thus, the results of genetic diversity and demographics demonstrate the importance of the Ecological Station Caetetus for these species and also underscores the importance of establishing measures to enable the viability of its populations over long term, as facilitating gene flow with individuals from others locations.

Key-Words: Fecal DNA. Noninvasive samples. Conservation. Carnivores. Density.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites isolados para <i>Puma concolor</i> (KURUSHIMA et al., 2006)	27
Tabela 2. Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites isolados para <i>Felis catus</i> (MENOTTI-RAYMOND et al.,1999) utilizados para <i>Puma concolor</i>	27
Tabela 3. Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites isolados para <i>Felis catus</i> (MENOTTI-RAYMOND et al.,1999)	28
Tabela 4: Informações sobre os indivíduos de cada espécie	37
Tabela 5: Caracterização dos <i>loci</i> de microssatélites para <i>Puma concolor</i>	38
Tabela 6: Caracterização dos <i>loci</i> de microssatélites para <i>Leopardus pardalis</i>	39
Tabela 7: Resultados das estimativas de abundância pelos três métodos utilizados	39
Tabela 8: Tabela com o histórico de captura-recaptura dos indivíduos de <i>Puma concolor</i> e <i>Leopardus pardalis</i>	40
Tabela 9: Resultados das estimativas de densidade utilizando a abundância obtida pelos dois métodos utilizados	41
Tabela 10: Parentesco entre os indivíduos	42
Tabela 11: Características dos <i>loci</i> de microssatélites e dados de diversidade genética para <i>Puma concolor</i>	43
Tabela 12: Características dos <i>loci</i> de microssatélites e dados de diversidade genética para <i>Leopardus pardalis</i> utilizados	43
Tabela 13: Frequência de alelos nulos estimada pelo método de Oosterhout para <i>Puma concolor</i>	44
Tabela 14: Frequência de alelos nulos estimada pelo método de Oosterhout para <i>Leopardus pardalis</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cobertura original e Remanescentes de Mata Atlântica. (Adaptado de: São Paulo, Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar, 2006).....	11
Figura 2: Fotos de indivíduos de <i>Puma concolor</i> . (A) Fotografia tirada com <i>camera-trap</i> na Estação Ecológica dos Caetetus (Foto-Bruno Henrique Saranholi). (B) Foto: James Carmichael Jr. (fonte: arike.org).	13
Figura 3: Fotos de indivíduos de <i>Leopardus pardalis</i> . Fotos: Ken Cole (esquerda) e Andy Rose (direita). Fonte: arkive.org.....	13
Figura 4: Mapa da distribuição das espécies onça-parda (<i>Puma concolor</i>) e jaguatirica (<i>Leopardus pardalis</i>). Fonte: IUCN, 2012.....	15
Figura 5: Localização da Estação Ecológica dos Caetetus.....	18
Figura 6: Imagem de satélite sobre a Estação Ecológica dos Caetetus, demonstrando um dos poucos fragmentos de Mata Atlântica nesta região do estado de São Paulo. (Fonte: Google Earth [®])... ..	19
Figura 7: Matriz da Estação Ecológica dos Caetetus.. ..	19
Figura 8: Principais trilhas e estradas percorridas.	20
Figura 9: (A) Pegada de onça-parda. (B) Pegada de jaguatirica (foto: Raphael Oliveira). (C) Fezes de onça-parda.	21
Figura 10: (A) Modelo de armadilha utilizado constituído apenas pelo pedaço de velcro preso à árvore. (B) Modelo de armadilha constituído pelo cano de PVC juntamente com os pedaços de velcro.	22
Figura 11: Pontos de instalação das armadilhas de pelo.	23
Figura 12: Reação de amplificação usando a “cauda” universal e o primer M13 marcado com fluoróforo (Adaptado de Schuelke, 2000). (A e B) são os primers para amplificação do fragmento de interesse. (C) é o primer M13 marcado com o fluóroforo. (D) é amostra de DNA incorporado com o primer forward contendo a “cauda” de 18 pb complementar ao primer M13. (E e F) é o ciclo específico do M13, onde ele é incorporado ao produto de PCR.....	29
Figura 13: Árvore <i>neighbor-joining</i> das sequências de citocromo b analisadas, tendo <i>Panthera onca</i> como grupo externo. GB são as amostras de referência do <i>GenBank</i> . Os números sobre os braços da árvore são os valores de <i>bootstrap</i> para 1000 replicações.....	35

Figura 14: Região do citocromo b onde foi possível visualizar os sítios de diferenciação entre as espécies identificadas no trabalho e da espécie <i>P. onca</i> utilizada como grupo externo. (GB) sequências de referência do <i>GenBank</i>	36
Figura 15: Sexagem dos indivíduos em gel de agarose 2%. (A) Indivíduos de onça-parda; (B) Indivíduos de jaguatirica; (L) <i>Ladder</i> 1Kb (Invitrogen®); (M) Macho; (F) Fêmea....	37
Figura 16: Ponto de coleta das amostras de cada indivíduo de ambas as espécies..	38
Figura 17: Áreas efetivamente amostradas (representadas pelos <i>buffers</i>) para cada espécie utilizando o ½MMDM	41
Figura 18: Gráfico de barras obtido pelo Structure com k=2, mostrando uma pequena estruturação entre os nossos indivíduos e os de Miotto et al. (2011)	45
Figura 19: Estimativa do número de populações utilizando o método de Evanno et al. (2005).	45
Figura 20: Análise de correspondência fatorial mostrando a presença de dois grupos: população de Miotto et al. (2011) (esquerda) e outro grupo formado pela população da EEC (direita).....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 <i>Área de Estudo</i>	18
3.2 <i>Obtenção das amostras</i>	19
3.3 <i>Extração do DNA</i>	23
3.4 <i>Diagnóstico da espécie</i>	25
3.5 <i>Amplificação dos loci de microssatélites e genotipagem</i>	26
3.6 <i>Determinação do sexo</i>	29
3.7 <i>Análise dos dados</i>	30
3.7.1 <i>Identificação das espécies das amostras coletadas</i>	30
3.7.2 <i>Individualização das amostras</i>	30
3.7.3 <i>Demografia</i>	31
3.7.4 <i>Parentesco</i>	32
3.7.5 <i>Análises populacionais</i>	32
4. RESULTADOS	34
4.1 <i>Coleta das amostras e identificação das espécies</i>	34
4.2 <i>Individualização das amostras e sexagem</i>	37
4.3 <i>Demografia</i>	39
4.4 <i>Parentesco</i>	41
4.5 <i>Estimativa de diversidade genética</i>	42
4.6 <i>Análises entre populações</i>	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população humana e suas atividades desenfreadas têm ameaçado a biodiversidade global. A intensa exploração e intervenção humana têm causado grandes alterações no ambiente, modificando processos ecológicos e genéticos das populações (CHAPIN III et al., 2000). Dentre as consequências das ações antrópicas estão a perda e fragmentação de habitat, que são consideradas as principais ameaças para as espécies (CZECH; KRAUSMAN; DEVERS, 2000; CHIVIAN, 2002). Essas ameaças podem causar alterações permanentes no ambiente (MARKOVCHICK-NICHOLLS et al., 2008), resultando em graves consequências para as populações, como o impedimento do fluxo gênico (FRANKHAM, 1996), a perda da diversidade genética (HELLER; OKELLO; SIEGISMUND, 2010) e a redução do seu tamanho efetivo. Tais fatores tornam as populações mais sensíveis a eventos estocásticos, tanto ambientais, demográficos ou genéticos (como depressão endogâmica) (FRANKHAM, 1995), levando a redução do potencial adaptativo (FRANKHAM, 1996), que pode causar extinção dessas espécies (SPIELMAN et al., 2004). Devido a isso, o ritmo da extinção que observamos hoje é muito maior do que já observado (CHIVIAN, 2002; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Calcula-se que as ações antrópicas sejam responsáveis pela extinção de 5% a 20% das espécies (LAWTON; MAY, 1995), tornando a taxa de extinção cerca de 100 a 1.000 vezes maior que em situações sem a intervenção humana (PIMM et al., 1996).

No Brasil, a destruição do habitat é considerada o principal fator de ameaça para 88,4% das espécies de mamíferos (IBAMA; MMA, 2008). Entre os principais biomas do mundo que se apresentam em grave situação de ameaça e que necessitam de estudos para a sua conservação está a Mata Atlântica (TABARELLI et al., 2005). Atualmente, restam apenas cerca de 12% a 16% dos 150 milhões de ha de sua cobertura original (Figura 1) (RIBEIRO et al., 2009). O maior fragmento remanescente está localizado na Serra do Mar, estendendo-se do Estado de São Paulo até o sul do Estado do Rio de Janeiro, representando 7% do que ainda resta de Mata Atlântica. Porém, a maior parte do que resta de mata nativa está espalhada em pequenos fragmentos (menores que 250 ha) que representam 42% da cobertura atual da Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 2009) e apenas 9,3% desses remanescentes estão dentro de Unidades de Conservação.

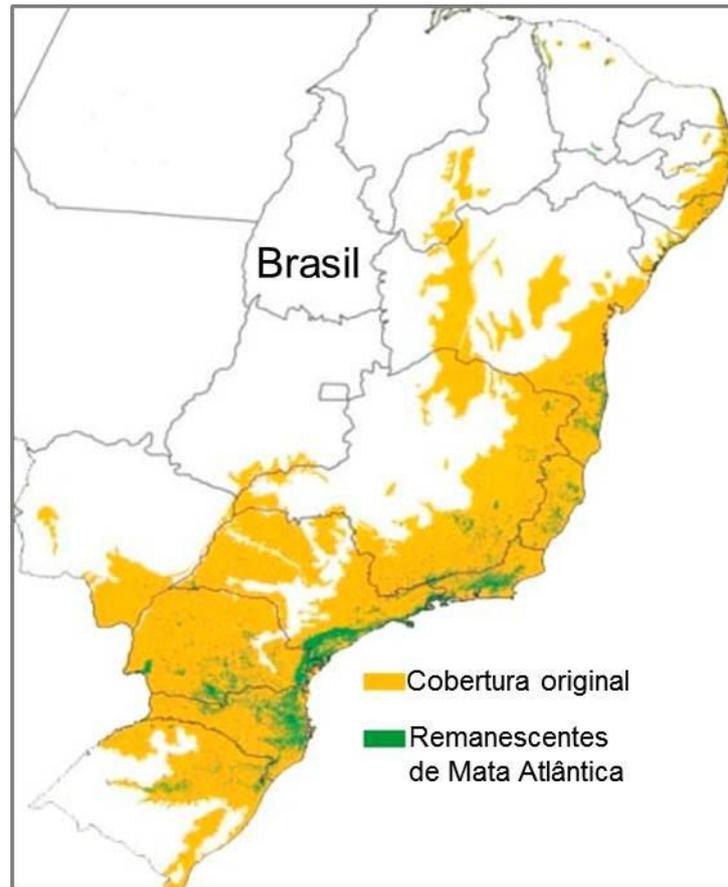


Figura 1: Cobertura original e Remanescentes de Mata Atlântica. (Adaptado de: São Paulo, Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar, 2006).

A Mata Atlântica abriga a maior parte (68,9%) da nossa fauna ameaçada (IBAMA; MMA, 2008). Dentre as 276 espécies de mamíferos que ocorrem nesse bioma, estão carnívoros como *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Leopardus pardalis* (jaguaririca), *Puma concolor* (onça-parda) e *Panthera onca* (onça-pintada) (São Paulo, 2006).

Alguns estudos mostram que populações de mamíferos carnívoros são os mais vulneráveis à extinção em áreas fragmentadas devido à sua baixa densidade e à necessidade de uma grande área de vida (NOSS et al., 1996; WOODROFFE; GINSBERG, 1998), assim a perda e a fragmentação dos habitats são as principais ameaças para esse grupo.

Devido à perda de seus habitats, essas espécies ficam sujeitas a outros riscos, como atropelamentos ao se deslocarem entre fragmentos vizinhos em busca de recursos (IBAMA; MMA, 2008), mortes em conflitos com fazendeiros (CONFORTI; DE AZEVEDO, 2003) e aquisição de doenças devido ao contato com animais domésticos (WEBER; RABINOWITZ, 1996).

As alterações nas populações de carnívoros também podem provocar mudanças na biodiversidade local, pois esses animais têm um importante papel na manutenção da biodiversidade, determinando a permanência e manutenção de outras espécies (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). O controle do tamanho populacional realizado pela predação por carnívoros permite manter o equilíbrio dos ambientes onde vivem, já que sem esse controle haveria, por exemplo, uma explosão no tamanho populacional de herbívoros, que por sua vez, alterariam a comunidade de plantas e, assim, provocariam uma alteração em toda a dinâmica do ecossistema (MILLER et al., 2001). Por serem predadores topo de cadeia, possuem grandes áreas de vida para atenderem todas as suas necessidades de recursos (NOSS et al., 1996; WOODROFFE; GINSBERG, 1998) e, assim, englobam a área de vida de muitas outras espécies. Dessa forma, os carnívoros são considerados “espécies-chave” para a conservação, pois ao conservá-los, também estaremos conservando as demais espécies que ocorrem no ambiente (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Entre os carnívoros ameaçados estão as onças-pardas (*Puma concolor*) (Figura 2) e jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (Figura 3), que são predadores topo de cadeia e estão classificadas como vulneráveis pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis e Ministério do Meio Ambiente (2008). A perda e a fragmentação do habitat tem sido a principal ameaça para essas espécies, pois são obrigados a dispersarem em busca de recursos, assim, acabam sofrendo conflitos com humanos e atropelamentos (IBAMA; MMA, 2008). Além disso, onças-pardas atacam criações de animais domésticos, tornando-se alvos de fazendeiros (CONFORTI; DE AZEVEDO, 2003).

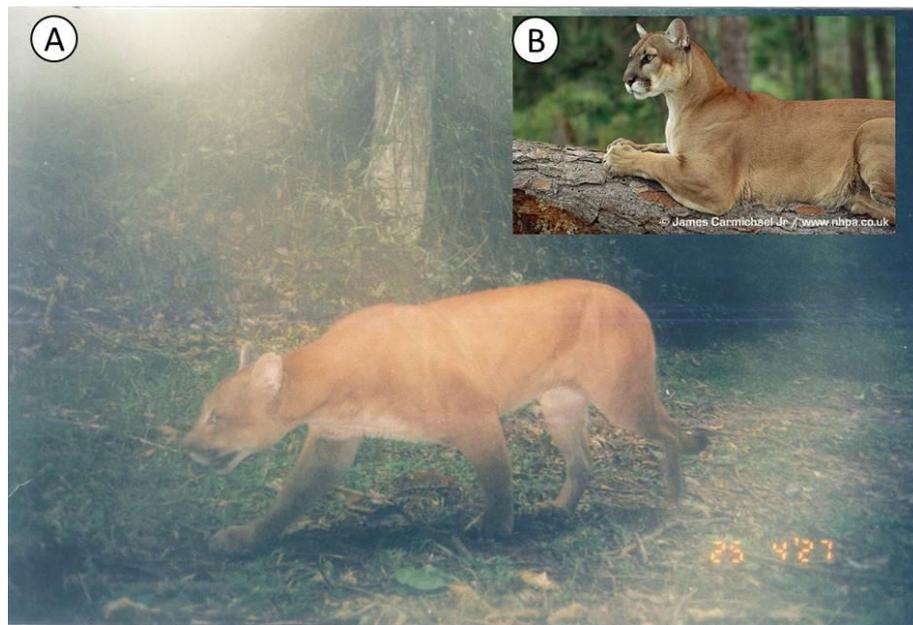


Figura 2: Fotos de indivíduos de *Puma concolor*. (A) Fotografia tirada com *camera-trap* na Estação Ecológica dos Caetetus (Foto-Bruno Henrique Saranholi). (B) Foto: James Carmichael Jr. (fonte: arike.org).



Figura 3: Fotos de indivíduos de *Leopardus pardalis*. Fotos: Ken Cole (esquerda) e Andy Rose (direita). Fonte: arkive.org.

A espécie *Puma concolor* (onça-parda) é a segunda maior espécie de felídeo no Brasil. É um animal de grande porte, podendo pesar até 70 kg. Seu corpo é longo e esguio com comprimento médio de 108 cm (cabeça e corpo) e uma longa cauda que pode chegar a 81,5 cm (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Suas presas são porcos-do-mato (*Tayassu pecari*), veados (*Mazama spp.*), pacas (*Cuniculus paca*), capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) entre outros (CHEIDA et al., 2006). É um animal territorialista e costuma marcar seu território depositando suas fezes em lugares proeminentes, como trilhas, pedras e troncos (CHAME,

2003). O tamanho da sua área de vida depende de diversos fatores, como tamanho e sexo dos indivíduos e disponibilidade de presas, (GRIGIONE et al., 2002), entretanto, segundo Sweanor, Logan e Hornocker (2000), geralmente necessitam de áreas maiores que 100 km².

A espécie possui ampla distribuição no continente Americano, desde o sul do Canadá até o extremo sul do Chile e Argentina (IUCN, 2012) (Figura 4). Mesmo apresentando uma maior plasticidade de ocupação de ambientes e capacidade de deslocamento por áreas mais antropizadas, as populações de onça-parda frequentemente mostram-se estruturadas, assim, o aumento da deterioração do hábitat diminui as possibilidades de fluxo gênico e de persistência dessas populações (SWEANOR; LOGAN; HORNOCKER, 2000).

A espécie *Leopardus pardalis* (jaguaritica) é considerada um animal de porte médio, com comprimento de 67 cm a 101,5 cm (cabeça mais corpo) e cauda com cerca de 35 cm (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Os machos podem pesar até 16,5 kg e, geralmente, são maiores que as fêmeas, que chegam até 9,2 kg. A dieta da espécie consiste principalmente de animais pequenos como marsupiais, pequenos roedores, aves e lagartos (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Porém, também há registros de presas maiores como bugio (*Alouatta guariba*), miqui (*Brachyteles hypoxanthus*) e macaco-prego (*Cebus apella*) (BIANCHI e MENDES, 2007), indicando sua capacidade de predação de animais arborícolas. A sua área de vida pode chegar a 50,9 km² (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Sua distribuição vai desde o extremo sul dos Estados Unidos até o nordeste da Argentina e sul do Brasil e Uruguai (IUCN, 2012) (Figura 4).



Figura 4: Mapa da distribuição das espécies onça-parda (*Puma concolor*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Fonte: IUCN, 2012.

As jaguatiricas são mais sensíveis ao cenário de fragmentação, já que são menos “toleráveis” às áreas antropizadas (DI BITETTI et al., 2008) e por evitarem áreas abertas para locomoção (MURRAY; GARDNER, 1997). Janečka et al. (2011) sugerem que essa forte associação da espécie a áreas de vegetação mais densa tenha sido o motivo do completo isolamento e redução da variabilidade genética em duas populações de jaguatirica no Texas.

A alta ocorrência que essas espécies possuem na Mata Atlântica (OLIVEIRA; CASSARO, 1999), um dos biomas mais ameaçados (TABARELLI et al., 2005) e em grave situação de fragmentação (RIBEIRO et al., 2009), faz com que sejam necessários mais estudos que permitam compreender como suas populações se comportam dentro desse cenário de perda e fragmentação do ambiente em que vivem.

Nesse contexto, técnicas moleculares têm sido utilizadas para a obtenção de informações genéticas sobre as populações e também têm possibilitado outros tipos de estudos como os de ocorrência, abundância e densidade (DEYOUNG; HONEYCUTT; BRENNAN, 2005; RUELL; CROOKS, 2007). Tais estudos demográficos são importantes, pois permitem verificar o *status* em que as populações se encontram, tornando-se o primeiro passo para que sejam propostas medidas de conservação (PALOMARES et al., 2002). Outra característica dos marcadores moleculares é que eles permitem obter todas essas informações

a partir de amostras não invasivas (por exemplo, fezes e pelos) (DEYOUNG; HONEYCUTT; BRENNAN, 2005; RUELL e CROOKS, 2007).

Cada marcador molecular empregado nas análises genéticas apresentam características próprias, dessa forma, cada um deles é mais adequado à resolução de questões específicas (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003). Na Genética da Conservação, os microssatélites e as sequências de DNA mitocondrial têm sido amplamente utilizados, inclusive em conjunto com amostras não invasivas (FARRELL; ROMAN; SUNQUIST, 2001; MICHALSKI et al., 2011; MIOTTO, R. et al., 2011; CHAVES et al., 2012).

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é uma molécula circular, haplóide e abundante nas células devido à grande quantidade de mitocôndrias presentes nelas (FRANKHAM et al., 2008). Suas características, como ausência de recombinações, alta taxa de evolução e alto polimorfismo em algumas regiões, permitem que ele seja utilizado na identificação de espécies, inclusive as mais proximamente relacionadas (PEREZ-SWEENEY et al., 2003; FRANKHAM et al., 2008). Mesmo pequenas sequências são suficientes para a identificação de espécies (FARRELL; ROMAN; SUNQUIST, 2001), o que torna esse marcador efetivo quando se trabalha com amostras não invasivas, onde frequentemente encontramos o DNA degradado (PALOMARES et al., 2002).

Os microssatélites são pequenas unidades de sequências de um a seis pares de bases repetidos lado a lado (como, TATATA ou TCGTCGTCG) (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Essas unidades podem ser dímeros, trímeros, tétrades ou uma combinação deles (compostos). Possuem ampla distribuição no genoma, tamanho pequeno e alto grau de polimorfismo (CHISTIAKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006). O seu alto polimorfismo se deve a deslizamentos da DNA polimerase durante a replicação, produzindo um aumento ou diminuição do número de repetições (TAUTZ; SCHLÖTTERER, 1994).

Além disso, apresentam herança codominante, ou seja, é possível identificar os dois alelos de um *locus* separadamente (SUNNUCKS, 2000). São considerados seletivamente neutros, ou seja, não codificam nenhum produto na maioria dos seus *loci*, o que possibilita que sejam utilizados para comparar a diversidade genética entre populações (SELKOE; TOONEN, 2006).

Os microssatélites fornecem dados sobre a diversidade genética, fluxo gênico, e parentesco (CHISTIAKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006). Além disso, a individualização de amostras é possível a partir de um painel *multilocus* (CHISTIAKOV;

HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006), característica essa que permite que os microsatélites sejam utilizados em estudos demográficos. Os seus produtos de amplificação são geralmente pequenos, o que possibilita que sejam empregados em amostras não invasivas (FRANKHAM et al., 2008), onde geralmente encontramos um DNA degradado (PALOMARES et al., 2002).

Assim, além das análises genéticas permitirem acessar diversos tipos de informações, também minimizam os impactos nas populações de estudo ao permitirem a obtenção dos dados sem a captura do animal (KOHN; WAYNE, 1997). Essa abordagem torna-se ainda mais valiosa para espécies como os carnívoros, pois apresentam como características baixa densidade, hábitos noturnos e grandes áreas de vida (KOHN; WAYNE, 1997), fatores esses que dificultam a coleta de dados biológicos deste grupo em vida livre.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estimar o tamanho populacional mínimo e a densidade populacional das espécies *Puma concolor* e *Leopardus pardalis*, além da diversidade genética das populações dessas espécies e inferir sobre seu *status* de conservação na Estação Ecológica dos Caetetus (SP), utilizando marcadores moleculares em amostras não invasivas (pelos e fezes). Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Identificar a espécie a qual pertence cada amostra de fezes de felino coletada;
- Individualizar as amostras coletadas, identificadas como *P. concolor* e *L. pardalis*, e estimar o tamanho mínimo das populações de ambas as espécies;
- Estabelecer a proporção sexual;
- Verificar as relações de parentesco entre os indivíduos;
- Estimar a abundância das espécies pelo método captura-recaptura;
- Estimar o tamanho efetivo (N_e) da população;
- Verificar a diversidade genética dessas populações;
- Comparar os resultados de diversidade genética e dados demográficos entre as duas espécies levando-se em consideração seus aspectos biológicos e ecológicos;
- Verificar a ocorrência de fluxo gênico com indivíduos de outras localidades;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

A Estação Ecológica dos Caetetus (EEC) (Figura 5) está localizada nos municípios de Gália (SP) e Alvilândia (SP), entre as coordenadas 22°20' e 22°30' S e 49°40' e 49°45' W, totalizando 2.176,10 ha. É o único fragmento maior que 1.000 ha num raio de 200 km (TABANEZ et al., 2005) (Figura 6) e possui um entorno composto por fazendas com criação de gado e cultivos como café, soja e milho (Figura 7) (TABANEZ et al., 2005).

A vegetação da área é classificada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (1988) como Floresta Estacional Semidecidual (vegetação típica do Bioma Mata Atlântica), representando um dos poucos remanescentes de Mata Atlântica no interior do Estado de São Paulo, sendo considerada pelo Ministério do Meio Ambiente (2002) uma das áreas prioritárias para conservação da Mata Atlântica devido à biodiversidade encontrada nela.

A fauna da EEC compreende 196 espécies de aves e diversas espécies de mamíferos. Dentre essas espécies, são encontrados catetos (*Tayassu tajacu*), queixada (*Tayassu pecari*), anta (*Tapirus terrestres*), cutia (*Dasyprocta azarae*), tapiti (*Sylvilagus brasiliensis*) paca (*Agouti paca*) e o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) (TABANEZ et al., 2005). Todas essas espécies são potenciais presas para os felinos.

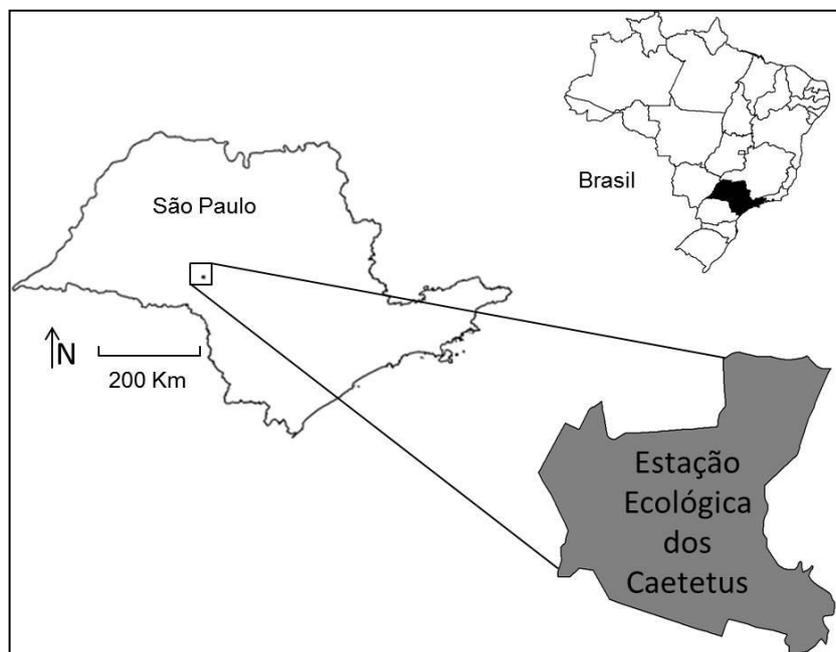


Figura 5: Localização da Estação Ecológica dos Caetetus.



Figura 6: Imagem de satélite sobre a Estação Ecológica dos Caetetus, demonstrando um dos poucos fragmentos de Mata Atlântica nesta região do estado de São Paulo. (Fonte: Google Earth®).

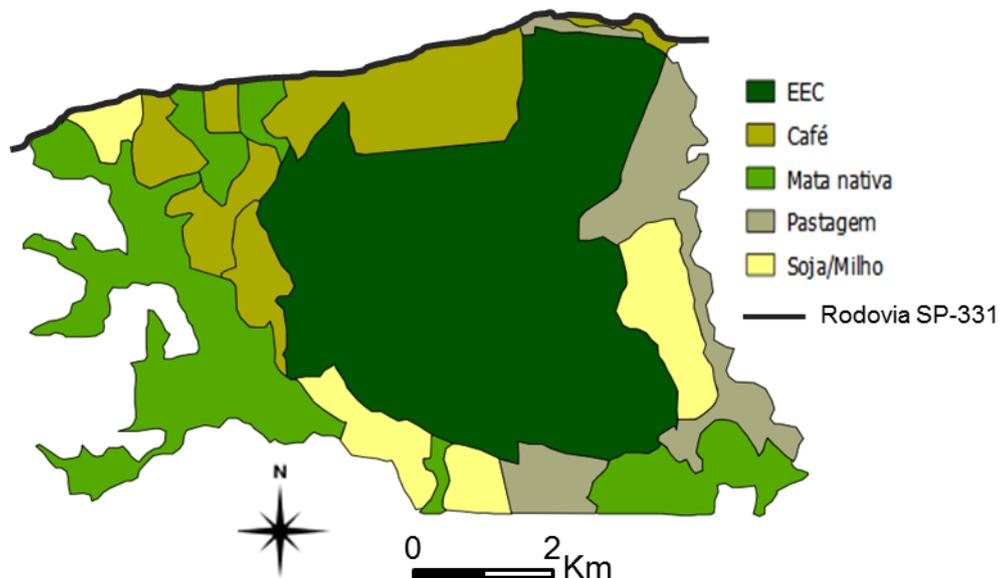


Figura 7: Matriz da Estação Ecológica dos Caetetus.

3.2 Obtenção das amostras

Fezes

As coletas das amostras de fezes foram feitas percorrendo a trilha principal da EEC (“Trilha do Jipi”) e pequenas trilhas adjacentes a ela, além de trechos no entorno da Estação, onde era permitida a passagem pelos fazendeiros, totalizando cerca de 30 km percorridos (Figura 8). Para fim de padronização do esforço amostral, percorremos sempre os mesmos trajetos. Realizamos visitas mensais de dois dias no período de dezembro de 2010 a maio de

2012, totalizando 18 meses de coleta. A morfologia das fezes, assim como a presença de pegadas próximas a elas (Figura 9), foram utilizadas como indícios que ajudassem a identificar as amostras que potencialmente seriam de felinos.

Foi retirado um pedaço (aproximadamente cinco cm) da porção externa das fezes coletadas, colocado em tubos de polipropileno contendo álcool 96°C e armazenado em freezer a -20°C. Os pontos de coleta de cada amostra foram registrados com um GPS.

Descartamos das análises fezes muito antigas, já esbranquiçadas e atacadas por muitos insetos, e também aquelas que foram parcialmente dissolvidas pela chuva, pois grande parte da porção externa é perdida com a água.

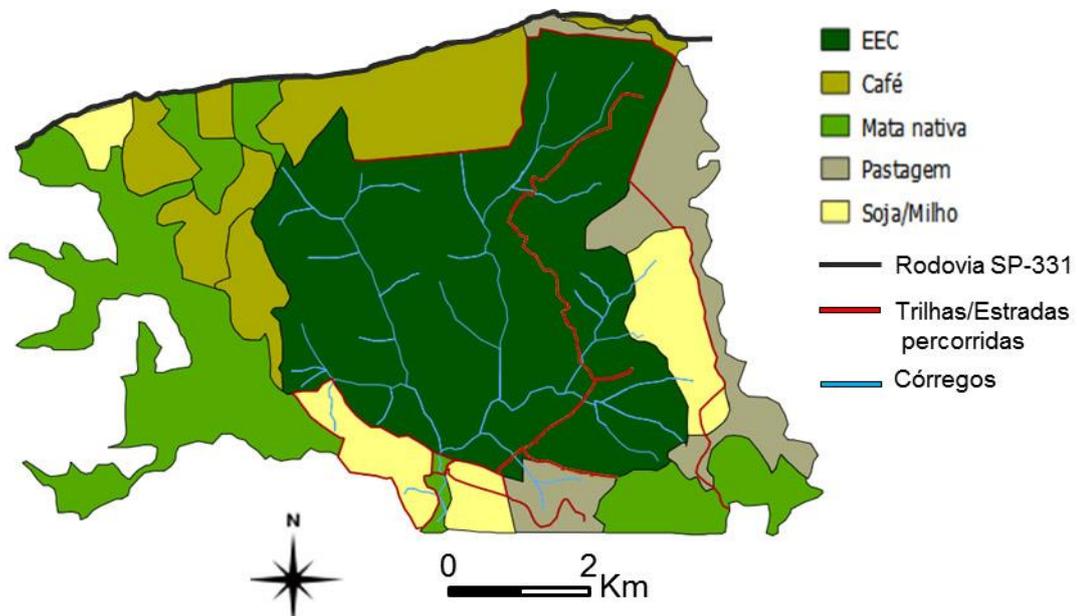


Figura 8: Principais trilhas e estradas percorridas.

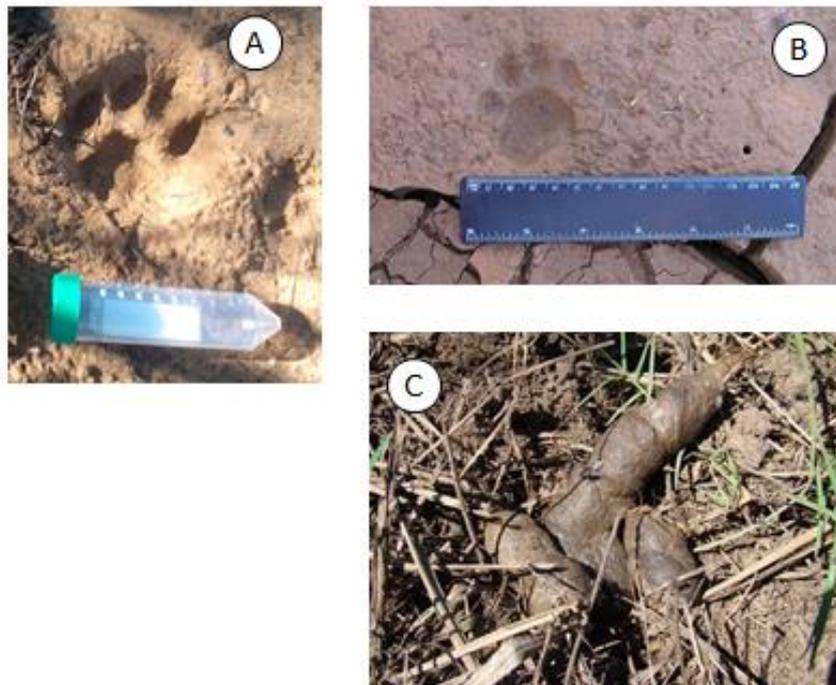


Figura 9: (A) Pegada de onça-parda (foto: Bruno Henrique Saranholi). (B) Pegada de jaguatirica (foto: Raphael Oliveira). (C) Fezes de onça-parda (foto: Bruno Henrique Saranholi).

Pelos

Para a obtenção das amostras de pelos, utilizamos dois modelos de armadilhas adaptadas de Weaver et al. (2005). O primeiro modelo utilizado era composto por um quadrado de velcro de 20cmx20cm fixados com auxílio de um grampeador automático nas árvores. Elas foram fixadas a uma altura de 40 cm do solo para que fossem acessíveis às duas espécies (Figura 10A). O segundo modelo testado era composto por um cano de PVC com 1m de altura e 10 cm de diâmetro. A 30 cm e 70 cm de sua base, colamos um pedaço de velcro com 20cm de altura (Figura 10B). O uso do cano de PVC é uma tentativa de atrair mais a atenção do animal visualmente, além do odor (MARTINS, 2009). Nos dois modelos de armadilha, a erva *Nepeta cataria* (erva-de-gato), conhecida por seu alto potencial em atrair felinos (PALEN e GODDARD, 1966), e a canela em pó foram utilizadas como atrativos para os felinos.

A distribuição das armadilhas estava concentrada no interior da EEC (“Trilha do Jipi”). A “Trilha do Jipi” é a principal trilha aberta que corta a Estação Ecológica, com um comprimento total de cerca de 9 km (Figura 11).

Ao longo da trilha, existem vários pontos com córregos onde é comum avistar rastros e fezes dos animais. Assim, a escolha da “Trilha do Jipi” como principal ponto de coleta das

amostras de pelo deve-se ao fato de comumente serem avistadas fezes e pegadas ao longo desse percurso, além de evitar que as armadilhas fossem mexidas pelas pessoas que trabalham nas plantações no entorno de EEC. Um total de 32 armadilhas de pelo foi instalado (1,47 armadilhas/km²).

As amostras de pelos coletadas foram depositadas em tubos de polipropileno e armazenadas em freezer a -20°C até que o DNA fosse extraído.



Figura 10: (A) Modelo de armadilha utilizada constituído apenas pelo pedaço de velcro preso à árvore. (B) Modelo de armadilha constituído pelo cano de PVC juntamente com os pedaços de velcro.

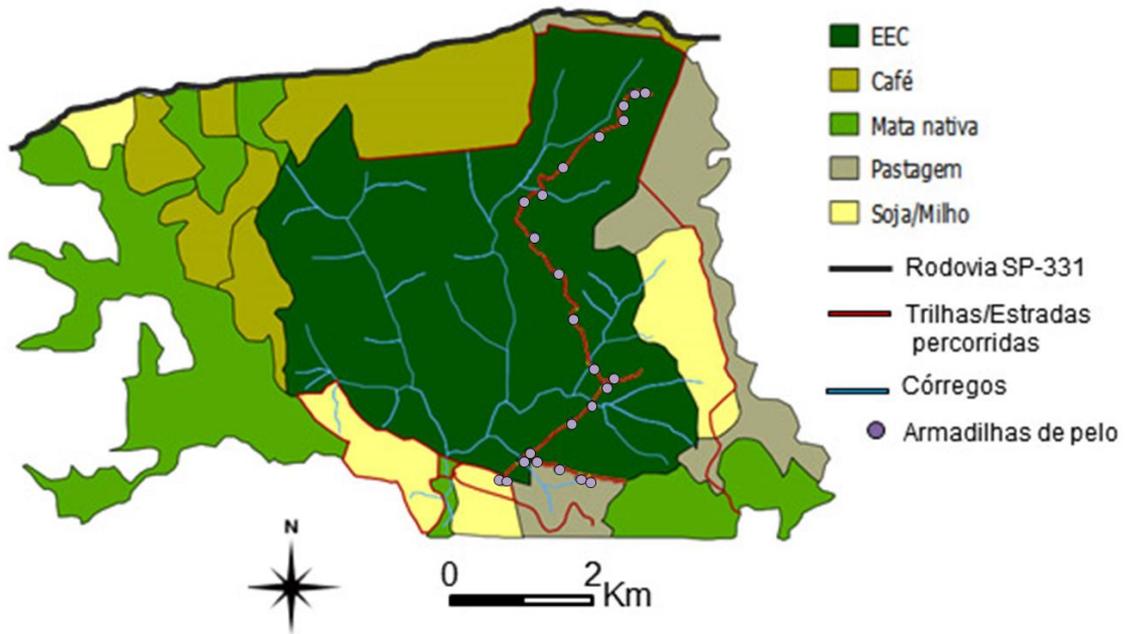


Figura 11: Pontos de instalação das armadilhas de pelo.

3.3 Extração do DNA

Fezes

A extração do DNA das amostras de fezes foi feita utilizando o kit de extração “PSP® Spin Stool DNA Kit” (Invitex). A sua utilização se deve ao fato de ser desenvolvido especificamente para esse tipo de amostra, permitindo a retirada dos inibidores de PCR.

O protocolo utilizado foi o mesmo proposto pelo fabricante do kit com algumas modificações:

1. Primeiramente, deve-se colocar um pedaço da amostra sólida em álcool 100% e, em seguida, vortexar para obter uma amostra homogênea liquefeita. O procedimento deve ser repetido até se obter o volume necessário (500-1000 μ L).
2. Colocar 200-400 μ L da amostra liquefeita no tubo “*Safe-Lock-Tube*” de 2,0 mL. Em seguida, adicionar 1,2 mL do tampão de lise “*Lysis Buffer P*” em cada amostra. Vortexar vigorosamente por um minuto e incubar a amostra por 15 minutos a 95°C agitando constantemente. Centrifugar a amostra a 13200 rpm (11688g) por dois minutos.
3. Transferir o sobrenadante para o tubo “*InviAdsorb-Tube*” e vortexar vigorosamente por 15 segundos. Incubar a suspensão por um minuto à temperatura ambiente e centrifugar a amostra a 13200 rpm (11688g) por seis minutos.
4. Transferir o sobrenadante completamente para um novo tubo de 1,5 mL e descartar o *pellet*. Em seguida, centrifugar a amostra a 13200 rpm (11688g) por seis minutos.

5. Pipetar 25 μL de Proteinase K em um novo tubo de 1,5 mL e transferir 400 μL do sobrenadante do passo quatro para o tubo de 1,5 mL contendo a Proteinase K. Vortexar rapidamente e incubar a amostra por 15 minutos a 70°C agitando constantemente.
6. Adicionar 400 μL do tampão “*Binding Buffer P*” na mistura do passo cinco e vortexar rapidamente.
7. Preparar o tubo para a lavagem do DNA colocando o “*Spin Filter*” no tubo “*Receiver Tube*” de 2 mL. Transferir toda a mistura para o “*Spin Filter*”. Incubar por um minuto à temperatura ambiente e centrifugar a 12000 rpm (9659g) por 90 segundos e descartar o filtrado.
8. Adicionar 500 μL do tampão “*Wash Buffer I*” no “*Spin Filter*” e centrifugar a 12000 rpm (9659g) por 90 segundos. Descartar o filtrado.
9. Adicionar 800 μL do tampão “*Wash Buffer II*” no “*Spin Filter*” e centrifugar a 12000 rpm (9659g) por 90 segundos e descartar o filtrado.
10. Para remover o etanol centrifugar a 13200 rpm (11688g) por três minutos.
11. Colocar o “*Spin Filter*” em um novo tubo “*Receiver Tube*” de 1,5 mL e adicionar 100 μL pré-aquecidos (70°C) do tampão de eluição “*Elution Buffer D*”. Incubar por sete minutos, centrifugar a 8000 rpm (4293g) por dois minutos. Finalmente, descartar o “*Spin Filter*”.
12. Armazenar o DNA a -20°C.

Pelos

Para a extração de DNA das amostras de pelos, utilizamos o protocolo de fenol-clorofórmio de Sambrook et al. (1989) com algumas modificações. A extração foi feita utilizando sempre apenas um pelo por vez, pois as amostras de pelos coletadas na mesma armadilha poderiam ser de indivíduos diferentes. Protocolo utilizado:

1. Adicionar 500 μL de Tampão de Lise (Tris HCl - 50mM; EDTA - 50mM e NaCl 100mM) e 20 μL SDS (10%) por amostra. Deixar em banho-maria durante 1 hora a 37°C.
2. Colocar 25 μL de proteinase K por amostra e deixar em banho-maria a 55°C por cerca de 3 horas ou até a digestão completa do tecido.
3. Adicionar o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e agitar os tubos por 10 minutos.
4. Centrifugar a 14.500 rpm (14103g) por 15 minutos.
5. Recuperar o sobrenadante.

6. Centrifugar novamente por mais 10 minutos (para verificar se ainda há “impurezas” no sobrenadante recuperado).
7. Acrescentar NaCl - 5M de modo que a concentração final da solução seja de 1M (volume/5).
8. Completar o volume com álcool 100% gelado e verter delicadamente o tubo para a precipitação do DNA.
9. Centrifugar por 10 minutos a 14.500 rpm (14103g).
10. Verter o álcool 100% (descartando o sobrenadante).
11. Adicionar 500 µL de álcool 70% gelado.
12. Centrifugar por 10 min a 14.500 rpm (14103g).
13. Verter o álcool 70%.
14. Secar o material em estufa a 37°C por aproximadamente 2 horas.
15. Ressuspender o DNA em 50 µL de H₂O.

3.4 Diagnóstico da espécie

A identificação da espécie de cada amostra apenas através de sua morfologia pode resultar em identificações errôneas, pois muitas vezes as fezes de diferentes espécies podem ser morfologicamente parecidas, como no caso das fezes de onça-parda e jaguatirica (FARRELL; ROMAN; SUNQUIST, 2001). Assim, para confirmar a espécie de felino de cada amostra coletada, amplificou-se um fragmento específico de 146 pb do gene citocromo b do genoma mitocondrial por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizamos um par de *primers* (5'-AAACAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3', 5'-ATTCTTTATCTG CCTATACATRCACG - 3') descritos por Farrel et al. (2001).

Cada 12,5µL de reação continha 5µL de DNA, 1x de buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 3mM de MgCl₂, 0,48mg/ml de BSA, 0,25mM de dNTP, 0,7 µM de cada *primer* e 1U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). A reação de amplificação consistia num ciclo inicial de desnaturação a 95°C por cinco minutos; 35 a 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 49 a 52°C por 45 segundos e 72°C por 1minuto e uma extensão final a 72°C por 20 minutos em termociclador “Veriti 96 Well Thermal Cycler” (Applied Biosystems).

Após as PCRs, verificou-se a amplificação do fragmento por eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, as amostras amplificadas foram purificadas utilizando o método de precipitação por polietilenoglicol (PEG) proposto por Lis (1980):

1. Adicionar 0,4 µl de glicogênio por amostra.
2. Adicionar igual volume de solução de PEG 20% ao produto de PCR e homogeneizar.
4. Incubar em banho seco a 37 °C por 20 min.
5. Centrifugar por 15 minutos a 14.500 (14103g).
6. Descartar o sobrenadante.
7. Adicionar levemente 125 µl de etanol gelado 80%.
8. Centrifugar por 4 minutos a 14.500 (14103g).
9. Repetir os passos 6 e 7.
10. Centrifugar por 10 minutos a 14.500 (14103g).
11. Verter o álcool e manter os tubos a 37 °C por 40 min.
12. Adicionar 12-15µl de água deionizada autoclavada ou TE.

Após a purificação, os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento na empresa MacroGen Inc. (Coréia do Sul) (sequenciador ABI3730XL, Applied Biosystems).

3.5 Amplificação dos loci de microssatélites e genotipagem

Puma concolor

A individualização das amostras e a obtenção dos dados para estimativa de diversidade genética para a onça-parda foram feitas utilizando sete *primers* de *Puma concolor* descritos por Kurushima et al. (2006) já marcados com o fluoróforo FAM (Tabela 1).

O protocolo de PCR utilizado para esses *primers* foi: cada PCR (15 µL) continha 7,5 µL de GoTaq (Promega) - tampão Buffer 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1U Taq DNA polimerase, 0,45 a 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mg/mL de BSA, 2 a 2,5 mM de MgCl₂ e 5 µL de DNA. A programação do ciclo utilizada foi: um ciclo inicial de desnaturação à 95°C por cinco minutos; 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 46 a 48°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 20 minutos à 72°C.

Também foram usados mais três *primers* heterólogos de *Felis catus* descritos por Menotti-Raymond et al. (1999) (Tabela 2). Esses *primers* continham a “cauda” universal de 18 pares de bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) adicionada na posição 5', permitindo utilizar a metodologia proposta por Schuelke (2000), na qual, em ciclos subsequentes da PCR, um *primer* universal M13 complementar à “cauda” universal e marcado com fluoróforo é incorporado ao produto de PCR (Figura 12).

Cada PCR (15 μ L) continha 7,5 μ L de GoTaq (Promega) - tampão Buffer 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq DNA polimerase, 0,15 μ M do primer *forward*, 0,60 μ M do primer *reverse*, 0,60 μ M do primer M13, 0,2mg/mL de BSA e 5 μ L de DNA. A programação do ciclo utilizada foi: um ciclo inicial de desnaturação à 95°C por cinco minutos; 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 47°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Seguido do ciclo do M13: 15 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final de 20 minutos à 72°C.

Para reduzir os erros de genotipagem devido a *allelic dropout* (TABERLET et al., 1996), foi realizada a confirmação dos *loci* homozigotos em pelo menos três PCRs independentes até um total de cinco PCRs.

Após as reações, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,0% e enviados para genotipagem em sequenciador automático MegaBACE ET-550R Size Standard (Amersham Biosciences) pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil). Os eletroferogramas das genotipagens foram analisados no programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Sciences).

Tabela 1. Sequências *forward* e *reverse* dos primers de microssatélites isolados para *Puma concolor* (KURUSHIMA et al., 2006).

<i>Primer</i>	Sequências	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
PcoA208	TGGCAGCTTTAGTGAAAGAC	CCCTATTAAATACCGCCTCACT
PcoA216	CTTGGCTCCTTGAATGTGATC	GCTGTGTGACTGTAAGCAGGTTA
PcoA339	AGTGGCAAACCTTTCTGGGT	gttcttGCCTCCCTCTGAAGTGCATAT
PcoB003	CCTCAGGTTTCCTTGTCTGTAAG	gttcttCAGTCCTAACAGGGACGTGTAC
PcoB010	TACGGAAAGGTACTGGCAACT	gttcttCCTGGTAATAGAGGCAGGTGT
PcoB210	CTTGGGATGTCTCATGTGGTT	CATCTTGGTGTGATCCTCTAGTC
PcoC108	CTTGATGATGTTGAGGCAGATC	ACATGGTAGGTGCTGGGTAAT

Tabela 2. Sequências *forward* e *reverse* dos primers de microssatélites isolados para *Felis catus* (MENOTTI-RAYMOND et al., 1999) utilizados para *Puma concolor*.

<i>Primer</i>	Sequências	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Fca077	GGCACCTATAACTACCAAGTGTGA	ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG
Fca090	ATCAAAAGTCTTGAAGAGCATGG	TGTTAGCTCATGTTTCATGTGTCC
Fca096	CACGCCAAACTCTATGCTGA	CAATGTGCCGTCCAAGAAC

Leopardus pardalis

Para as amostras de jaguatirica, foram utilizados nove *primers* de *Felis catus* descritos por Menotti-Raymond et al. (1999) (Tabela 3). Em todos esses *primers* também foi adicionada a “cauda” de 18 pares de bases na posição 5’, assim como nos *primers* heterólogos utilizados para onça-parda, permitindo a utilização da metodologia descrita por Schuelke (2000).

O protocolo de PCR utilizado foi: cada PCR (15 µL) continha 7,5 µL de GoTaq (Promega) - tampão Buffer 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase, 0,15 µM do *primer forward*, 0,60 µM do *primer reverse*, 0,60 µM do primer M13, 0,2mg/mL de BSA e 5 µL de DNA. A programação do ciclo utilizada foi: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por cinco minutos; 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 47°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguido do ciclo do M13: 15 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final de 20 minutos à 72°C.

Para a confirmação dos *loci* homozigotos, foram realizadas três PCRs independentes até um máximo de cinco PCRs, a fim de evitar os erros de genotipagem devido a *allelic dropout* (TABERLET et al., 1996).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% e enviados para genotipagem em sequenciador automático MegaBACE ET-550R Size Standard (Amersham Biosciences) pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil) e analisados no programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Sciences).

Tabela 3. Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* de microssatélites isolados para *Felis catus* (MENOTTI-RAYMOND et al., 1999).

<i>Primer</i>	Sequências	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Fca008	ACTGTAAATTTCTGAGCTGGCC	TGACAGACTGTTCTGGGTATGG
Fca042	CCCACGTGGACTAATCAAAT	CACTGCACAAATTAAGAGGC
Fca053	TGCTTACACTCATGCACAGATG	GAGCCTTGACATTGCTCTCC
Fca077	GGCACCTATAACTACCAGTGTGA	ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG
Fca124	CCATTCCCTCCCTGTCTGTA	GCCTCAAGCCTCATTGCTAC
Fca391	GCCTTCTAACTTCCTTGCAGA	TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA
Fca424	TGGAAAAATGTGGAATACTGAA	CCAATTTGTAGTGACATCCCC
Fca441	ATCGGTAGGTAGGTAGATATAG	GCTTGCTTCAAAATTTTCAC
Fca453	AATTCTGAGAACAAGCTGAGGG	ATCCTCTATGGCAGGACTTTG

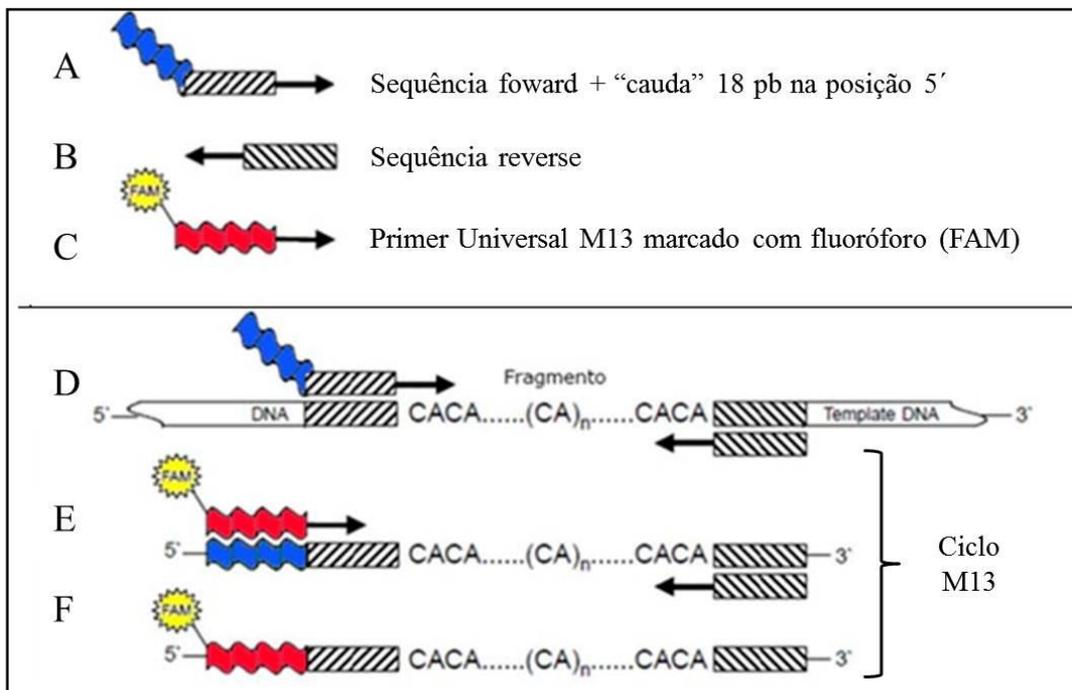


Figura 12: Reação de amplificação usando a “cauda” universal e o *primer* M13 marcado com fluoróforo (Adaptado de Schuelke, 2000). (A e B) são os *primers* para amplificação do fragmento de interesse. (C) é o *primer* M13 marcado com o fluoróforo. (D) é amostra de DNA incorporado com o *primer forward* contendo a “cauda” de 18 pb complementar ao *primer* M13. (E e F) é o ciclo específico do M13, onde ele é incorporado ao produto de PCR.

3.6 Determinação do sexo

O sexo dos indivíduos foi determinado utilizando um par de *primers* descrito por Pilgrim et al.(2005). Esses *primers* amplificam uma região do gene da Amelogenina presente nos cromossomos sexuais. No caso das fêmeas, são amplificados dois fragmentos de 214 pb correspondentes aos dois cromossomos X. Já nos machos, ocorre a amplificação de um fragmento de 214 pb (cromossomo X) e outro de 194 pb devido a uma deleção de 20 pb no cromossomo Y.

Cada PCR (15 μ L) continha 7,5 μ L de GoTaq (Promega) - tampão Buffer 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq DNA polimerase, 0,2 μ M de cada *primer*, 0,2 mg/mL de BSA, e 4,5 μ L de DNA. A reação de amplificação consistiu num ciclo inicial de desnaturação a 95°C por cinco minutos; 40 ciclos de 94°C por um minuto, 45 a 47°C por um minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 20 minutos em termociclador “Veriti 96 Well Thermal Cycler” (Applied Biosystems).

Após as reações, os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% por 120 minutos (100 volts) para que fosse possível identificar os fragmentos bem

separados. Como resultado dessas análises, os indivíduos fêmeas devem mostrar apenas uma banda no gel devido à sobreposição dos dois fragmentos de mesmo tamanho dos cromossomos X. Já os indivíduos machos continham duas bandas no gel devido aos seus dois fragmentos de tamanhos diferentes (214 pb = cromossomo X; 194 pb = cromossomo Y) (Figura 12). Para evitar a identificação de falsas fêmeas devido à qualidade do DNA das amostras foram feitas três réplicas para cada sexagem.

3.7 Análise dos dados

3.7.1 Identificação das espécies das amostras coletadas

O diagnóstico das espécies foi feito comparando-se as sequências obtidas com sequências de referência de onça-parda (AF266475) e jaguatirica (AF266473) disponíveis no *GenBank*. As sequências foram alinhadas no programa CLUSTALX 2.0 (LARKIN et al., 2007) e verificadas visualmente e editadas no programa BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999).

Em seguida, foram calculadas as distâncias genéticas entre os fragmentos de DNA obtidos e as sequências de referência através do programa MEGA v.5.03 (TAMURA et al., 2011), utilizando o Modelo de dois Parâmetros de Kimura (1980) e realizamos a análise de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A significância estatística foi avaliada pelo método de *bootstrap* com 1000 replicações. Consideramos o agrupamento das nossas sequências com as sequências de referência como sendo a espécie de origem da amostra coletada. A espécie *Panthera onca* (onça-pintada) foi utilizada como grupo externo.

3.7.2 Individualização das amostras

Após a confirmação da espécie das amostras, realizamos a amplificação dos *loci* de microssatélites. As genotipagens que apresentaram dois fragmentos foram consideradas heterozigotas e as que possuíam apenas um fragmento foram consideradas homozigotas.

A individualização das amostras foi feita no programa GIMLET (VALIÈRE, 2002). Esse programa faz o cálculo da Probabilidade de Identidade (P_{ID} e $P_{ID(SIBS)}$ que considera a possibilidade de indivíduos aparentados) de cada *locus*, ou seja, ele verifica a probabilidade de dois indivíduos compartilharem os mesmos genótipos em uma população com os *loci* utilizados na análise (PRUGH et al., 2005; WAITS; PAETKAU, 2005). Com a individualização das amostras, foi possível determinar o tamanho populacional mínimo das espécies na EEC.

3.7.3 Demografia

As estimativas demográficas foram feitas a partir de três formas: o número de indivíduos obtidos a partir da individualização genética, sendo esse o tamanho populacional mínimo, as estimativas de abundância e, por fim, o cálculo de densidade das espécies.

A estimativa de abundância foi feita utilizando o método de captura-recaptura para população aberta e fechada a fim de comparar os resultados. No programa MARK (WHITE; BURNHAM, 1999), realizou-se a estimativa para população aberta, ou seja, considerando a possibilidade de entrada de indivíduos (nascimentos e migrantes) na população durante o período de amostragem. Para isso, utilizou-se o histórico de captura-recaptura de todo o nosso período de coleta (18 meses) com o modelo de probabilidade de Jolly-Seber (JOLLY, 1965; SEBER, 1965). Esse modelo para população aberta considera: (I) a probabilidade de captura de animais não marcados é a mesma dos animais marcados, neste caso, a marcação dos indivíduos é a identificação molecular dos mesmos pelos genótipos encontrados; (II) a sobrevivência é a mesma para indivíduos marcados e não marcados; (III) a área de estudo não passou por mudanças durante o período de coleta; e que (IV) não existe perda da marcação dos indivíduos.

A análise de população fechada foi feita pelo programa CAPTURE (REXSTAD e BURNHAM, 1991). Para essa análise, o nosso período de amostragem foi reduzido para apenas as quatro primeiras ocasiões de coleta, caracterizando uma população fechada. A escolha das quatro primeiras ocasiões deve-se à precaução de não enviesar os dados escolhendo ocasiões em que, por exemplo, foram obtidas mais recapturas. Além disso, foi utilizado o modelo de heterogeneidade (M_h) para a interpretação do histórico de captura-recaptura. Esse modelo tem sido utilizado para animais com hábito solitário e territorialista (SILVER et al., 2004; SARMENTO et al., 2009; NEGRÕES et al., 2010), o que se encaixa no comportamento dos felinos (NEGRÕES et al., 2010), dessa forma cada animal tem probabilidade diferente de captura-recaptura, considerando o tamanho de sua área de vida, padrão de deslocamento e onde se encontra durante o período de coleta.

A partir do tamanho populacional (N) obtido nas estimativas de abundância pelos dois métodos foi calculada a densidade populacional dividindo o N encontrado pela área efetivamente amostrada. A área efetivamente amostrada foi calculada a partir da distância máxima de deslocamento obtida dos indivíduos que foram capturados mais de uma vez. Foi desenhado um *buffer* ao redor das trilhas percorridas, cujo raio correspondia à metade da

média dessas distâncias máximas registradas, pelo método $\frac{1}{2}$ MMDM (*mean maximum distance moved*) (WILSON; ANDERSON, 1985). Esse método foi proposto por Wilson e Anderson (1985) para estimativas de abundância em populações pequenas e é recomendado para estimativas demográficas quando não é possível obter a área de vida das espécies por outros métodos como a rádio telemetria (BALME; HUNTER; SLODOW, 2009). Para as jagatiricas, o *buffer* foi aplicado apenas na trilha interna da EEC (“Trilha do Jipi”), já que suas amostras nunca foram encontradas nas trilhas do entorno.

3.7.4 Parentesco

Primeiramente, foram calculados os valores de corte entre as classes de parentesco (UN - “não-relacionados”, HS - “meio-irmãos” e FS/PO - “irmãos-completos” ou “pais/filho”) utilizando o *software* iRel 1.0 (GONÇALVES DA SILVA; RUSSELO, 2010). Não foram utilizados os valores teóricos médios (acima de 0,5 para “irmãos-completos” ou “pai/filho”, entre 0,25 e 0,5 para “meio-irmãos” e de 0,0 a 0,25 para indivíduos “não-relacionados”), pois em populações naturais pode ser observada uma variação em torno dessas médias devido, por exemplo, a estocacidade da seleção natural na reprodução e ao número de *locus* utilizados (RUSSELO; AMATO, 2004). Após os cálculos dos valores de corte, foi verificado o parentesco genético entre os indivíduos no *software* Kingroup v2 (KONOVALOV; MANNING; HENSHAW, 2004) utilizando os estimadores de Queller e Goodnight (1989) e por máxima verossimilhança. O parentesco final entre os indivíduos foi confirmado quando os relacionamentos foram os mesmos com os dois estimadores, este procedimento utilizado é parte da metodologia proposta por Miño (2010). Vale ressaltar, que através desta análise, não é possível distinguir entre FS e PO.

3.7.5 Análises populacionais

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos *loci* foi calculado no programa CERVUS 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007). Os *loci* com valores até 0,25 são considerados pouco informativos, de 0,25-0,5 são razoavelmente informativos e maiores que 0,5 são altamente informativos de acordo com Botstein et al. (1980).

Cálculos de desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), heterozigosidade esperada e observada e desequilíbrio de ligação foram feitos no programa GENEPOP 4.0.10

(RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008). Os intervalos de significância foram corrigidos através da correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989).

A presença de alelos nulos e *stutters* foram verificadas no programa Micro-Checker 2.2.3 (OOSTERHOUT et al., 2004). O programa utiliza vários métodos para estimar a frequência dos alelos nulos. Optou-se pelo método de Oosterhout (OOSTERHOUT et al., 2004), pois ele considera que o aparente déficit de heterozigotos deve-se às amostras não amplificadas devido à baixa qualidade do DNA (comum em amostras não invasivas) ou devido a erros de genotipagem. Os outros dois métodos, Chakraborty (CHAKRABORTY et al., 1992) e Brookfield (BROOKFIELD, 1996), consideram que o déficit é causado por alelos nulos ao invés de serem justificados por erros de genotipagem.

A frequência de *allelic dropout* foi calculada dividindo o número de erros encontrados pelo número de vezes que ele poderia ocorrer e o seu valor médio foi feito somando os valores encontrados para cada *locus* e dividindo pelo número total de *loci* utilizados.

No programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001), foram calculados os excesso ou déficit de heterozigotos, valores de riqueza alélica e de coeficiente de endocruzamento (F_{is}). Também calculamos o tamanho efetivo populacional pelo *software* LDNe (WAPLES; DO, 2008).

Os nossos dados de *P. concolor* também foram analisados juntamente com os dados obtidos por Miotto et al. (2011), que analisaram indivíduos de onça-parda da região nordeste do estado de São Paulo (região de Santa Rita do Passa Quatro, Luiz Antônio, Itirapina e Rio Claro) utilizando os mesmos *loci* específicos que os usados em nosso trabalho. Analisamos a existência de fluxo gênico e estruturação entre essas populações. A estruturação populacional foi calculada pelo índice de fixação de Wright (F_{ST}) (WRIGHT, 1949) no FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001) (modelo mutacional IAM) e no *software* Structure 3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) que utiliza o método bayesiano. Também verificou-se uma possível estruturação através do cálculo do índice D (D_{EST}) proposto por Jost (2008), que considera apenas alelos efetivos e pelo *software* Genetix (Belkhi et al., 1996-2004) que considera que os dados genéticos utilizados são multivariados devido ao conjunto de *loci* utilizado. Por fim, verificamos o parentesco entre esses indivíduos utilizando a mesma metodologia usada para os indivíduos da EEC.

4. RESULTADOS

4.1 Coleta das amostras e identificação das espécies

Durante todo o período de estudo, foram coletadas 70 amostras de fezes potencialmente pertencentes a felinos. Algumas amostras (10) se apresentavam secas ou “lavadas” pelas chuvas e, dessa forma, foram descartadas das análises. O sucesso na extração de DNA das demais amostras (60) foi de 88,3% (53 amostras) e dessas, conseguimos a amplificação do fragmento de citocromo b em 37 amostras (69,8% das amostras com DNA extraído).

Em relação aos dois modelos de armadilhas de pelos testados, eles não demonstraram sucesso na área de estudo. As armadilhas de pelo permaneceram oito meses em campo e durante as visitas foi possível verificar a presença dos felinos próximos às armadilhas através de pegadas e fezes depositadas, porém apenas quatro amostras de pelos foram coletadas. A extração do DNA dessas amostras foi em quantidades muito baixas e, assim, não tivemos sucesso na amplificação desse material.

Com base nas similaridades entre as sequências obtidas das amostras de fezes e as sequências de referência de *P. concolor* e *L. pardalis*, foram identificadas 17 amostras pertencentes à onça-parda e 12 de jaguatirica. Também foram identificadas três amostras de gato mourisco (*Puma yagouaroundi*) e cinco de *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno) (Figura 13). Os sítios polimórficos encontrados estão na figura 14.

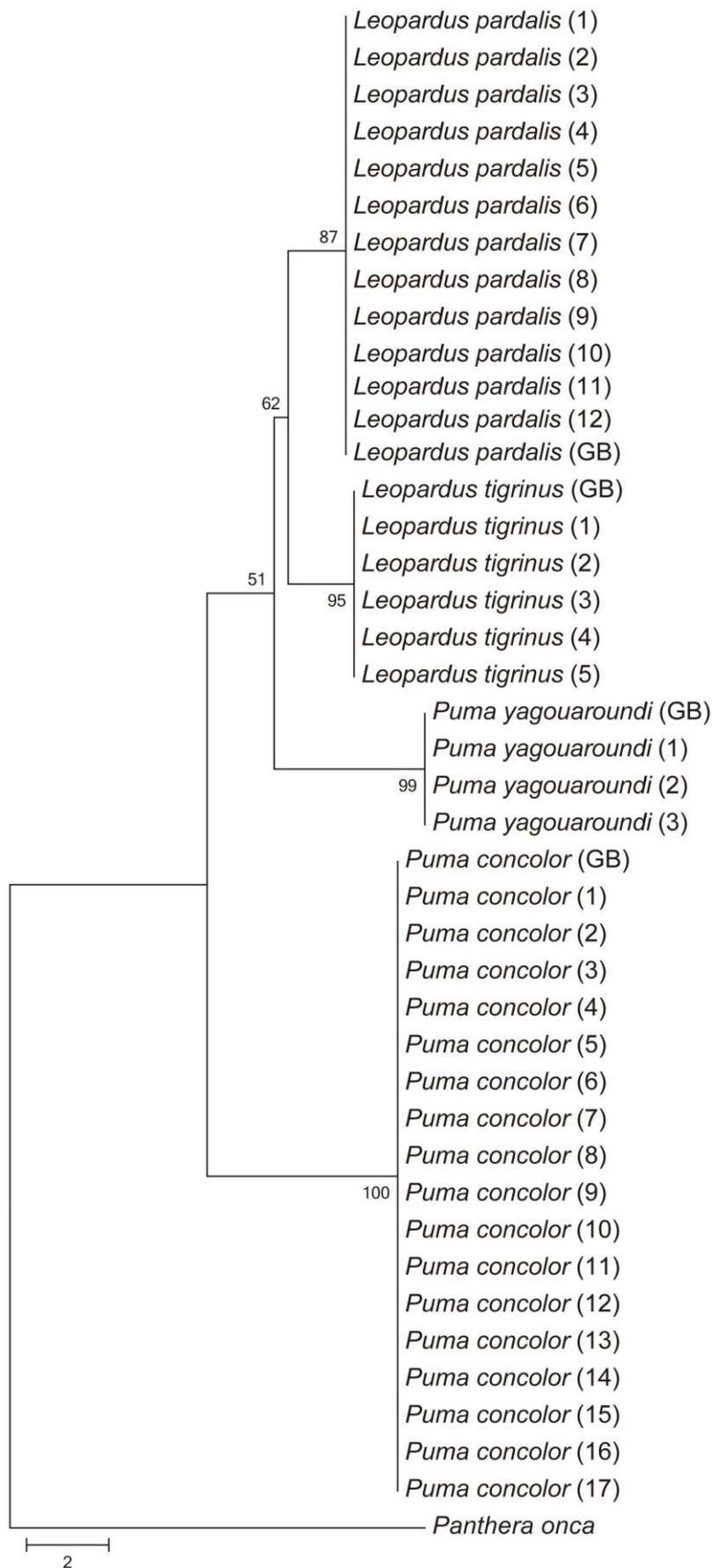


Figura 13: Árvore *neighbor-joining* das sequências de citocromo b analisadas, tendo *Panthera onca* como grupo externo. GB são as amostras de referência do *GenBank*. Os números sobre os braços da árvore são os valores de *bootstrap* para 1000 replicações.

4.2 Individualização das amostras e sexagem

A partir do painel *multilocus*, foram identificados seis indivíduos de onça-parda (dois machos e quatro fêmeas) e cinco de jaguatirica (três fêmeas e dois machos) (Tabela 4). Na figura 15 estão os resultados da sexagem em gel de agarose 2% e na figura 16 estão ilustrados os pontos de coleta de cada indivíduo.

Tabela 4: Informações sobre os indivíduos de cada espécie.

<i>Puma concolor</i>		
Indivíduo	Amostras	Sexo
Pc1	05, 72, 78	♂
Pc2	08	♀
Pc3	13	♀
Pc4	16, 20, 24, 30, 33, 73, 77, 79	♀
Pc5	39, 40, 62	♀
Pc6	82	♀
<i>Leopardus pardalis</i>		
Indivíduo	Amostras	Sexo
Lp1	04, 12, 17, 19, 31, 35, 37	♀
Lp2	15	♀
Lp3	18	♀
Lp4	22, 26	♂
Lp5	27	♂

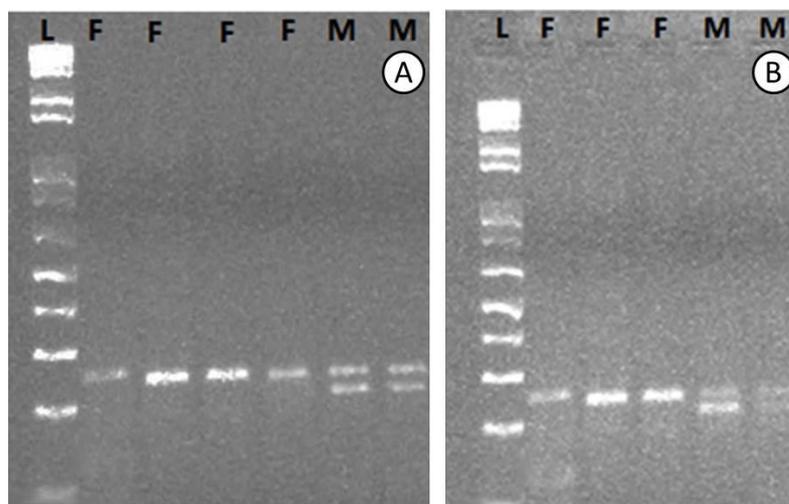


Figura 15: Sexagem dos indivíduos em gel de agarose 2%. (A) Indivíduos de onça-parda; (B) Indivíduos de jaguatirica; (L) *Ladder* 1Kb (Invitrogen®); (M) Macho; (F) Fêmea.

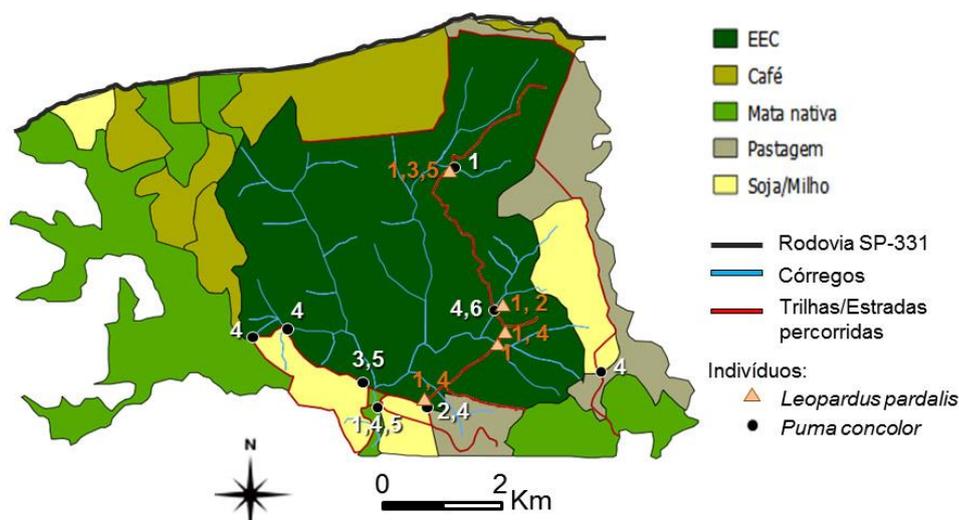


Figura 16: Ponto de coleta das amostras de cada indivíduo de ambas as espécies. Os números representam os indivíduos encontrados para cada espécie (branco = *Puma concolor*; laranja = *Leopardus pardalis*). Vide tabela 4 para o sexo de cada indivíduo.

A caracterização dos *loci* utilizados para a individualização de onça-parda e jaguatirica está nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Os valores de PIC para os *loci* de *Puma concolor* são “altamente informativos” ($PIC > 0,5$) com exceção do *locus* heterólogo FCA096 que se mostrou “razoavelmente informativo” ($0,25 < PIC < 0,5$). Para as jaguatiricas, foram encontrados cinco *loci* “razoavelmente informativos” ($0,25 < PIC < 0,5$) e os demais foram “altamente informativos” ($PIC > 0,5$), mesmo com cinco *loci* com valores de PIC menor que 0,5, o conteúdo de informação polimórfica médio foi 0,59, ou seja, “altamente informativo”.

Tabela 5: Caracterização dos *loci* de microssatélites para *Puma concolor*.

<i>Locus</i>	Pb	P _{ID}	P _{ID(sibs)}	PIC	<i>Allelic Dropout %</i>
PcoA208	203-211	0,046	0,37	0,76	18,0
PcoA216	241-281	0,013	0,33	0,849	3,0
PcoA339	278-304	0,035	0,36	0,779	2,0
PcoB003	273-303	0,021	0,34	0,824	16,0
PcoB010	199-233	0,049	0,4	0,722	16,0
PcoB210	173-199	0,014	0,33	0,844	22,0
PcoC108	106-146	0,047	0,38	0,756	23,0
Fca077	93-127	0,034	0,37	0,778	0
Fca090	88-118	0,180	0,53	0,519	0
Fca096	114-128	0,250	0,58	0,447	0
Média	—	—	—	0,73	10,0
Total	—	$2,167 \times 10^{-14}$	$8,526 \times 10^{-5}$	—	—

(pb) tamanho dos fragmentos em pares de bases; (P_{ID} e P_{ID(sibs)}) probabilidade de identidade; (PIC) conteúdo de informação polimórfica.

Tabela 6: Caracterização dos *loci* de microssatélites para *Leopardus pardalis*.

<i>Locus</i>	Pb	P_{ID}	P_{ID(sibs)}	PIC	Allelic Dropout %
Fca008	106-126	0,37	0,64	0,359	20,0
Fca042	232-286	0,0056	0,32	0,772	7,0
Fca053	124-156	0,29	0,57	0,466	16,0
Fca077	124-128	0,16	0,47	0,586	29,0
Fca124	112-122	0,14	0,55	0,269	7,0
Fca391	190-238	0,12	0,54	0,653	0
Fca424	162-190	0,27	0,37	0,786	22,0
Fca441	125-157	0,23	0,36	0,798	0
Fca453	190-216	0,19	0,37	0,63	22,0
Média	—	—	—	0,59	13,6
Total	—	1,90x10 ⁻⁸	0,0008	—	—

(pb) tamanho dos fragmentos em pares de bases; (P_{ID} e P_{ID(sibs)}) probabilidade de identidade; (PIC) conteúdo de informação polimórfica.

4.3 Demografia

O tamanho populacional mínimo encontrado na individualização genética para todo o período amostrado foi de seis indivíduos para onça-parda e cinco para jaguatiricas. Pelo método de captura-recaptura, foi encontrada uma estimativa de abundância de 15 indivíduos para população aberta e cinco para população fechada para as onças-pardas (Tabela 13). Para as jaguatiricas, o valor encontrado foi de 12 indivíduos para população aberta e cinco para população fechada (Tabela 7). Os históricos dos eventos de captura-recaptura estão na tabela 8.

Tabela 7: Resultados das estimativas de abundância pelos dois métodos utilizados.

	População aberta (MARK)	População fechada (CAPTURE)
<i>P. concolor</i>	15	5 (SE1,67)
<i>L. pardalis</i>	12	5 (SE2,21)

Tabela 8: Tabela com o histórico de captura-recaptura dos indivíduos de *Puma concolor* e *Leopardus pardalis*.

		Ocasões de coleta																	
		<i>Puma concolor</i>																	
Indivíduo	1*	2*	3*	4*	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Pc1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
Pc2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pc3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pc4	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
Pc5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
Pc6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	

		<i>Leopardus pardalis</i>																	
Indivíduo	1*	2*	3*	4*	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Lp1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
Lp2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lp3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lp4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lp5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

(0) indica evento de não captura; (1) indica evento de captura ou recaptura do indivíduo. (*) ocasiões utilizadas para a estimativa de abundância em população fechada.

O cálculo da área efetivamente amostrada aplicando o $\frac{1}{2}$ MMDM como *buffer* nas trilhas foi 101,63 km² para onça-parda e 25,62 km² para as jagatiricas (Figura 17). Assim, foram obtidos os valores de densidade apresentados na tabela 9.

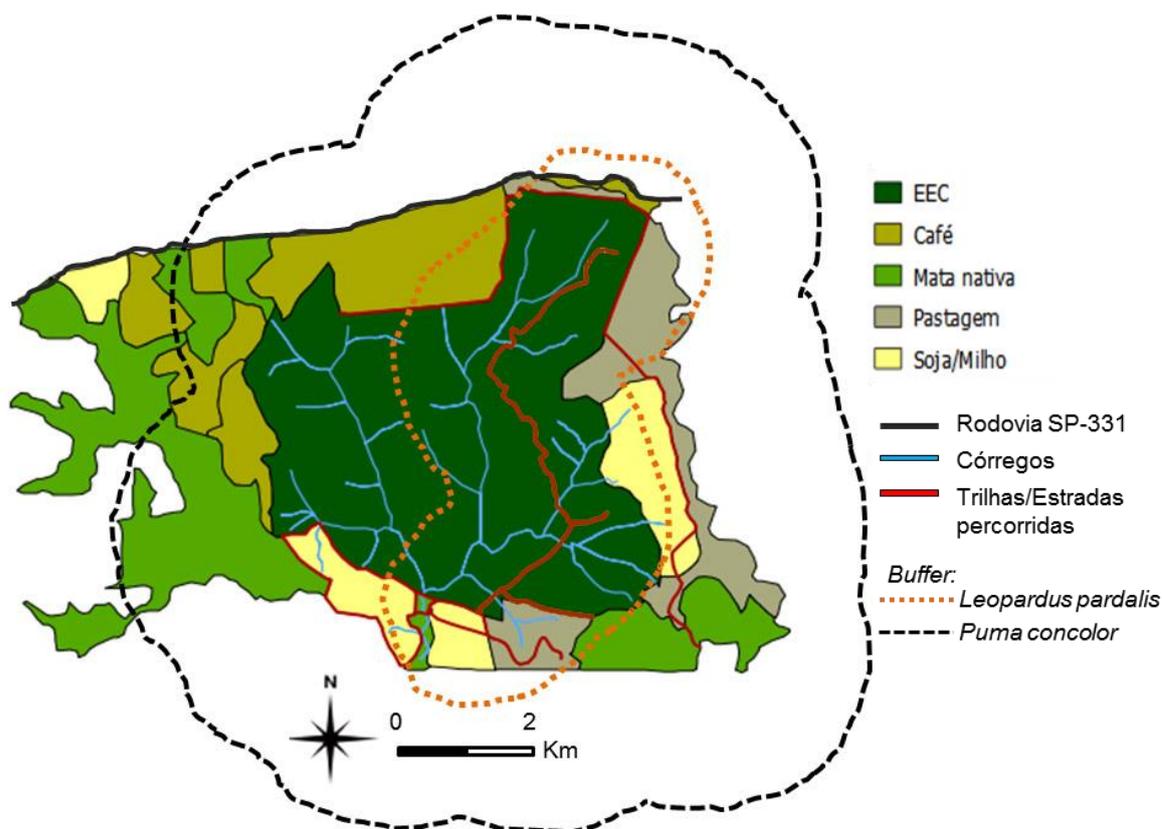


Figura 17: Áreas efetivamente amostradas (representadas pelos *buffers*) para cada espécie utilizando o $\frac{1}{2}$ MMDM.

Tabela 9: Resultados das estimativas de densidade utilizando a abundância obtida pelos dois métodos utilizados.

	População aberta (MARK)	População fechada (CAPTURE)
<i>P. concolor</i>	14,76/100 km ²	4,92/100 km ²
<i>L. pardalis</i>	46,83/100 km ²	19,51/100 km ²

4.4 Parentesco

Os valores de corte obtidos para *P. concolor* através do *software* iRel 1.0 (GONÇALVES DA SILVA; RUSSELO, 2010) foram: até 0,128 para UN; entre 0,128 e 0,378 para HS e acima de 0,378 FS/PO. Para a espécie *L. pardalis* os valores foram: até 0,126 para UN; entre 0,126 e 0,373 para HS e acima de 0,373 para FS/PO.

Pela análise, foi identificado existe um alto grau de relacionamento entre os indivíduos de ambas as espécies. Alguns indivíduos não puderam ter o parentesco definido devido a não concordância entre os estimadores (Tabela 10).

Tabela 10: Parentesco entre os indivíduos.

<i>Puma concolor</i>				<i>Leopardus pardalis</i>			
Indivíduos	Estimadores de Parentesco		Resultado Final	Indivíduos	Estimadores de Parentesco		Resultado Final
	Q&G	MV			Q&G	MV	
Pc1(♂) e Pc2(♀)	FS	FS	FS	Lp1(♀) e Lp2(♀)	FS	FS	FS
Pc1(♂) e Pc3(♂)	FS	FS	FS	Lp1(♀) e Lp3(♀)	FS	FS	FS
Pc1(♂) e Pc4(♀)	HS	HS	HS	Lp1(♀) e Lp4(♂)	FS	FS	FS
Pc1(♂) e Pc5(♀)	FS	FS	FS	Lp1(♀) e Lp5(♂)	FS	FS	FS
Pc1(♂) e Pc6(♀)	FS	FS	FS	Lp2(♀) e Lp3(♀)	FS	FS	FS
Pc2(♀) e Pc3(♂)	FS	FS	FS	Lp2(♀) e Lp4(♂)	HS	FS	X
Pc2(♀) e Pc4(♀)	HS	FS	X	Lp2(♀) e Lp5(♂)	FS	FS	FS
Pc2(♀) e Pc5(♀)	FS	FS	FS	Lp3(♀) e Lp4(♂)	FS	FS	FS
Pc2(♀) e Pc6(♀)	FS	FS	FS	Lp3(♀) e Lp5(♂)	FS	FS	FS
Pc3(♂) e Pc4(♀)	HS	HS	HS	Lp4(♂) e Lp5(♂)	HS	HS	HS
Pc3(♂) e Pc5(♀)	FS	FS	FS				
Pc3(♂) e Pc6(♀)	FS	HS	X				
Pc4(♀) e Pc5(♀)	FS	FS	FS				
Pc4(♀) e Pc6(♀)	HS	FS	X				
Pc5(♀) e Pc6(♀)	HS	FS	X				

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

4.5 Estimativa de diversidade genética

A estimativa de diversidade genética foi feita considerando os valores de número de alelos, riqueza alélica e heterozigidade observada e esperada. Para onça-parda, o *locus* PcoB210 foi o mais polimórfico, com nove alelos e o *locus* Fca090 o menos polimórfico, com três alelos. Na jaguatirica, o *locus* Fca441 mostrou-se o mais polimórfico, com sete alelos e os *loci* Fca008 e Fca124 os menos polimórficos, com apenas dois alelos.

Os valores de diversidade genética para *P. concolor* foi de H_e médio igual 0,740 e H_o médio igual a 0,547. Não foi observado desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção sequencial de Bonferroni. O número médio de alelos foi de cinco alelos por *locus*. Foi observado valores significativos de déficit de heterozigotos nos *loci* PcoA216, PcoA339 e Fca090, coeficiente de endocruzamento (F_{is}) médio foi de 0,373. Já para *L. pardalis*, os valores de H_e médio foi 0,64 e H_o foi 0,56. Também não foi observado desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número médio de alelos foi 4,22 alelos por *locus* e o valor de F_{is} médio para as jaguatiricas foi 0,16, com déficits significativos de heterozigotos nos *loci* Fca042 e Fca424. Não foi detectado desequilíbrio de ligação entre os *loci* de microssatélites de cada uma das espécies, mas, como apontado pelo programa GENEPOP,

isso se deve ao tamanho da amostra. Todas as informações de diversidade genética de onça-parda e jaguatirica são apresentadas nas tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11: Características dos *loci* de microssatélites e dados de diversidade genética para *Puma concolor*.

<i>Locus</i>	pb	N	NA	RA	DHW	H _o	H _E	pL	pS	F _{is}
PcoA208	203-211	6	5	4,52	0,154	0,500	0,778	0,070	1,000	0,434
PcoA216	241-281	4	6	6,00	0,028	0,500	0,813	0,040*	1,000	0,500
PcoA339	278-304	4	3	3,00	0,028	0,000	0,625	0,040*	1,000	1,000
PcoB003	273-303	5	7	6,13	0,068	0,800	0,840	0,305	0,940	0,158
PcoB010	199-233	6	4	3,87	0,040	0,667	0,736	0,385	0,860	0,184
PcoB210	173-199	6	8	6,30	0,087	0,833	0,861	0,300	0,930	0,123
PcoC108	106-146	6	7	5,48	0,010	0,667	0,806	0,145	0,975	0,259
Fca077	93-127	6	5	4,63	0,131	1,000	0,778	1,000	0,385	-0,200
Fca090	88-118	6	3	2,67	0,029	0,167	0,542	0,035*	1,000	0,737
Fca096	114-128	6	4	3,33	0,023	0,333	0,625	0,070	0,995	0,535
Média	-	-	5,2	4,59	-	0,547	0,740	-	-	0,373

(pb) tamanho do fragmento em pares de bases; (N) tamanho amostral; (NA) número de alelos; (RA) riqueza alélica; (DHW) desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($0,005 < \alpha < 0,05$, após correção sequencial de Bonferroni); (H_o) heterozigosidade observada; (H_E) heterozigosidade esperada; (pL) p para déficit de heterozigotos; (pS) p para excesso de heterozigotos; (F_{is}) coeficiente de endocruzamento; (*) valores significativos.

Tabela 12: Características dos *loci* de microssatélites e dados de diversidade genética para *Leopardus pardalis*.

<i>Locus</i>	pb	N	NA	RA	DHW	H _o	H _E	pL	pS	F _{is}
Fca008	106-126	4	2	2,00	1,000	0,75	0,47	1,00	0,53	-0,50
Fca042	232-286	5	6	5,36	0,008	0,40	0,80	0,01*	1,00	0,579
Fca053	124-156	5	3	2,80	1,000	0,80	0,54	1,00	0,39	-0,391
Fca077	124-128	5	3	3,00	0,539	0,40	0,66	0,18	0,94	0,484
Fca124	112-122	5	2	1,98	1,000	0,40	0,32	1,00	0,92	-0,143
Fca391	190-238	4	5	5,00	0,859	0,50	0,69	0,07	1,00	0,4
Fca424	162-190	4	6	6,00	0,032	0,50	0,81	0,01*	1,00	0,5
Fca441	125-157	5	7	5,98	0,469	0,80	0,82	0,43	0,94	0,135
Fca453	190-216	4	4	4	0,307	0,50	0,69	0,24	1,00	0,4
Média	-	-	4,22	4,01	-	0,56	0,64	-	-	0,16

(pb) tamanho do fragmento em pares de bases; (N) tamanho amostral; (NA) número de alelos; (RA) riqueza alélica; (DHW) desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($0,0056 < \alpha < 0,05$, após correção sequencial de Bonferroni); (H_o) heterozigosidade observada; (H_E) heterozigosidade esperada; (pL) p para déficit de heterozigotos; (pS) p para excesso de heterozigotos; (F_{is}) coeficiente de endocruzamento. (*) valores significativos.

Os resultados para tamanho efetivo populacional tiverem valores negativos para as duas espécies. No programa Micro-Checker (OOSTERHOUT et al., 2004), foi detectado

presença de alelos nulos nos *loci* PcoA339 e Fca090 para *P. concolor* (Tabela 13) e no *locus* Fca042 para *L. pardalis* (Tabela 14).

Tabela 13: Frequência dos alelos nulos estimados pelo método de Oosterhout para *Puma concolor*.

<i>Locus</i>	Presença de alelos nulos	Oosterhout (Micro-checker)
PcoA208	Não	0,1789
PcoA216	Não	0,1962
PcoA339	Sim	0,4392
PcoB003	Não	0,0213
PcoB010	Não	0,0138
PcoB210	Não	0,0138
PcoC108	Não	0,1010
Fca077	Não	-0,1567
Fca090	Sim	0,3067
Fca096	Não	0,2400

Tabela 14: Frequência dos alelos nulos estimados pelo método de Oosterhout para *Leopardus pardalis*.

<i>Locus</i>	Presença de alelos nulos	Oosterhout (Micro-checker)
Fca008	Não	-0,500
Fca042	Sim	0,247
Fca053	Não	-0,473
Fca077	Não	0,182
Fca124	Não	-0,225
Fca391	Não	0,171
Fca424	Não	0,196
Fca441	Não	0,021
Fca453	Não	0,146

4.6 Análises entre populações

Ao analisarmos a estruturação entre a nossa população e a de Miotto et al. (2011), foi encontrado um valor de F_{ST} igual a 0,089, ($0,067 < F_{ST} < 0,150$; $p < 0,05$).

A análise de estruturação pelo *software* Structure também indicou uma “pequena” estruturação, porém, com a possibilidade de alguns indivíduos de Miotto et al. (2011) pertencerem à população de Caetetus (Figura 18). Os dados foram analisados com K

(número de possíveis populações) variando de um a cinco e, após correção de Evanno et al. (2005), foi identificado $K=2$ (Figura 19).

Da mesma forma, o valor do índice de Jost (2008) ($D_{EST}=0,43$) também indica a presença de estruturação entre as populações. A análise de correspondência fatorial feita no *software* Genetix (BELKHI et al., 1996-2004) também mostra a presença de dois grandes grupos, um composto por indivíduos de Miotto et al. (2011) e outro pelos indivíduos da EEC (Figura 20).

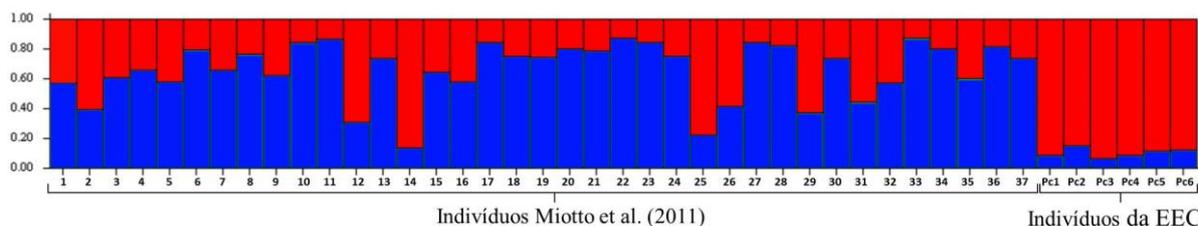


Figura 18: Gráfico de barras obtido pelo Structure com $k=2$, mostrando uma pequena estruturação entre os nossos indivíduos e os de Miotto et al. (2011).

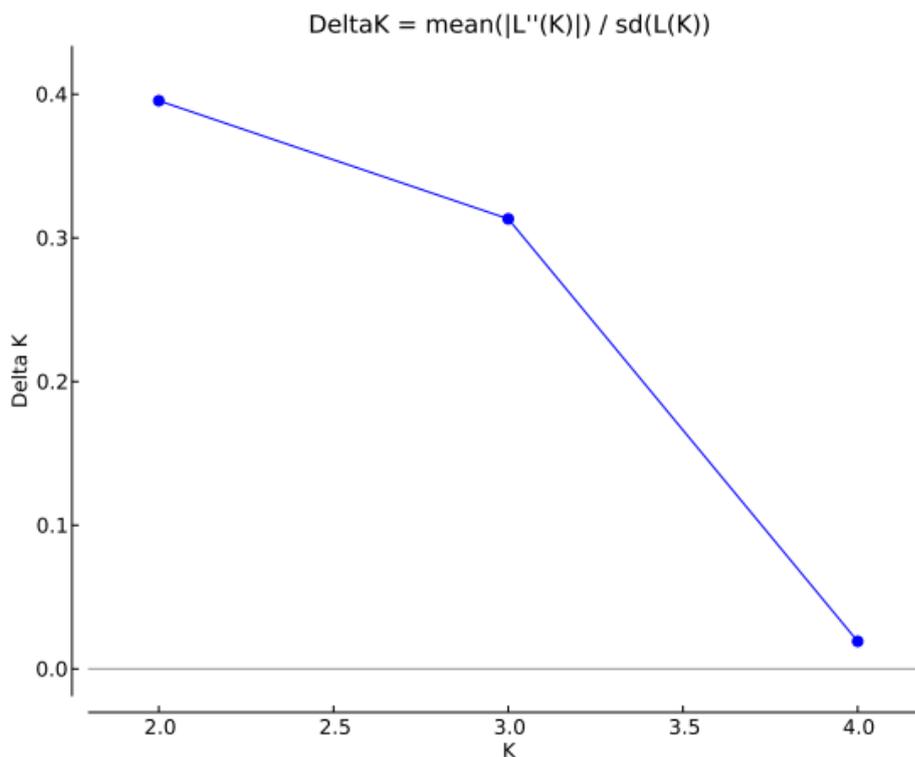


Figura 19: Estimativa do número de populações utilizando o método de Evanno et al. (2005).

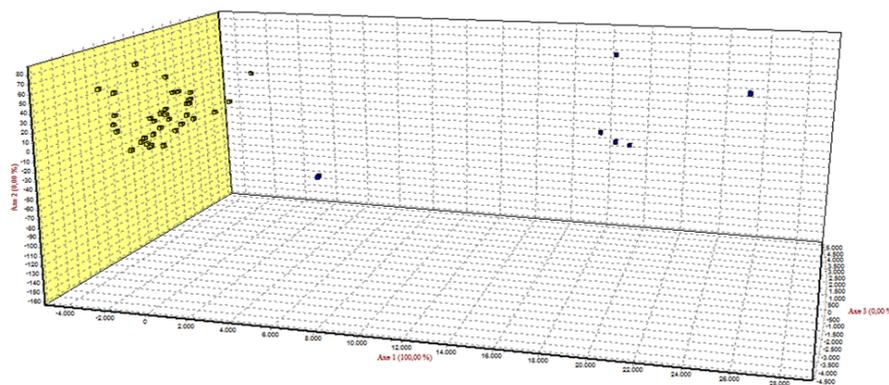


Figura 20: Análise de correspondência fatorial mostrando a presença de dois grupos: população de Miotto et al. (2011) (esquerda) e outro grupo formado pela população da EEC (direita).

A análise de parentesco também identificou relações entre os indivíduos. O indivíduo Pc6 é “meio-irmão” (HS) dos indivíduos 18 e 32 de Miotto et al. (2011).

5. DISCUSSÃO

Os nossos dados sugerem que as populações de onça-parda e jaguatirica da EEC já podem estar sofrendo com a fragmentação e perda de habitat, resultando em menor diversidade genética e também estruturação com populações de outras regiões do estado de São Paulo (MIOTTO et al, 2011). Apesar das densidades encontradas serem altas, mostrando a importância da EEC para a conservação dessas espécies, os dados genéticos já podem demonstrar que as chances de viabilidade populacional a longo prazo estão comprometidas pela fragmentação do meio.

As estimativas aqui feitas de densidade e abundância usando captura-recaptura nos dois modelos de população (aberta e fechada), em conjunto com amostras não invasivas, reforçam o potencial e possibilidades de trabalhos com essa abordagem, já que esta é relativamente nova e ainda são poucos os trabalhos feitos. Além disso, estimativas de ocorrência e densidade são considerados os primeiros passos para se estabelecer medidas de conservação (PALOMARES et al., 2002).

As estimativas de abundância encontradas indicam que a utilização do modelo de população fechada neste trabalho pôde fornecer valores de abundância e densidade mais próximos com os valores reais da área de estudo. Quando utilizamos esse modelo, encontramos resultados muito próximos ao tamanho mínimo populacional que encontramos na individualização das amostras utilizando os *loci* de microssatélites, mesmo fazendo uso do histórico de captura-recaptura somente das quatro primeiras ocasiões.

Quando observamos o histórico de captura-recaptura, verificamos que o indivíduo Pc6 foi amostrado apenas na penúltima (17^a) visita a campo, podendo ser um novo indivíduo que estava ingressando na população nesse período ou que faz uso de apenas parte da área, assim, a estimativa encontrada pelo método de população fechada torna-se ainda mais parecido com o resultado das individualizações genéticas das amostras. Também é importante destacar que o tamanho populacional mínimo encontrado para as jaguatiricas pode não representar o número de indivíduos total para a EEC, pois a área efetivamente amostrada para essa espécie representa 63,9% da área da Estação Ecológica, assim, alguns indivíduos podem não ter sido amostrados.

Em relação ao modelo de população aberta, utilizar um período mais longo de coleta e considerar nascimentos e migrantes pode “superestimar” a abundância real na área de estudo, já que pode considerar a presença de indivíduos de outros locais que apenas utilizam a EEC como área para deslocamento ou como área de vida parcial.

As densidades podem variar muito entre diferentes áreas, pois estão diretamente relacionadas ao tamanho da área de vida do animal e esta depende de diversos fatores, como o tamanho e sexo dos indivíduos e disponibilidade de presas (GRIGIONE et al., 2002). Os valores encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Negrões et al. (2010) e Kelly et al. (2008) para *P. concolor* e por Di Bitetti et al. (2006) para *L. pardalis*. Os valores de densidade encontrados nesses trabalhos estão mais próximos aos valores intermediários e altos de densidades encontrados para as espécies, assim, a densidade encontrada na EEC também pode ser considerada alta, indicando a capacidade da EEC em “abriga-las” e reforçando a importância dessa área para a conservação desses felinos.

Quando observamos os pontos de coleta em cada ocasião (mês), verificamos que em nenhum momento houve sobreposição dos locais de amostragem de indivíduos machos dentro de uma mesma ocasião de coleta para ambas as espécies, mostrando o hábito territorialista dessas espécies (SUNQUIST; SUNQUIST, 2002; CHAME, 2003). Além disso, em cada espécie, as amostras de fêmeas foram as que tiveram mais recapturas em relação aos machos, o que pode estar ligado ao fato dos machos terem maiores áreas de vida em relação às fêmeas que são mais residentes (LOGAN; SWEANOR, 2001; DI BITETTI; PAVIOLO; DE ANGELO, 2006).

A proporção sexual encontrada nas onças-pardas foi de 1macho:2fêmeas, a mesma proporção encontrada por Lindzey et al. (1994). Porém, segundo Logan e Sweanor (2001) a proporção geralmente encontrada é de 1:1. Levando em consideração o que é proposto por Logan e Sweanor (2001), encontramos um número de machos menor que o esperado, o que poderia ser explicado pelo tamanho da área amostrada, que pode não representar toda a área de vida de um indivíduo macho adulto, já que os machos costumam dispersar por maiores distâncias que as fêmeas. Além disso, como o indivíduo Pc6 (capturado somente na penúltima ocasião) pode se tratar de um migrante e estar influenciando na proporção a favor das fêmeas.

Para as jaguatiricas, a proporção encontrada foi de 1macho:1,5fêmea. Trabalhos mostram razões sexuais tanto a favor das fêmeas (DI BITETTI; PAVIOLO; DE ANGELO, 2006) quanto a favor dos machos (MAFFEI et al., 2005). Como a área amostrada foi relativamente grande para as jaguatiricas, acreditamos que a proporção sexual encontrada esteja próxima da real para a área de estudo, pois, possivelmente, foi amostrada quase toda a área de vida dos machos.

A tentativa de obtenção de amostras de pelos utilizando as armadilhas não demonstrou resultado satisfatório na área de estudo, o que pode estar relacionado a uma série de fatores, como a densidade dos animais na área de estudo (GU; SWIHART, 2004), tipo de habitat e pressão de caça (CASTRO-ARELLANO et al., 2008). Portella (2011) relata que muitos trabalhos tiveram sucesso na utilização de armadilhas de pelo, mas que também há diversos casos em que o sucesso de coleta é baixo devido a esses fatores. Na EEC, uma das possíveis explicações para o baixo sucesso no uso dessas armadilhas pode ser a alta umidade da área, comum em florestas tropicais (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2006), que não permite a permanência do atrativo odorífero por muito tempo, pois ele era retirado pelas chuvas ou pela grande quantidade de orvalho da manhã. Martins (2009), por exemplo, obteve melhores resultados com as armadilhas de pelo, mesmo com uma densidade de armadilhas bem menor ($0,114$ armadilhas/km²) e utilizando os mesmos atrativos. Porém, a área de estudo não tinha umidade tão elevada, o que permitia a permanência do atrativo por mais tempo. Além disso, a densidade de pumas na área é considerada alta para a espécie ($9,36 \pm 2,54$ indivíduos/100km²; MIOTTO, 2010), aumentando a probabilidade no sucesso de captura.

Quanto à coleta das amostras de fezes, a umidade da área e a grande quantidade de serapilheira depositada no solo foram os dois principais fatores que dificultaram a coleta das amostras em campo, retirando a camada externa das fezes onde é encontrado o DNA. O sucesso na extração do DNA dessas amostras (88,3%) foi um pouco maior que os 62,6% de Miotto et al. (2012). Dessas amostras, o sucesso de amplificação do fragmento de citocromo b (67,9%) também foi superior a outros trabalhos, como (59%, FARRELL et al., 2001; 55%, GILAD et al., 2011). O sucesso obtido na extração e na amplificação das amostras provavelmente deve-se à seleção da coleta de amostras mais frescas.

O número de trabalhos utilizando metodologias moleculares com amostras não invasivas tem aumentado (FARRELL; ROMAN; SUNQUIST, 2001; MICHALSKI et al., 2011; MIOTTO, R. et al., 2011; CHAVES et al., 2012), porém alguns cuidados devem ser tomados ao se trabalhar com DNA obtido desse tipo de amostras. Um dos problemas mais comuns é o *allelic dropout* (TABERLET et al., 1996), ou seja, a não amplificação de um alelo devido a qualidade da amostra. Por isso é importante a utilização de réplicas independentes de PCR para reduzir os erros de não detecção do alelo. As taxas médias de *allelic dropout* encontradas para onça-parda e para jaguatirica neste trabalho estão dentro do intervalo encontrado em outros trabalhos que também utilizaram amostras de fezes (MARTINS et al., 2011; MIOTTO et al., 2011; MIOTTO, et al., 2012), indicando que os erros de genotipagem devido à qualidade do DNA ou problemas de técnica foram semelhantes ao de outros autores.

Quanto aos valores totais de probabilidade de identidade encontrados, eles mostram que o painel *multilocus* utilizado foi capaz de identificar os indivíduos para as duas espécies com segurança. Além disso, os valores médios de PIC demonstram que os conjuntos de *loci* foram altamente informativos, reforçando a sua capacidade de individualização neste trabalho.

Quanto às análises populacionais, a diversidade genética encontrada para *Puma concolor* ($H_o=0,740$, $H_e=0,547$ e número médio de alelos igual a 5,2) já pode indicar uma estruturação com outras populações devido à fragmentação e perda do habitat, reduzindo o fluxo gênico e diminuindo diversidade genética dentro da população. Nossos valores de diversidade genética foram menores que os encontrados por Miotto et al. (2011) ($H_o=0,82$, $H_e=0,79$ e média de 10 alelos por *locus*) que utilizaram os mesmos *loci* específicos e estudaram as onças-pardas em quatro unidades de conservação no interior do Estado de

São Paulo, não identificando estruturação entre as populações dessas áreas, provavelmente devido a uma paisagem entre essas unidades que ainda permite o fluxo gênico entre elas e contribuindo para essa diversidade genética mais elevada que a da EEC.

No trabalho de Martins (2011), que estudou as onças-pardas no Núcleo Santa Virgínia (Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo), foram encontrados valores também maiores ($H_o=0,62$, $H_e=0,74$ e média de 7,167 alelos por *locus*) que na EEC. O Núcleo Santa Virgínia está inserido no maior contínuo de Mata Atlântica que ainda existe, assim, o fluxo gênico entre diferentes populações deve ser maior.

O mesmo ocorre com o resultado do coeficiente de endocruzamento obtido ($F_{is}=0,373$) quando comparado aos trabalhos de Martins (2011) ($F_{is}=0,167$) e Miotto et al. (2011) ($F_{is}=-0,022$). O déficit de heterozigotos sugerido pelo nosso F_{is} indica o alto grau de parentesco verificado entre os indivíduos. Outro fator que se soma aos outros contribuindo com o $F_{is}=0,373$ é a presença de alelos nulos nos *loci* PcoA339 e Fca090, quando eles são retirados da análise, o valor de F_{is} passa a ser 0,199.

Para as jaguatiricas, encontramos $H_o=0,56$, $H_e=0,64$, média de 4,22 alelos por *locus* e F_{is} igual a 0,16. Foram utilizados os mesmos *loci* que Figueiredo (2008) que estudou duas populações de jaguatiricas (Morro do Diabo, localizado no Pontal do Paranapanema e a Região do Parque Nacional do Iguçu e Parque Nacional Iguazú – Brasil e Argentina respectivamente) e obteve valores de H_o próximo a 0,7 e de H_e também próximo a 0,7, média de oito alelos e F_{is} iguais a 0,31 (população do Morro do Diabo) e 0,128 (população de Foz do Iguçu). Mais uma vez, nossos valores menores de diversidade genética devem refletir o cenário de perda e fragmentação ambiental, tornando as populações mais isoladas. O F_{is} médio de 0,16 (indicando déficit de heterozigotos) deve estar também relacionado ao parentesco entre os indivíduos, já que todos eles apresentaram algum grau de parentesco.

Quando comparamos as duas espécies estudadas, verificamos que a diversidade genética da onça-parda é maior que da jaguatirica, o que possivelmente está relacionado às características das espécies. A espécie *Puma concolor* costuma deslocar-se por áreas abertas (VERDADE; CAMPOS, 2004) e possui capacidade de dispersão por longas distâncias e entre áreas descontínuas (RUTH et al., 1998). Enquanto que *Leopardus pardalis* é pouco generalista quanto aos habitats, tendo forte associação com vegetação densa (evitando áreas abertas) e são menos “toleráveis” a áreas antropizadas, (MURRAY;

GARDNER, 1997; DI BITETTI et al., 2008), diminuindo sua capacidade de deslocar entre fragmentos e reduzindo o fluxo gênico, como já relatado por Janečka et al. (2011). Tal comportamento foi identificado nas populações estudadas, em que as amostras de jaguatirica foram encontradas apenas na trilha interna da EEC, enquanto que as amostras de onça-parda foram coletadas tanto no interior da Estação Ecológica quanto nas estradas do seu entorno.

Os resultados para tamanho efetivo populacional obtidos pelo *software* LDNe (WAPLES, 2010) tiveram valores negativos. Esse resultado é interpretado como “infinito” pelo *software* e se deve ao tamanho amostral pequeno conseguido no trabalho.

Encontramos, ainda, um alto grau de relacionamento entre os indivíduos, principalmente com relações de FS/PO, apesar de alguns indivíduos não puderem ter suas relações de parentesco definidas devido às diferenças nos estimadores e às limitações dos métodos dos programas (BLOUIN, 2003). Esse alto grau de relacionamento deve-se, provavelmente, a redução da dispersão desses animais devido à fragmentação da paisagem na região, que pode estar desencadeando, também, um alto grau de endocruzamento como demonstrado pelos coeficientes de endocruzamento.

A análise de estruturação entre a população de onças-pardas da EEC e a população estudada por Miotto et al. (2011) pode indicar um início de processo de estruturação devido ao valor de F_{ST} encontrado. Considerando a distância entre as populações estudadas (cerca de 215 km), nosso valor de F_{ST} é próximo ao encontrado por Sinclair et al. (2006) ($F_{ST}=0,064$; 180 km), o que sugere que essa distância, juntamente com a alteração da paisagem (influência na capacidade de deslocamento dos animais), já pode levar a um início de estruturação e ao longo do tempo se tornar mais acentuada, ainda mais levando-se em conta o processo contínuo de fragmentação da paisagem e perda de hábitat. O resultado encontrado no cálculo do índice de Jost (2008) também mostra essa estruturação, com um valor ainda mais elevado, já que esse índice leva em conta apenas os alelos efetivos. Essa estruturação também é reforçada pelos resultados do Structure e do Genetix que mostram a existência de dois grandes grupos, um composto pela população da EEC e outro pela população estudada por Miotto et al. (2011). O resultados do Structure também mostram que alguns indivíduos da população de Miotto et.al (2011) poderiam também pertencer a população de Caetetus, demonstrando a ocorrência de fluxo gênico. A análise de parentesco também evidencia isso, já que foram encontrados indivíduos “meio-irmãos”

entre essas populações. O indivíduo de Caetetus (Pc6), que apresentou parentesco com os indivíduos 18 e 32 de Miotto et al. (2011), foi capturado apenas em nossa penúltima ocasião de coleta, corroborando com nossa suposição de que pode se tratar de indivíduo migrante. Tal resultado confirma a capacidade de dispersão que esses animais possuem (a maior já descrita é de 483 km em linha reta, Logan e Sweanor, 2000) e também podem indicar que estão sendo forçados a dispersarem para fragmentos mais distantes em busca de áreas para se estabelecerem, o que também é fortalecido pelo aumento no número de atropelamentos desses animais nos últimos anos como descrito por Miotto et al. (2011).

6. CONCLUSÕES

Considerando o grau de ameaça e os poucos remanescentes de Mata Atlântica no interior do estado de São Paulo, este trabalho mostra a importância da conservação desses, em especial, o da Estação Ecológica de Caetetus como um dos poucos remanescentes protegidos no interior do estado. Os resultados aqui encontrados, tanto demográficos quanto os de diversidade genética, mostram a importância da conservação desses fragmentos para a permanência dessas espécies de carnívoros e das outras espécies que abrigam, já que a presença desses predadores reflete a “qualidade” do habitat. Tal abordagem de análises demográficas e genéticas em conjunto permite ainda compreender melhor como os aspectos ecológicos, comportamentais e genéticos de uma espécie se relacionam, podendo ser propostas medidas mais eficientes para a conservação. Dentre essas medidas, a conexão entre fragmentos que permitam o fluxo gênico entre as populações e que também permitam ampliar os recursos para as espécies é essencial para a manutenção de sua viabilidade a longo prazo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A abordagem das estimativas demográficas em conjunto com as análises genéticas a partir das amostras não invasivas fornecem um conjunto de informações importante para ampliar o conhecimento sobre as espécies estudadas, inclusive comportamentos de dispersão e *status* genético.

A diversidade genética encontrada nas duas espécies foi menor quando comparadas a outros trabalhos, o que pode estar relacionado ao tamanho da área de estudo e, conseqüentemente, ao baixo número de indivíduos encontrados e utilizados nas análises de

diversidade genética. Apesar do tamanho amostral pequeno, os níveis de diversidade genética já podem estar indicando uma redução da diversidade nessas populações devido à fragmentação do ambiente, resultando na estruturação encontrada. Porém, os dados também mostram que ainda há fluxo gênico com indivíduos de outras localidades, o que faz com que a estruturação ainda não seja mais acentuada e pode indicar também, que cada vez mais, esses animais têm que se dispersar por grandes distâncias em busca de uma área adequada.

A comparação da diversidade genética entre *L. pardalis* e *P. concolor* reflete os aspectos comportamentais das espécies, como maior tendência das jaguatiricas de estarem associadas a vegetações mais densas, evitar áreas mais antropizadas e menor capacidade de dispersão, o que reduz o potencial de fluxo gênico com indivíduos de outras populações, enquanto que as onças-pardas podem apresentar fluxo gênico com populações distantes. Tais características foram também evidenciadas pelo local de coleta das amostras, todas nas trilhas internas da EEC, diferentemente das amostras de onça-parda.

Dessa forma, este trabalho colabora ao ampliar o conhecimento sobre os aspectos genéticos e ecológicos dessas duas espécies de felinos e, em conjunto, com outros trabalhos pode fornecer dados importantes que auxiliem na sua conservação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALME, G. A.; HUNTER, L. T. B.; SLOTOW, R. Evaluating methods for counting cryptic carnivores. **The Journal of Wildlife Management**, v. 73, n. 3, p. 433-441, 2009.

BELKHIR K. et al. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). 1996-2004.

BIANCHI, R. D. C.; MENDES, S. L. Ocelot (*Leopardus pardalis*) predation on primates in Caratinga Biological Station, southeast Brazil. **American Journal of Primatology**, v. 69, n. 10, p. 1173-1178, 2007.

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

BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. **Trends Ecology Evolutionary**, v. 18, p. 503–511. 2003.

BROOKFIELD, J. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular ecology**, v. 5, n. 3, p. 453-455, 1996.

CASTRO-ARELLANO et al. Hair-Trap Efficacy for Detecting Mammalian Carnivores in the Tropics. **The Journal of Wildlife Management**, v. 72, n. 6, p. 1405-1412, 2008.

CHAKRABORTY, R. et al. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. **Annals of Human Genetics**, v. 56, n. 1, p. 45-57, 1992.

CHAME, M. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 71-94, 2003.

CHAPIN III, F. S. et. Consequences of changing biodiversity. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 234-242, 2000.

CHAVES, P. B. et al. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 18-35, 2012.

CHEIDA, C. C. et al. Ordem Carnívora (Cap. 08). In: REIS, N. R. D.;PERACCHI, A. L., et al (Ed.). **Mamíferos do Brasil**. Ed. Londrina (Paraná): EDUEL, 2006. p.232-266.

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

CHIVIAN, E. Biodiversity: its importance to human health. In: CHIVIAN, E. (Ed.). **Harvard Medical School, Boston**. Ed., 2002. cap. 1 "Biodiversity", p.6-12.

CONFORTI, V. A.; DE AZEVEDO, F. C. C. Local perceptions of jaguars (*Panthera onca*) and pumas (*Puma concolor*) in the Iguaçu National Park area, south Brazil. **Biological Conservation**, v. 111, n. 2, p. 215-221, 2003.

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

DEYOUNG, R. W.; HONEYCUTT, R. L.; BRENNAN. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. **Journal of Wildlife Management**, v. 69, n. 4, p. 1362-1384, 2005.

DI BITETTI, M. S.; PAVIOLO, A.; DE ANGELO, C. Density, habitat use and activity patterns of ocelots (*Leopardus pardalis*) in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. **Journal of Zoology**, v. 270, n. 1, p. 153-163, 2006.

DI BITETTI, M. S. et al. Local and continental correlates of the abundance of a Neotropical cat, the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Journal of Tropical Ecology**, v. 24, n. 2, p. 189, 2008.

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. 2611-2620, 2005.

FARRELL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1583-1590, 2001.

FIGUEIREDO, M. G. D. **Caracterização genética de duas populações de jaguatirica, *Leopardus pardalis* (felidae, carnívora) do corredor de fluxo de biodiversidade do Rio Paraná.** 2008. 51p. (Dissertação). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2008.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 29, n. 1, p. 305-327, 1995.

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

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação.** Ribeirão Preto, SP: Ed. SBG, 2008. 280p.

GILAD, O. et al. Cougars in Guadalupe Mountains National Park, Texas: Estimates of Occurrence and Distribution Using Analysis of DNA. **The Southwestern Naturalist**, v. 56, n. 3, p. 297-304, 2011.

GONÇALVES DA SILVA, A.; RUSSELLO, M. A. iREL: *software* for implementing pairwise relatedness estimators and evaluating their performance. **Conservation Genetic Resources**. v.3, p69-71. 2010.

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

GRIGIONE, M. et al. Ecological and allometric determinants of home-range size for mountain lions (*Puma concolor*). **Animal Conservation**, v. 5, n. 4, p. 317-324, 2002.

GU, W.; SWIHART, R. K. Absent or undetected? Effects of non-detection of species occurrence on wildlife-habitat models. **Biological Conservation**, v. 116, n. 2, p. 195-203, 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series, 1999. p.95-98.

HELLER, R.; OKELLO, J.; SIEGISMUND, H. Can small wildlife conservancies maintain genetically stable populations of large mammals? Evidence for increased genetic drift in

geographically restricted populations of Cape buffalo in East Africa. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 7, p. 1324-1334, 2010.

IBAMA; MMA. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília, DF: Ed. MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008. 1420p.

IBGE. **Mapa de vegetação do Brasil**. Brasília, DF 1988.

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

JANEČKA, J. et al. Reduced genetic diversity and isolation of remnant ocelot populations occupying a severely fragmented landscape in southern Texas. **Animal Conservation**, v. 14, n. 6, p. 608-619, 2011.

JOLLY, G. M. Explicit estimates from capture-recapture data with both death and immigration-stochastic model. **Biometrika**, v. 52, n. 1/2, p. 225-247, 1965.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular ecology**, v. 17, n. 18, p. 4015-4026, 2008.

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

KELLY, M. J.; et al. Estimating puma densities from camera trapping across three study sites: Bolivia, Argentina, and Belize. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 2, p. 408-418, 2008.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KOHN, M. H.; WAYNE, R. K. Facts from feces revisited. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 6, p. 223-227, 1997.

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

KURUSHIMA, J. D. et al. Development of 21 microsatellite loci for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 1260-1262, 2006.

LARKIN, M. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

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

LINDZEY, F. G. et al. Cougar population dynamics in southern Utah. **The Journal of Wildlife Management**, p. 619-624, 1994.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**, v2, p383-389, 1975.

LOGAN, K. A.; SWEANOR, L. L. **Desert puma: evolutionary ecology and conservation of an enduring carnivore**. Washington: Ed. Island Press, 2001. ISBN 1559638672.

MAFFEI, L. et al. Ocelot (*Felis pardalis*) population densities, activity, and ranging behaviour in the dry forests of eastern Bolivia: data from camera trapping. **Journal of Tropical Ecology**, v. 21, n. 3, p. 349-353, 2005.

MARKOVCHICK-NICHOLLS, L. et al. Relationships between human disturbance and wildlife land use in urban habitat fragments. **Conservation Biology**, v. 22, n. 1, p. 99-109, 2008.

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

MARTINS, N. **Padronização de um protocolo para a extração de DNA a partir de pêlos e individualização de amostras de pêlos de onça-parda (*Puma concolor*) obtidos**

por meio de armadilhas não invasivas. (2009). 45p. (Monografia). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos (SP), 2009.

_____. **Tamanho populacional mínimo e diversidade genética de onça-parda (*Puma concolor*) no núcleo de Santa Virgínia, Parque Estadual da serra do Mar, São Paulo.** (2011). 59p. Dissertação. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2011.

MENOTTI-RAYMOND, M. et al. A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). **Genomics**, v. 57, n. 1, p. 9-23, 1999.

MICHALSKI, F. et al. Successful carnivore identification with faecal DNA across a fragmented Amazonian landscape. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 5, p. 862-871, 2011.

MILLER, B. et al. The importance of large carnivores to healthy ecosystems. **Endangered Species Update**, v. 18, n. 5, p. 202-210, 2001.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros.** Maury, C. M. (Org.). Brasília. 2002. 404 p.

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

MIOTTO, R. A. **Demografia e variação genética de *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) na região nordeste do estado de São Paulo.** (2010). 127p. (Tese). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos (SP), 2010.

MIOTTO, R. et al. Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 6, p. 1447-1455, 2011.

MIOTTO, R. A. et al. Monitoring a Puma (*Puma concolor*) Population in a Fragmented Landscape in Southeast Brazil. **Biotropica**, v. 44, n. 1, p. 98-104, 2012.

MURRAY, J. L.; GARDNER, G. L. *Leopardus pardalis*. **Mammalian species**, n. 548, p. 1-10, 1997.

NEGRÕES, N. et al. Use of Camera-Trapping to Estimate Puma Density and Influencing Factors in Central Brazil. **The Journal of Wildlife Management**, v. 74, n. 6, p. 1195-1203, 2010.

NOSS, R. F. et al. Conservation Biology and Carnivore Conservation in the Rocky Mountains. **Conservation Biology**, p. 949-963, 1996.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate¹. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2006.

OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de identificação de felinos brasileiros**. Atibaia (SP): Ed. Instituto Pró-Carnívoros; Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Sociedade de Zoológicos do Brasil, Pró-Vida Brasil, 1999. 80p.

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

PALEN, G. F.; GODDARD, G. V. Catnip and oestrous behaviour in the cat. **Animal Behaviour**, v. 14, n. 2, p. 372-377, 1966.

PALOMARES, F. et al. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 10, p. 2171-2182, 2002.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN JR L, R. R., VALLADARES-PADUA C. (Ed.). **Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Ed. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná: Editora UFPR, 2003. p.343-380.

PILGRIM, K. et al. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 60-61, 2005.

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

PORTELLA, T. P. Armadilhas de pelos como método de amostragem não-invasiva para felídeos neotropicais: uma abordagem metodológica. 2011. (Dissertação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PRIMACK, R.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, Paraná: Ed. Gráfica e Editora Planta, 2001. 328p.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PRUGH, L.; RITLAND, C.; ARTHUR, S. e KREBS, C. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 5, p. 1585-1596, 2005.

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

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

REXSTAD, E.; BURNHAM, K. P. **User's guide for interactive program CAPTURE**. Colorado: Ed. Color. Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, 1991.

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

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989.

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

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

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.

RUTH, T. K. et al. Evaluating cougar translocation in New Mexico. **The Journal of Wildlife Management**, p. 1264-1275, 1998.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. **Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar**. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Florestal, Divisão de Reservas e Parques Estaduais. São Paulo: SMA, 2006, 679 p.

SARMENTO, P. et al. Evaluation of camera trapping for estimating red fox abundance. **The Journal of Wildlife Management**, v. 73, n. 7, p. 1207-1212, 2009.

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

SEBER, G. A. F. A note on the multiple-recapture census. **Biometrika**, v. 52, n. 1/2, p. 249-259, 1965.

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

SILVER, S. C. et al. The use of camera traps for estimating jaguar *Panthera onca* abundance and density using capture/recapture analysis. **Oryx**, v. 38, n. 2, p. 148-154, 2004.

SINCLAIR, E. A. et al. Gene flow estimates in Utah's cougars imply management beyond Utah. **Animal Conservation**, v. 4, n. 3, p. 257-264, 2011.

SPIELMAN, D. et al. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? **Conservation Genetics**, v. 5, n. 4, p. 439-448, 2004.

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

SUNQUIST, M.; SUNQUIST, F. **Wild cats of the world**. Ed. University of Chicago Press, 2002.

SWEANOR, L.; LOGAN, K.; HORNOCKER, M. Cougar Dispersal Patterns, Metapopulation Dynamics, and Conservation. **Conservation Biology**, v. 14, n. 3, p. 798-808, 2000.

TABANEZ, M. F.; DURIGAN, G.; KEUROGHLIAN, A.; BARBOSA, A. F. e FREITAS, C. A. D. Plano de Manejo da Estação Ecológica dos Caetetus. **IF Sér. Reg., São Paulo**, v. 29, 2005.

TABARELLI, M. et al. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695-700, 2005.

TABERLET, P. et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 16, p. 3189-3194, 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAUTZ, D.; SCHLÖTTERER, C. Simple sequences. **Current opinion in genetics & development**, v. 4, n. 6, p. 832-837, 1994.

VALIÈRE, N. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 3, p. 377-379, 2002.

VERDADE, L. M.; CAMPOS, C. B. How much is a puma worth? Economic compensation as an alternative for the conflict between wildlife conservation and livestock production in Brazil. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-4. 2004.

WAITS, L. P.; PAETKAU, D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. **Journal of Wildlife Management**, v. 69, n. 4, p. 1419-1433, 2005.

WAPLES, R. S. Spatial-temporal stratifications in natural populations and how they affect understanding and estimation of effective population size. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 5, p. 785-796, 2010.

WAPLES, R. S.; DO, C. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 4, p. 753-756, 2008.

WEAVER, J. L. et al. Use of scented hair snares to detect ocelots. **Wildlife Society Bulletin**, v. 33, n. 4, p. 1384-1391, 2005.

WEBER, W.; RABINOWITZ, A. A global perspective on large carnivore conservation. **Conservation Biology**, v. 10, n. 4, p. 1046-1054, 1996.

WHITE, G. C.; BURNHAM, K. P. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. **Bird study**, v. 46, n. S1, p. 120-139, 1999.

WILSON, K. R.; ANDERSON, D. R. Evaluation of two density estimators of small mammal population size. **Journal of Mammalogy**, p. 13-21, 1985.

WOODROFFE, R.; GINSBERG, J. R. Edge effects and the extinction of populations inside protected areas. **Science**, v. 280, n. 5372, p. 2126-2128, 1998.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Human Genetics**, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.

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