

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Andiara Silos M. C. Souza

**DEMOGRAFIA E DISTRIBUIÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS MAIORES
FELINOS DAS AMÉRICAS (*Puma concolor* E *Panthera onca*) EM FRAGMENTOS DE
MATA ATLÂNTICA**

São Carlos/SP

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

TESE DE DOUTORADO

**DEMOGRAFIA E DISTRIBUIÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS MAIORES
FELINOS DAS AMÉRICAS (*Puma concolor* E *Panthera onca*) EM FRAGMENTOS DE
MATA ATLÂNTICA**

Andiara Silos M. C. Souza

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

São Carlos/SP

2015

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

S729d Souza, Andiará Silos Moraes de Castro e
Demografia e distribuição da diversidade genética
dos maiores felinos das Américas (Puma concolor e
Panthera onca) em fragmentos de mata atlântica /
Andiará Silos Moraes de Castro e Souza. -- São
Carlos : UFSCar, 2015.
69 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Análises genéticas populacionais. 2. Genética
da conservação. 3. Marcadores moleculares. 4.
Felinos. 5. Fragmentação. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Andiará Silos Moraes de Castro e Souza, realizada em 14/08/2015:

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior
UFSCar

Profa. Dra. Danielly Veloso Blanck
UFSCar

Profa. Dra. Alexandra Sanches
UFSCar

Profa. Dra. Renata Alonso Miotto
ESALQ/USP

Prof. Dr. Eduardo Eizirik
PUCRS

**Dedico este trabalho à toda a minha família,
que sempre me incentivou, apoiou e amparou.
Em especial, aos meus pais (Monica e José Geraldo),
irmãos (Heitor e Carol) e namorado, Felipe.
Muito obrigada por tudo!
Amo todos vocês.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que sempre iluminou os meus caminhos e me ajudou para que eu chegasse até aqui.

À minha família, que sempre nos incentivou a estudar e a batalhar por nossos sonhos. Pelo apoio de sempre, carinho, ajudas financeiras e principalmente pelo imenso amor. Se eu cheguei até aqui, grande parte disso eu devo a vocês.

Ao meu orientador, Pedro Galetti, pela orientação durante esses quatro anos e por ter me apoiado e incentivado durante todo o percurso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pela oportunidade.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) por tantas e tantas ajudas, conversas e momentos de relaxamento.

Em especial, ao Bruno Henrique Saranholi, Ueslei Lopes, Alline Braga, Fernanda Ribeiro Lima, Rosane Silva e Camilla Alves pela imensa ajuda em laboratório, nas correções dos textos e pela atenção e carinho durante todos esses anos.

À Ivanildes, secretária da Pós-graduação, pela atenção de sempre, carinho e conversas.

À COTEC pela licença de coleta nas Unidades de Conservação estudadas.

Aos professores Eduardo Eizirik, Renata Miotto, Alexandra Sanches, Danielly Veloso Blanck, Reinaldo Alves Brito, Flavio Henrique Silva, Andréa da Costa Fuentes e Alessandra Fávero pelas enormes contribuições nas bancas do projeto, qualificação e defesa.

À todos os colaboradores que gentilmente forneceram as amostras de fezes utilizadas neste trabalho, principalmente o Projeto Sussuarana na Serra do Brigadeiro e o Projeto Jaguar, além dos pesquisadores Juliano Peixoto, Francesca Palmeira, Cristiano Trinca, Lilian Rampim, João Paulo Villani, Lilian Bonjorne, Marcelo Mazzolli, Leandro Silveira, Marina Xavier da Silva, Beatriz Beisiegel e o CENAP.

Ao revisor da FAPESP por todas as sugestões, incentivos e avaliações. Todos os comentários foram de extrema importância e incentivadores para mim. Muito obrigada!

À FAPESP pelo apoio e financiamento da bolsa de estudo e reserva técnica.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 A Mata Atlântica.....	10
1.2 Consequências genéticas da fragmentação nos grandes carnívoros.....	12
1.3 Os grandes felinos.....	12
1.4 A Onça-pintada.....	14
1.5 A Onça-parda	16
1.6 A genética não invasiva e os marcadores moleculares.....	17
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS	20
2.1 Hipóteses	20
2.2 Objetivo Geral.....	20
2.3 Objetivos Específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Áreas de Estudo.....	22
3.2 Coleta de amostras	23
3.3 Extração de DNA e identificação das espécies de onças.....	24
3.4 Número mínimo de indivíduos em cada Unidade de Conservação.....	25
3.5 Razão sexual.....	27
3.6 Melanismo em onças-pintadas.....	27
3.7 Análises populacionais de estruturação genética	28
3.8 Análises populacionais de diversidade genética	30
3.9 Estimativas de parentesco entre os indivíduos	31
4. RESULTADOS	31
4.1 Identificação das espécies de onças.....	31
4.2 Onças-pintadas.....	33

4.2.1 Demografia	33
4.2.2 Estruturação genética.....	35
4.2.3. Diversidade genética e parentesco	39
4.3 Onça-parda.....	42
4.3.1 Demografia	42
4.3.2 Estruturação genética.....	45
4.3.3. Diversidade genética e parentesco	49
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	58
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMO

A intensa devastação no ambiente vem contribuindo significativamente para o declínio e isolamento de populações selvagens, proporcionando uma intensificação dos efeitos da deriva genética e na taxa de endogamia. Estes fatores, por sua vez, reduzem a habilidade dos indivíduos se adaptarem às mudanças ambientais, tornando-os vulneráveis à extinção. Os maiores predadores das Américas, a onça-parda (*Puma concolor*) e a onça-pintada (*Panthera onca*) estão entre os animais ameaçados pela redução e fragmentação dos habitats, principalmente na Mata Atlântica, que é um dos biomas mundiais mais antropizados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar parâmetros demográficos e a distribuição da diversidade genética de populações de onças presentes em remanescentes de Mata Atlântica. Os fragmentos elegidos (Serra da Mantiqueira, contínuo da Serra do Mar e Parque Nacional do Iguaçu) estão entre os mais importantes para a conservação desses felinos. Amostras predominantemente não invasivas (fezes e pelos) foram coletadas em Unidades de Conservação presentes nesses remanescentes. A espécie depositora das fezes foi confirmada através da amplificação do gene ATP6 e as amostras foram individualizadas por meio de locos de microssatélites, os quais também foram empregados nas análises populacionais. O sexo dos indivíduos foi determinado por meio de um fragmento do gene da amelogenina. Os resultados indicaram que ao menos sete indivíduos de onças-pintadas (4F:3M) habitam o Parque Nacional do Iguaçu e 12 (5F:7M) estão presentes no contínuo da Serra do Mar. Essas populações parecem estar diferenciadas, com evidência de baixo fluxo gênico entre elas (ausência de indivíduos migrantes e misturados, além de pares de indivíduos altamente relacionados). No Iguaçu também foi estimado existir pelo menos sete onças-pardas (3F:4M), além de quatro (1F:3M) na Serra da Mantiqueira e 14 (5F:9M) no contínuo da Serra do Mar. Estruturação genética foi detectada nessa espécie, entretanto, com indícios de fluxo gênico entre as duas populações detectadas (evidência de indivíduos migrantes e misturados, além de pares de indivíduos predominantemente não relacionados). Em ambas as espécies foram exibidos altos níveis de diversidade genética. Este estudo gerou informações primordiais, ainda desconhecidas, sobre a demografia e a estruturação de populações de onças na Mata Atlântica. Tais dados poderão ser utilizados em monitoramentos, além de serem cruciais e decisivos no incremento de estratégias efetivas para a conservação dessas espécies.

Palavras-chave: Análises genéticas populacionais, genética da conservação, marcadores moleculares, felinos, amostragem não invasiva, fragmentação.

ABSTRACT

The intense destruction of the environment contributed to the decline and isolation of wild populations, providing an intensification of genetic drift and inbreeding effects. These factors reduce the ability of individuals to adapt to environmental changes, making them more vulnerable to extinction. The two largest predators of the Americas, the cougar (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) are animals which are threatened by the reduction and fragmentation of habitats, especially in the Atlantic Forest, which is one of the most degraded biomes in the world due to human actions. The present study aimed to investigate both demographic parameters and the distribution of the genetic diversity of cougar and jaguar populations within Atlantic Forest remnants. The chosen areas (Serra da Mantiqueira, Serra do Mar continuous and Iguaçu National Park) are among the most important for the conservation of these cats. Mostly non-invasive samples (feces and hair) were collected in protected areas present in those remaining. The depositor species was confirmed by amplification of the ATP6 gene and the samples were individualized using microsatellite loci, which were also employed in population analyses. The sex of the individuals was determined using a small fragment of amelogenin gene. The results suggest that at least seven individuals of jaguars (4F:3M) inhabit the Iguaçu National Park and 12 (5F:7M) are present in the Serra do Mar continuous. These populations seem to be different, with evidence of low gene flow between them (lack of migrant and mixed individuals and pairs of highly related individuals). In Iguaçu is also estimated to exist at least seven cougars (3F:4M), also four (1F:3M) in the Serra da Mantiqueira and 14 (5F:9M) in the Serra do Mar continuous. Genetic structure was detected in this species, but evidencing gene flow maintenance between two detected populations (sign of migrants and mixed individuals and predominantly non related individuals). In both species high genetic diversity could be observed. This study obtained critical information and still unknown, about the demographic and structure of jaguar and cougar populations in the Atlantic Forest remain. These data will provide substantial information that can be used in monitoring, as well as being crucial and decisive in the increase of effective strategies for the conservation of these species.

Keywords: Population genetic analysis, conservation genetics, molecular markers, felids, non-invasive sampling, fragmentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa do Brasil apresentando as áreas de cobertura original (bege) e atual de Mata Atlântica (verde-escuro).....	11
Figura 2 - Fotografia de um indivíduo de onça-pintada em Rio Negro/MS.....	14
Figura 3- Mapa de distribuição da onça-pintada, mostrando em cinza-claro a distribuição histórica e em cinza-escuro a distribuição atual.....	15
Figura 4- Fotografia de um indivíduo em cativeiro de onça-parda em São Carlos/SP.....	16
Figura 5- Área de distribuição atual da onça-parda nas Américas em vermelho.	17
Figura 6- Mapa exibindo os remanescentes de Mata Atlântica no Brasil com destaque para as Unidades de Conservação amostradas.....	23
Figura 7- Gráficos gerados na análise Bayesiana de estruturação populacional sem dados <i>a priori</i>	46
Figura 8- Gráfico originário de análise Bayesiana com a distribuição dos indivíduos considerando o número de UCs amostradas ($k = 6$).	46
Figura 9- Gráfico gerado no programa BAPS sem informação geográfica dos indivíduos, gerando um número de agrupamentos de $k=2$	47
Figura 10- Gráfico em 3D gerado pelo programa BAPS após a informação sobre a localização geográfica das amostras.....	47
Figura 11- Gráfico gerado pela análise Bayesiana com a informação <i>a priori</i> de dois grupos populacionais, um composto por indivíduos coletados no contínuo da Serra do Mar e outro por indivíduos do PNI.....	48
Figura 12- Gráfico em 3D gerado pela análise ACF mostrando a distância espacial dos indivíduos quando foram consideradas duas populações distintas.....	48
Figura 13- Gráfico comparando o padrão alélico das suas populações de onças-pardas.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Individualização das 27 amostras de onças-pintadas identificadas como 19 indivíduos.	33
Tabela 2- Quadro informando sobre os alelos encontrados e as probabilidades de identidade.....	34
Tabela 3- Distribuição da variação genética dentro e entre as populações de acordo com a AMOVA.	39
Tabela 4- Estimativas de diversidade genética de duas populações de onças-pintadas baseado em 10 locos de microssatélites polimórficos.....	40
Tabela 5- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-pintada da população da Serra do Mar.	41
Tabela 6- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-pintada da população do PNI.....	42
Tabela 7- Individualização de 45 amostras de onças-pardas em 25 diferentes genótipos.....	43
Tabela 8- Número de alelos por loco, conteúdo de informação dos locos, variação do tamanho dos alelos e probabilidades de identidade não enviesada ($P_{IDunbias}$) e para indivíduos aparentados (P_{IDSibs}).	44
Tabela 9- Distribuição da variação genética dentro e entre as populações de acordo com a AMOVA.	48
Tabela 10- Estimativas de diversidade genética de 25 indivíduos de onças-pardas de duas populações baseado em 11 locos de microssatélites polimórficos.	50
Tabela 11- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-parda da população da Serra do Mar.	51
Tabela 12- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-parda da população do PNI.	51

1. INTRODUÇÃO

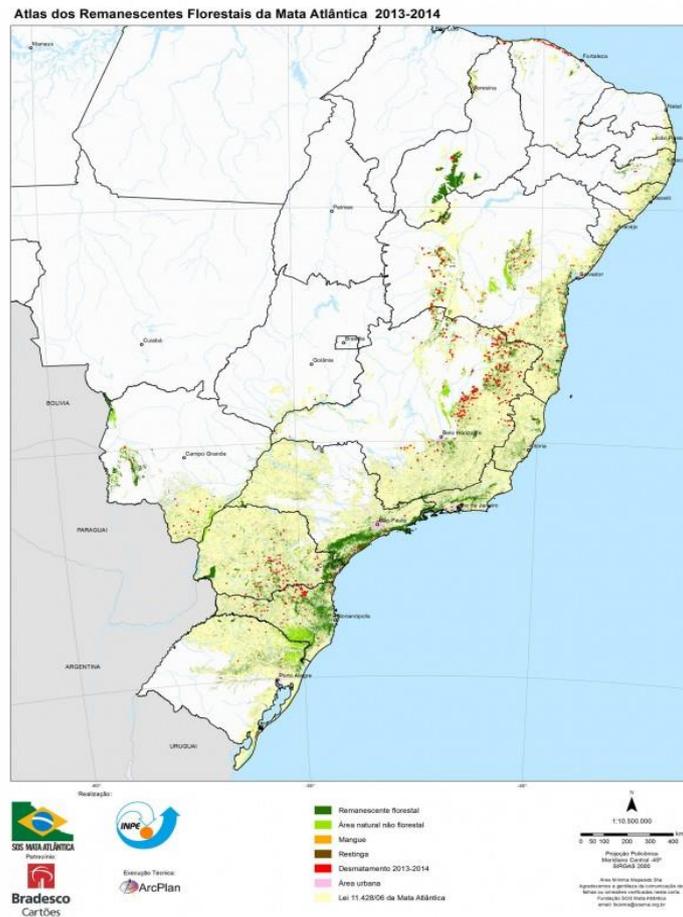
No último século a taxa de extinção das espécies foi 1.000 vezes maior ao que já havia sido documentado historicamente (CHIVIAN, 2002; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; PIMM et al., 1995), sendo por isso chamada de a sexta extinção em massa (VIGNIERI, 2014). As ações antrópicas são as maiores responsáveis por esta catástrofe, culpadas por cerca de 5-20% da taxa de extinção das espécies (LAWTON; MAY, 1995). As inúmeras perturbações antrópicas têm prejudicado e deteriorado os biomas de várias formas, mas, principalmente pela destruição e fragmentação dos habitats (CHIVIAN, 2002; PRIMACK; RODRIGUES, 2001; VIGNIERI, 2014).

A intensa devastação tem contribuído significativamente para a redução da diversidade de espécies, além do declínio e isolamento de populações selvagens, tendo como principal consequência o aumento do risco de extinção de uma população ou mesmo de uma espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002; SCHIPPER; CHANSON; CHIOZZA, 2008). Isso porque, pequenas populações possuem uma maior suscetibilidade aos fatores estocásticos ambientais, demográficos e genéticos, afetando sua viabilidade a longo prazo (FISHER; LINDENMAYER, 2007; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002). Entre os biomas mundiais mais devastados e ameaçados do mundo encontra-se a Mata Atlântica (LAGOS; MILLER, 2007).

1.1 A Mata Atlântica

Este bioma é considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade dado sua excepcional riqueza, alta taxa de endemismo e grande ameaça em que se depara (MYERS et al., 2000). A intensa intervenção antrópica tem removido e substituído a vegetação natural e é a grande responsável pelo atual grau de destruição do bioma. Estima-se que a cobertura original da Mata Atlântica ocupava 15% do território brasileiro, abrangendo 17 estados, além de regiões da Argentina e do Paraguai. Atualmente, restam apenas 11,2% de sua vegetação nativa (Figura 1), representada sobretudo por fragmentos pequenos e isolados (RIBEIRO et al., 2009). Além disso, menos de 9,3% desses remanescentes estão em áreas legalmente protegidas (RIBEIRO et al., 2009).

Figura 1- Mapa do Brasil apresentando as áreas de cobertura original (bege) e atual de Mata Atlântica (verde-escuro).



Fonte do mapa: SOS Mata Atlântica (03/07/2015).

Na região sudeste do país, mais especificamente na Mata Atlântica costeira, onde predomina a maior cobertura do bioma, vivem cerca de 72% da população brasileira (aproximadamente 145 milhões de habitantes) (FSOSMA; INPE, 2015). Ou seja, ainda hoje a região sofre grande degradação ambiental devido ao alto grau de ocupação humana e intensa pressão. Os maiores remanescentes do bioma estão localizados nessa região, nas encostas e picos da Serra do Mar (que abrange os estados de SP e PR) e da Serra da Mantiqueira (estados de MG e SP), sendo que só o primeiro abrange cerca de 7% dos remanescentes (LAGOS; MULLER, 2007; RIBEIRO et al., 2009).

Já a Mata Atlântica de interior apresenta-se enormemente fragmentada e com inúmeras pressões antrópicas. No entanto, a agricultura e a caça ilegal também tem sido sugeridas como uma das maiores ameaças para a biodiversidade. O Parque Nacional do Iguaçu (estado do PR) compreende um dos maiores remanescentes do interior, sendo composto principalmente por Florestas de Araucárias. Nesta área apenas 3,1% dos remanescentes estão legalmente protegidos (RIBEIRO et al., 2009).

1.2 Consequências genéticas da fragmentação nos grandes carnívoros

Atualmente, cerca de 270 espécies de mamíferos ainda habitam os remanescentes de Mata Atlântica (FSOSMA; INPE, 2015). Estes animais estão em constante declínio (GINSBERG, 2001) e são enormemente afetados pela interrupção de seu deslocamento, alterações de sua área de vida, aquisição de doenças (WEBER; RABINOWITZ, 1996), conflitos com agricultores (CONFORTI; DE AZEVEDO, 2003) e pela modificação dos seus padrões de reprodução (EIZIRIK et al., 2008).

Os grandes carnívoros, especialmente os predadores de topo de cadeia alimentar, exigem amplas áreas de vida para suprir sua demanda energética (NOSS et al., 1996). Adicionado a isso, apresentam baixa densidade (SWEANOR; LOGAN; HORNOCKER, 2000) e baixa taxa de crescimento populacional, sendo, muitas vezes, os animais mais impactados com a fragmentação e os primeiros a desaparecer em um ambiente devastado (GITTLEMAN et al., 2001; PURVIS; MACE; GITTLEMAN, 2001).

Populações pequenas e isoladas tendem a apresentar uma redução ou perda completa de fluxo gênico entre os fragmentos. Estes fatores podem ocasionar nas populações uma maior suscetibilidade aos efeitos da deriva genética (flutuação ao acaso das frequências alélicas entre gerações), além de um aumento na taxa de endogamia (cruzamento entre parentes) (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002; SPIELMAN et al., 2004). Com a intensificação destes fatores, alelos deletérios podem se tornar fixados (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002), comprometendo o potencial adaptativo das populações (LEHMAN; PERRIN, 2006). Como consequência, podem ocorrer efeitos potenciais deletérios, como por exemplo, sobre a produção e a viabilidade dos espermatozoides, a habilidade de acasalamento, fecundidade da fêmea e sobrevivência juvenil (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002). Em último caso, a capacidade dos indivíduos em se adaptar a futuras alterações ambientais pode ser reduzida, aumentando a probabilidade de extinção da população (FAHRIG, 2003; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002; SCHIPPER; CHANSON; CHIOZZA, 2008).

1.3 Os grandes felinos

Os felinos que habitam a região Neotropical abrangem 11 espécies, das quais, seis são endêmicas desse território (MCDONALD; LOVERIDGE, 2010). No Brasil são descritas nove espécies de gatos selvagens: gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), gato-do-mato-pequeno do nordeste (*Leopardus tigrinus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato-do-mato-pequeno do sul (*Leopardus*

guttulus), onça-pintada (*Panthera onca*), onça-parda (*Puma concolor*) e jaguarundi (*Puma yagouaroundi*). Os maiores felinos citados são a onça-parda e a onça-pintada, sendo que a última corresponde ao maior predador terrestre do Neotrópico.

Estes grandes felinos são animais territorialistas e solitários, capazes de dispersar eficientemente por grandes distâncias (OLIVEIRA, 1994; SEYMOUR, 1989), sendo que os machos dispersam por maiores distâncias e com maior frequência do que as fêmeas (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; QUIGLEY; CRAWSHAW, 1992; OLIVEIRA, 1994). São também predadores oportunistas que se alimentam principalmente de mamíferos, além de aves, répteis e invertebrados (EMMONS, 1987; OLIVEIRA, 1994; SEYMOUR, 1989). Habitam diferentes tipos de ambientes e por isso, estão presentes em diversos biomas brasileiros (OLIVEIRA; CASSARO, 2005; SUNQUIST; SUNQUIST, 2002; ZELLER, 2007). Requerem uma grande área de vida para sua sobrevivência (SCHWAB; ZANDBERGEN, 2011). As fêmeas geralmente exibem filopatria, estabelecendo seu território próximo ao da mãe (SWEANOR; LOGAN; HORNOCKER, 2000).

A onça-parda e a onça-pintada têm como particularidade serem predadores de topo de cadeia alimentar. A onça-pintada, especificamente, é considerada uma espécie-chave para a conservação do ambiente, visto que têm um importante papel na manutenção do bioma, mantendo e restaurando a diversidade e a resiliência dos mesmos (CROOKS, 2002; NOSS et al., 1996; TERBORGH et al., 2001). A presença desse felino na área pode ser um indicador da integridade e do potencial de recuperação do ambiente (NOSS et al., 1996). Ambas as espécies exigem uma grande área de vida, abrangendo também áreas de outras espécies, por isso, a conservação da espécie de topo proporcionará proteção a outras espécies simpátricas (espécies guarda-chuva) (GRIGIONE et al., 2009; PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

Ambas as espécies se encontram mundialmente ameaçadas de extinção (IUCN, 2015), sendo que a onça-parda está classificada como não preocupante (*least concern*) devido a sua ampla distribuição, enquanto que a onça-pintada está próxima da ameaça (*near threatened*). No Brasil, ambas as espécies se encontram vulneráveis (BRASIL, 2014). A perda e a fragmentação dos habitats são citados como os principais fatores responsáveis por essa ameaça (PALMEIRA et al., 2008; NOWELL; JACKSON, 1996). A onça-parda é mais sensível a perda de habitat do que à fragmentação, já que é capaz de se deslocar entre fragmentos (PALMEIRA et al., 2008). Já a onça-pintada possui uma menor resistência às ameaças antropogênicas, uma vez que apresenta preferência por remanescentes florestais menos impactados (NOVACK et al., 2003; SILVEIRA, 2004), evitando áreas agrícolas e pastagens (CULLEN et al., 2005). Outras

ameaças à persistência dessas espécies incluem os conflitos com os seres humanos durante os deslocamentos (CROOKS, 2002; NOWELL; JACKSON, 1996), a caça, diminuição de presas alimentares (WEBER; RABINOWITZ, 1996) e o crescente número de atropelamentos em rodovias e estradas, principalmente da onça-parda.

1.4 A Onça-pintada

A onça-pintada, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758) (Figura 2) é o único representante do gênero *Panthera* nas Américas (NOWELL; JACKSON, 1996) e sem dúvida, uma das espécies de conservação mais carismáticas do Neotrópico (CAVALCANTI; GESE, 2009).

Figura 2 - Fotografia de um indivíduo de onça-pintada em Rio Negro/MS.



Foto tirada por Lucas Leuzinger.

Inicialmente, a onça-pintada foi dividida em oito subespécies de acordo com as análises morfológicas (SEYMOUR, 1989). No entanto, uma revisão posterior não encontrou evidências para tal diferenciação (LARSON, 1997). A filogenia deste felino demonstra que a linhagem se iniciou na América do Norte e só depois se deslocou para a América do Sul e Central. Indícios sugerem que as onças-pintadas da América do Norte foram extintas no final do Pleistoceno e depois houve uma re-colonização por migrantes da América do Sul (NOWELL; JACKSON, 1996), assim como ocorreu com as onças-pardas.

A distribuição e persistência desse predador é estritamente relacionado a ambientes saudáveis e com abundância de presas (SILVEIRA, 2004). Possui uma distribuição histórica que se estendia do sudoeste dos Estados Unidos até o sul da Argentina (EIZIRIK et al., 2001), entretanto, nos últimos 50 anos, sua distribuição diminuiu em aproximadamente 50% (SANDERSON; REDFORD; CHETKIEWICZ, 2002; ZELLER, 2007). Atualmente, a espécie ocorre desde o norte do México até o norte da Argentina (GALETTI; DIRZO, 2013;

SANDERSON; REDFORD; CHETKIEWICZ, 2002), com a área de distribuição estando principalmente no território brasileiro (Figura 3), em uma variedade de biomas.

Figura 3- Mapa de distribuição da onça-pintada, mostrando em cinza-claro a distribuição histórica e em cinza-escuro a distribuição atual.



Fonte: Haag et al., 2010

Embora a distribuição original deste felino incluía toda a Mata Atlântica, atualmente está presente em apenas 7% dos remanescentes (TÔRRES et al., 2008), sendo esse o bioma no qual a espécie se encontra mais ameaçada (BEISIEGEL; SANA; MORAES, 2012; FERRAZ et al., 2012; SANDERSON; REDFORD; CHETKIEWICZ, 2002). As estimativas indicam que hoje permanecem de 156 a 180 indivíduos nos remanescentes, distribuídos em oito populações isoladas (Parque Nacional do Iguaçu ao Parque Estadual do Turvo, Pontal do Paranapanema ao Parque Nacional de Ilha Grande, contínuo da Serra do Mar, Sooretama Reserva/Vale, Serra da Mantiqueira/RioDoce/Espinhaço e Monte Pascoal/Pau Brasil), em declínio (BEISIEGEL; SANA; MORAES, 2012; CULLEN et al., 2005; LEITE et al., 2002) e com menos de 50 indivíduos na maioria das localidades (BEISIEGEL; SANA; MORAES, 2012). Adicionado a isso, sugere-se que um pouco mais de 10% dos remanescentes são adequados à ocorrência dessa espécie (FERRAZ et al., 2012).

Estudos iniciais tiveram o objetivo de avaliar aspectos da ecologia, distribuição e conservação em uma escala regional (HAAG et al., 2010). Apesar de inúmeros estudos ecológicos, os trabalhos publicados no Brasil com enfoque genético ainda são escassos (EIZIRIK et al., 2001; HAAG et al., 2010; ROQUES et al., 2014; SRBEK-ARAUJO, 2013;

VALDEZ et al., 2015). Estudos de diversidade genética entre onças-pintadas utilizando DNAmít não apontaram evidências para partições geográficas significativas ou barreiras ao fluxo gênico (EIZIRIK et al., 2001; RUIZ-GARCIA et al., 2006). Contudo, análises recentes com marcadores moleculares mitocondriais e de microssatélites têm encontrado uma diminuição no tamanho efetivo populacional, na diversidade genética e prováveis impedimentos ao fluxo gênico (HAAG et al., 2010; ROQUES et al., 2014).

1.5 A Onça-parda

A espécie *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) (Figura 4) inclui seis subespécies: *Puma concolor cougar*, *P. concolor costaricensis*, *P. concolor concolor*, *P. concolor capricornensis*, *P. concolor puma* e *P. concolor cabreræ* (CULVER et al., 2000). A onça-parda se distribui por todas as Américas, do sudoeste do Canadá até o extremo sul do continente sul-americano (MIRANDA, 2003) (Figura 5). No entanto, apesar de sua ampla distribuição, seu território ocupado vem sendo reduzido, principalmente na América do Norte. A subespécie *P. c. capricornensis* está presente em quase todo o Brasil, com exceção do norte do país, onde se encontra a subespécie *P. c. concolor* (CULVER et al., 2000).

Figura 4- Fotografia de um indivíduo em cativeiro de onça-parda em São Carlos/SP.



Foto tirada por Savana Diegues.

Estudos com enfoque ecológico têm sido frequentes nas onças-pardas brasileiras, entretanto, estudos genéticos publicados na espécie apenas têm aumentado nos últimos anos (CASTILHO et al., 2012, 2012; MARTINS, 2011, MIOTTO et al., 2007, 2011, 2012, 2014; SARANHOLI, 2013). Os trabalhos realizados se concentraram em áreas protegidas de remanescentes de Mata Atlântica ou do Cerrado. Os resultados, em geral, apontam comumente para a incidência de uma alta diversidade genética e ausências de restrições ao fluxo gênico e

de relacionamento entre os indivíduos. No entanto, estruturação genética populacional entre populações da espécie já foram documentadas (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; ERNEST 2010, 2014).

Figura 5- Área de distribuição atual da onça-parda nas Américas em vermelho.



Fonte: IUCN, 2013.

1.6 A genética não invasiva e os marcadores moleculares

A metodologia com a utilização de amostragem não invasiva (fezes, penas, pelos, ossos, regurgito e etc.) é relativamente recente e têm sido cada vez mais utilizada e aperfeiçoada (BEJA-PEREIRA et al., 2009; TABERLET; LUIKART, 1999). Tal metodologia é empregada sobretudo em animais de difícil acesso, assim como os grandes felinos, já que apresentam grande área de vida, baixa densidade, atividade noturna, além de hábitos elusivos (KOHN; WAYNE, 1997; JOHNSON et al., 2001).

As fezes são as amostras mais amplamente empregadas neste tipo de estudo, especialmente em animais territorialistas, que depositam pequenas quantidades de fezes em locais ressaltantes como trilhas e rochas (CHAME, 2003; DAVISON et al., 2002), facilitando a coleta. Nas amostras também existem milhares de moléculas de DNA das células intestinais do indivíduo que as depositaram (ALBAUGH; IYENGAR; LOHANI, 1992). Desta maneira, análises genéticas populacionais, de parasitismo, nível hormonal e dieta (GITTLEMAN et al., 2001; MOREIRA et al., 2001) podem ser realizadas sem a necessidade de contato com os animais. Esse procedimento é ainda mais importante quando se trata de espécies sob ameaça

ou em animais que não possuem características de pelagem que podem diferenciar indivíduos através das câmeras.

Em um nível populacional, o método genético não invasivo oferece uma forma eficaz para identificar e individualizar amostras, além de possibilitar a determinação do sexo dos indivíduos, a distribuição, área de vida, densidade, diversidade genética, estruturação, fluxo gênico e parentesco (DEAGLE; TOLLIT, 2007; FARREL; ROMAN; SUNQUIST, 2000; HEDMARK et al., 2004; KOHN; WAYNE, 1997; KUROSA; MASUDA; TATARA, 2005; LIVIA et al., 2007; MIOTTO et al., 2011, 2014, SARANHOLI, 2013). Estudos prévios já verificaram a similaridade entre os resultados utilizando dados baseados em amostras não invasivas aos encontrados com câmeras fotográficas e radio-telemetria (BELLEMAIN et al., 2005; ROQUES et al., 2014), ferramentas tradicionalmente empregadas para estimar densidade e padrões de movimentação.

Apesar desses atributos, amostras não invasivas apresentam baixa qualidade e quantidade de DNA (TABERLET; LUIKART, 1999) devido à alta degradação sofrida pelo material em virtude da exposição ambiental, das altas temperaturas e umidade (FARREL; ROMAN; SUNQUIST, 2000). Esses problemas são ampliados quando se trabalha em ambientes tropicais, onde as amostras fecais são decompostas muito mais rapidamente e o DNA degrada mais facilmente devido à umidade (MICHALSKI et al., 2011; ROQUES et al., 2014). Além disso, este tipo de amostra apresenta inibidores de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), que dificulta as amplificações das sequências específicas e aumenta a propensão a erros de genotipagem. Por isso, apesar do método ter facilitado o estudo de muitos animais, exige que sejam incluídos inúmeros procedimentos e cuidados com o intuito de minimizar os erros e aumentar a chance de amplificação (BUCHAN et al., 2005; HOFFMAN; AMOS, 2005; PIGGOTT, 2004). Todos esses procedimentos e cuidados acabam tornando o estudo mais custoso e demorado.

O método não invasivo inclui o uso de marcadores moleculares quando se objetiva investigar aspectos genéticos, ecológicos e comportamentais dos animais (EIZIRIK et al., 2008; KASHI; KING; SOLLER, 1997). Entre os marcadores mais comumente utilizados estão o DNA mitocondrial e os microssatélites (EIZIRIK, 1996). O primeiro consiste em uma molécula haplóide circular (15-17kb), presente nas mitocôndrias e que geralmente possui herança materna (PALMER, 1987). Devido à sua alta taxa de evolução, provável ausência de recombinação e alto polimorfismo, esse marcador é mais empregado em indivíduos ou espécies intimamente relacionadas (AVISE, 2004). Já os microssatélites são geralmente usados em

estudos de fina escala (MANEL et al., 2003), pois permitem estimar parâmetros demográficos, de deslocamento, fluxo gênico, estruturação e parentesco (GOTTELLI et al., 2007; NESJE et al., 2000), além de permitir a individualização de amostras não invasivas (GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997). Consistem em pequenas unidades de DNA (de um a seis pares de bases) repetidas e justapostas, com distribuição uniforme por todo o genoma (TAUTZ, 1989), preferencialmente em regiões não codificantes (GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 1999). As principais características dos microssatélites são a alta taxa de polimorfismo, o padrão de herança do tipo co-dominante e o fato de que podem ser considerados seletivamente neutros (SELKOE; TOONEM, 2006).

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

Considerando todo o exposto acima, é de fundamental importância avaliar como as populações de onças-pardas e de onças-pintadas estão se distribuindo geneticamente no ambiente fragmentado, mais especificamente, se as populações estão apresentando alta diversidade genética e se está ocorrendo restrições ao fluxo gênico. Com isso, foram sugeridas as seguintes hipóteses: (1) As populações de onças-pardas exibirão alta diversidade genética, baixo grau de relacionamento entre indivíduos de uma mesma população e provavelmente pouca restrição ao fluxo gênico; (2) Enquanto que as populações de onças-pintadas apresentarão diversidade genética reduzida, alto grau de relacionamento entre os indivíduos de uma mesma população e subdivisões populacionais. Tal proposição tem como premissa a enorme capacidade de deslocamento das espécies, contudo, ressaltando que a onça-parda é capaz de atravessar ambientes antropizados (espécie generalista) (RUTH et al., 1998; PALMEIRA et al., 2008), enquanto que as onças-pintadas se restringem a ambientes menos antropizados (espécie especialista). Além disso, estudos anteriores evidenciaram uma maior estruturação entre as populações de onças-pintadas em comparação aos trabalhos realizados nas onças-pardas, que geralmente exibem ausência de estruturação.

2.2 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo principal investigar parâmetros demográficos populacionais (tamanho mínimo de indivíduos e razão sexual) e a distribuição da diversidade genética (diversidade genética, parentesco, estruturação e estimativas do fluxo gênico) de populações de onça-parda e de onça-pintada presentes em remanescentes de Mata Atlântica.

2.3 Objetivos Específicos

- a) Identificar indivíduos de onças-pardas e de onças-pintadas dentre as amostras de fezes de felinos coletadas nas seguintes Unidades de Conservação: Parque Nacional do Caparaó, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Parque Estadual da Serra do Mar, Estação Ecológica Juréia-Itatins, Parque Estadual de Intervalos, Parque Estadual Carlos Botelho e Parque Nacional do Iguaçu;
- b) Individualizar as amostras de onça-parda e de onça-pintada para a obtenção do tamanho mínimo de indivíduos em cada Unidade de Conservação;
- c) Estabelecer a proporção sexual dos indivíduos de ambas as espécies;
- d) Estimar o grau de parentesco entre os indivíduos de uma mesma população das espécies;

- e) Avaliar se há estruturação genética e indícios de fluxo gênico entre as populações das espécies;
- f) Aferir a diversidade genética das populações de onças presentes nas áreas de estudo.

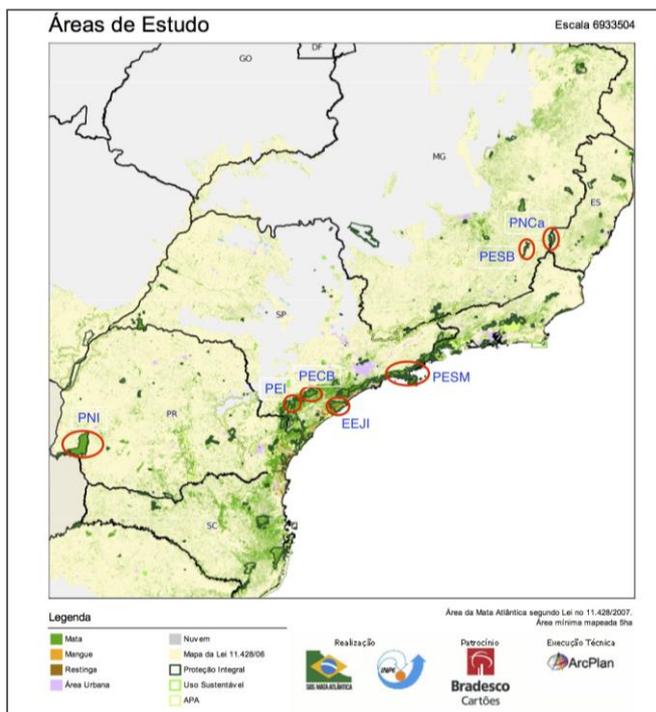
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de Estudo

As áreas foco deste estudo foram Unidades de Conservação (UC) presentes nos maiores remanescentes de Mata Atlântica, o qual incluem o contínuo da Serra do Mar, a Serra da Mantiqueira e o Parque Nacional do Iguaçu. A primeira consiste no maior remanescente de Mata Atlântica do país e abrange os estados de São Paulo e do Paraná. Dentre as Unidades de Conservação presentes no contínuo foram amostrados o Parque Estadual da Serra do Mar (PESM, 315.000ha), a Estação Ecológica Juréia-Itatins (EEJI, 79.240ha), o Parque Estadual de Carlos Botelho (PECB, 37.644ha) e o Parque Estadual Intervales (PEI, 48.000ha) (Figura 6). A Serra da Mantiqueira está situada no estado de Minas Gerais e seus picos e montanhas abrigam um dos maiores remanescentes do bioma, apesar da intensa devastação. Dentre as Unidades de Conservação estudadas na Serra estão o Parque Nacional do Caparaó (PNCa, 31.762ha) e o Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB, 15.000ha). O Parque Nacional do Iguaçu (PNI, 185.262ha) está presente na porção sudoeste do estado do Paraná e consiste em um dos maiores fragmentos na região. Tanto o PNI quanto as Unidades de Conservação presentes na Serra da Mantiqueira compreendem a Mata Atlântica de interior, diferentemente do contínuo da Serra do Mar que faz parte da Mata Atlântica costeira.

Todas estas áreas amostradas são consideradas prioritárias para a conservação de grandes carnívoros (RABINOWITZ; ZELLER, 2010; BEISIEGEL; SANA; MORAES, 2012), especialmente a onça-pintada, já que alguns desses parques abrigam às últimas populações da espécie no bioma (BEISIEGEL; SANA; MORAES, 2012; GALETTI et al., 2013; ZELLER, 2007).

Figura 6- Mapa exibindo os remanescentes de Mata Atlântica no Brasil com destaque para as Unidades de Conservação amostradas.



Em verde estão representados os remanescentes de Mata Atlântica, enquanto que as regiões amarelas apresentam as áreas previamente cobertas pelo bioma. As áreas de estudo desse trabalho estão contornadas em vermelho, sendo que PNCA consiste no Parque Nacional do Caparaó, PESB no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, PESH no Parque Estadual da Serra do Mar (Núcleo Santa Virgínia), EEJI na Estação Ecológica Juréia-Itatins, PECB no Parque Estadual de Carlos Botelho, PEI no Parque Estadual Intervales e PNI no Parque Nacional do Iguaçu. Fonte: SOS Mata Atlântica, 2015.

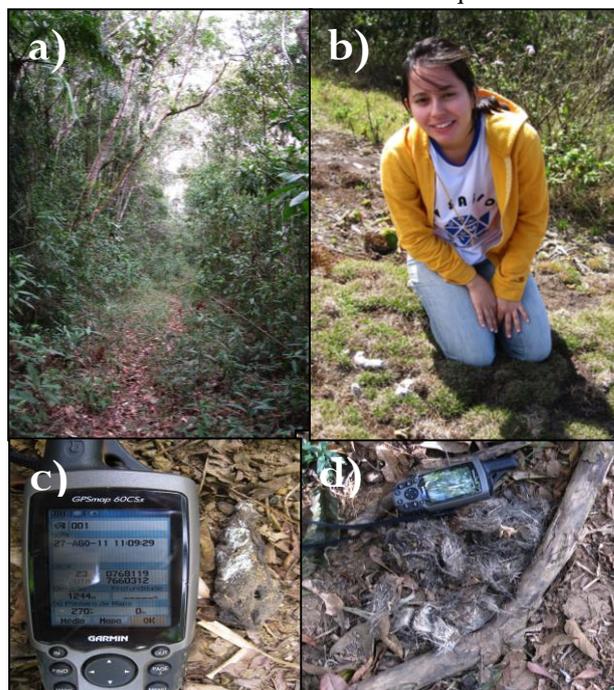
3.2 Coleta de amostras

Todas as amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas nas Unidades de Conservação citadas por colaboradores do projeto: o Projeto Sussuarana na Serra do Brigadeiro forneceu amostras do PESB, Juliano Peixoto do PNCA, Lilian Rampim do PESH, Rogério Martins da EEJI, Beatriz Beisiegel do PECB e PEI, e Marina Xavier da Silva do PNI. As amostras fornecidas foram principalmente de fezes supostamente depositadas por onças-pardas ou onças-pintadas. Essas coletas foram realizadas caminhando oportunisticamente nas trilhas das UCs, seguindo pegadas no chão ou outras marcas de passagem do animal; e determinadas pelo padrão de morfologia característico das fezes de onças. Além disso, amostras de sangue e de pelos também foram obtidas de onças capturadas. O sistema de posicionamento global (GPS) foi registrado na coleta de todas as amostras (Figura 7).

Porções de amostras fecais foram retiradas das extremidades e inseridas em tubos falcon estéreis com etanol em uma concentração de 96%. Os pelos foram armazenados em tubos estéreis sem qualquer condicionante, enquanto o sangue foi embebido em solução com EDTA

(ácido tetra-acético de etileno diamina). No laboratório, as amostras foram mantidas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 7- Fotos mostrando a coleta de amostras não invasivas no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro.



Na figura: a) foto mostrando uma típica trilha em florestas de Mata Atlântica, nesse caso, no PESB; b) a autora em coleta; c) foto de uma amostra de fezes encontrada, juntamente com o GPS que indica sua localização; d) outra amostra de felino aparentemente procedente de regurgito. Fonte: álbum pessoal da autora.

3.3 Extração de DNA e identificação das espécies de onças

A extração de DNA fecal foi realizada utilizando o *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante, o qual é próprio para amostras com elevada concentração de inibidores. Este *Kit* é o mais amplamente utilizado na literatura (BEJA-PEREIRA et al., 2009) e foi o método de extração que apresentou o maior sucesso em testes laboratoriais. O DNA do restante das amostras (sangue e pelos) foram extraídos a partir do protocolo convencional de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Como as fezes de felinos, em geral, são semelhantes em tamanho e morfologia (CHAME, 2003), unicamente nas amostras não invasivas, as espécies depositantes foram confirmadas através da amplificação de um pequeno fragmento do gene ATP6 (ATP6-DF3 e ATP6-DR2, CHAVES et al., 2012), do DNA mitocondrial. Este par de oligonucleotídeos apresentou sucesso na identificação de carnívoros em prévios estudos (CHAVES et al., 2012; WULTSCH; WAITS; KELLY, 2014; HAAG et al., 2010). Para a realização das ampliações das sequências por PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizado um volume total $15\mu\text{L}$

de reagentes, contendo 5 µL de DNA, 0,13 mM de cada dNTP, 1 x de tampão, 2 mM de MgCl₂ (Fermentas), 150 µg/ml de BSA (do inglês, *bovine serum albumin*), 0,66 µM de cada um dos oligonucleotídeos e 1 U (unidade) de *Taq DNA polimerase* Platinum (Invitrogen). O programa no termociclador seguiu ao descrito por Chaves et al. (2012). Um controle negativo (apenas reagentes) foi adicionado em todas as PCRs com o intuito de monitorar possíveis contaminações externas. Controle positivo (amostra de sangue ou tecido) foi usado em testes iniciais de padronização, para confirmar o tamanho da sequência amplificada.

Os produtos das PCRs foram avaliados em eletroforese com gel de agarose a 2%. As amostras que apresentaram sucesso na amplificação foram purificadas com as enzimas ExoSap-IT (GE Healthcare) e as sequências *forward* foram sequenciadas no sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas e alinhadas a sequências controle (sangue ou tecido) e de referência de felinos (disponíveis no Bold Systems e no GenBank), com o intuito de confirmar as espécies que depositaram as amostras. Uma árvore de distância Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) foi construída de acordo com o modelo de Kimura dois parâmetros (KIMURA, 1980), com o único objetivo de detectar as espécies amostradas pelo agrupamento de indivíduos. Esse método foi realizado utilizando 1.000 repetições do *bootstrap*. Todas as análises de sequência foram realizadas no programa Geneious (KEARSE et al., 2012).

3.4 Número mínimo de indivíduos em cada Unidade de Conservação

Após a confirmação das espécies que depositaram as amostras de fezes, os marcadores moleculares de microssatélites foram amplificados em todas as amostras (de sangue, pelos e fezes) de onças-pardas e de onças-pintadas para a realização das análises genéticas populacionais. Inicialmente, foi realizada uma individualização das amostras para a identificação do número mínimo de indivíduos em cada uma das UCs. Isso porque, mais de uma amostra pode ter sido deixada pelo mesmo indivíduo.

Na onça-pintada foram empregados 13 locos de microssatélites (FCA742 – dinucleotídeo, F146 e F98 – trinucleotídeo, FCA741, FCA740, FCA723, FCA453, FCA441, FCA391, F124, F85, F53 e F42 - tetranucleotídeos) desenvolvidos para o gato doméstico, *Felis catus* (MENOTTI-RAYMOND et al., 1999, 2005). No entanto, esses pares de *primers* já foram anteriormente padronizados na espécie (EIZIRIK et al. 2001, 2008; HAAG et al., 2010). Em todos os locos foram utilizados o método da cauda M13 (SCHUELKE et al., 2000), o qual

permite que a mesma fluorescência (cauda M13) seja utilizada em vários oligonucleotídeos. Os protocolos para as ampliações via PCR foram executados de acordo com Haag et al. (2010).

Nas amostras de onças-pardas também foram utilizados 13 locos de microssatélites (PcoA106, PcoA208, PcoA216, PcoA339, PcoB003, PcoB010, PcoB203, PcoB207, PcoB210, PcoB303, PcoB316 – dinucleotídeos, PcoC108 e PcoC112 - tetranucleotídeos), entretanto, foram desenvolvidos especificamente para a espécie (KURUSHIMA et al., 2006). Estes pares de *primers* têm sido os mais comumente empregados de acordo com a literatura (CASTILHO et al., 2012; MIOTTO et al., 2011, 2012; NAIDU et al., 2011). Em sete oligonucleotídeos foram utilizados o método da cauda M13 (SCHUELKE et al., 2000) e nos restantes, as fluorescências foram embutidas na síntese dos *primers forward*. As PCRs foram realizadas com um volume total de 15 µL, sendo 4,8 µL de DNA, 7,5 µL de GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega), 1,3 mM de MgCl₂ (Fermentas), 0,66 µM de cada oligonucleotídeo e 150 mg/ml de BSA. O programa no termociclador iniciou com uma temperatura de 95°C por 5 min, posteriormente, foi realizado 40 ciclos de 94°C por 30 s, 46-50°C (dependendo do *primer*) durante 45 s, e 72°C por 45 s. Para finalizar foi incluída uma extensão de 72°C por 10 min.

Os produtos amplificados foram avaliados em eletroforese com gel de agarose a 2% e as amostras que apresentaram sucesso foram genotipadas no sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Controles negativos foram inclusos em todas as PCRs e os controles positivos, nos testes iniciais de padronização em todos os locos. O tamanho dos alelos das onças-pintadas foram definidos no programa Geneious (KEARSE et al., 2012), enquanto que os alelos das onças-pardas foram conferidos no MegaBace Fragment Profiler (Amersham Biosciences).

Foram realizadas inúmeras PCRs independentes até se obter, pelo menos, três genótipos idênticos para a definição dos alelos. Isto porque, as amostras não invasivas apresentam elevada ocorrência de erros na leitura dos alelos (TABERLET et al., 1996), os quais podem gerar uma determinação errônea do genótipo. Os erros mais comuns nestes casos são o alelo *dropout* (amostragem aleatória de apenas um dos alelos em um indivíduo heterozigoto), alelos nulos (mutações que ocorrerem no momento do anelamento dos oligonucleotídeos e que não permitem a amplificação de um dos alelos, resultando em falsos homozigotos) e falsos alelos (artefatos na amplificação, eventualmente devido a um erro da *Taq polimerase*, que podem ser mal interpretados como um alelo verdadeiro). Após a identificação de todos os genótipos, as amostras e os locos que apresentaram menos de 70% de sucesso foram eliminados (BEJA-PEREIRA et al., 2009, MIOTTO et al., 2011).

Por fim, a individualização foi realizada com ajuda do programa Gimlet (VALIERE, 2002), onde o agrupamento é conduzido considerando inicialmente todos os genótipos como potenciais genótipos de referência. O programa indica os grupos com base apenas em um ou dois diferentes alelos dentre os genótipos (VALIERE, 2002). Com o agrupamento das amostras dentro dos indivíduos, apenas um único genótipo de cada indivíduo foi selecionado para as análises posteriores.

Posteriormente, a probabilidade de identidade (P_{ID}) foi calculada com o intuito de averiguar se a individualização foi realizada com confiança, isso porque, esta estimativa consiste em aferir a probabilidade de que dois indivíduos aleatórios em uma população tenham o mesmo genótipo em todos os locos (WAITS et al., 2001). Este cálculo foi realizado nos programas Gimlet (VALIERE, 2002) e Genalex (PEAKALL; SMOUSE, 2006), de acordo com as probabilidades de identidade específica para a presença de indivíduos aparentados ($P_{ID\text{sibs}}$) e não enviesada ($P_{ID\text{unbias}}$), que é uma equação menos tendenciosa que corrige para pequenas amostras de indivíduos (KENDALL; STEWART, 1977). As taxas de erro de genotipagem (alelos nulos, alelos *dropout* e falsos alelos) foram estimadas no programa Gimlet (VALIERE, 2002) e no MicroChecker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004).

3.5 Razão sexual

O sexo dos indivíduos foi determinado a partir de amplificação de um pequeno fragmento do gene amelogenina (PILGRIM et al., 2005), que tem apresentado sucesso em prévios estudos com felinos (MIOTTO et al., 2011; NAIDU et al., 2011; SARANHOLI, 2013). O protocolo das reações de PCR e do programa no termociclador foram realizados de acordo com Pilgrim et al. (2005). Após a PCR, o sexo dos indivíduos foi determinado pela visualização dos fragmentos amplificados em eletroforese com gel de agarose a 3%, após 2h. Através deste protocolo, as fêmeas amplificam dois fragmentos de um mesmo tamanho (uma banda no gel), referente ao determinante XX, enquanto os machos amplificam dois fragmentos de tamanhos diferentes (duas bandas no gel), referentes ao XY. Foram realizadas inúmeras PCRs independentes em cada indivíduo, até que o sexo tenha sido confirmado em três resultados idênticos. Isso porque, pode ocorrer a amplificação de falsas fêmeas (PILGRIM et al., 2005).

3.6 Melanismo em onças-pintadas

Especificamente nas onças-pintadas foi verificado se todos os indivíduos possuíam a coloração do tipo selvagem (amarelo e preto), ou se havia algum indivíduo melânico (coloração com fundo escuro) dentre os identificados. Para isso, foi utilizado oligonucleotídeos específicos

para o gene receptor de melanocortina (MC1R), já previamente padronizados por Eizirik et al. (2003) e Haag et al. (2010). O método da cauda M13 foi utilizado em todos os *primers reverse* (SCHUELKE et al., 2000) para a identificação dos alelos após a genotipagem, realizada no sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Os alelos foram definidos no programa Geneious (KEARSE et al., 2012). Por meio deste protocolo, as onças-pintadas melânicas amplificam um alelo com 15pb de deleção em relação às onças-pintadas selvagens, que podem ser homozigotas ou heterozigotas para o alelo selvagem (EIZIRIK et al., 2003).

3.7 Análises populacionais de estruturação genética

Como não há informação sobre o número de populações que estão sendo representadas por estes animais detectados, foi realizada inicialmente uma análise de atribuição de indivíduos a prováveis populações, por meio de inferência Bayesiana. Essa análise foi realizada no programa Structure (PRITCHARD et al., 2000), que faz o agrupamento dos indivíduos de forma a maximizar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e minimizar o desequilíbrio de ligação dentro de cada grupo. O programa usa as interações entre as cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC) para estimar a probabilidade posterior de que os dados se ajustem à hipótese de k agrupamentos (PRITCHARD et al., 2000). Inicialmente os dados foram analisados sem a informação prévia de grupos populacionais, utilizando uma frequência de alelos correlacionados (pressupõe que as populações divergiram de um ancestral comum e que as diferenças em suas frequências alélicas são o resultado de deriva genética que ocorreu desde sua divergência), assumindo o modelo *admixture* (apropriado para populações que apresentaram ou ainda apresentam fluxo gênico em taxas suficientes para que os indivíduos possam ter ancestrais em mais de uma população) e com um número de agrupamentos (k) variando de um a seis (número de Unidades de Conservação amostradas). Posteriormente, a distribuição dos indivíduos foi avaliada com a informação prévia do número de populações amostradas, ou seja, de UCs amostradas (6). Por último, o número sugerido de “ k ” a partir dos resultados anteriores foi implantado no programa para se visualizar a distribuição dos indivíduos em grupos populacionais. Em todas as análises foram utilizadas um comprimento de 500.000 de *burnin* e 1.000.000 interações de MCMC.

O número de populações (K) detectado no programa Structure foi estabelecido de acordo com o método de Pritchard et al. (2000) no programa Structure Harvester (EARL et al., 2012), segundo o qual o valor de K escolhido é aquele que maximiza a probabilidade dos dados pertencerem ao número estimado de populações. A correção de Evanno et al. (2005) também foi avaliada para a detecção do número real de populações. Esse método se baseia na taxa de mudança da probabilidade posterior dos dados entre sucessivos valores de K .

O número de populações também foi detectado no programa BAPS (CORANDER et al., 2003, 2004), que utiliza uma otimização estocástica para inferir a probabilidade posterior do número de populações (k). Inicialmente, o número de populações foi avaliado sem informação sobre o número de agrupamentos, em uma análise de *genetic mixture* a um nível individual (*clustering of individuals*). Foram testados vários números de agrupamentos divergentes, com um K máximo de 6 (número de UCs amostradas). Cada suposto número de agrupamentos (K) gerou um valor de \log_{ml} (logaritmo do fator de Bayes, KASS; RAFTERY, 1995), que é explicado por um valor absoluto em que quanto melhor for a transferência de um determinado indivíduo para outro *cluster*, menor é o logaritmo. O valor de \log_{ml} é zero para o agrupamento em que o indivíduo está em excelente disposição, enquanto que pequenos valores ($< 2,3$) indicam que o indivíduo provavelmente deva ser atribuído a outro agrupamento (CORANDER et al., 2008). Um gráfico similar ao obtido no Structure é gerado após análise, onde cada indivíduo é representado por uma barra vertical com a cor correspondente à população ao qual foi inserido. Posteriormente, os valores de coordenadas das amostras (*spacial clustering of individuals*) foram embutidos no programa, produzindo além do gráfico linear, outro em 3D. Esta análise aumenta o poder em se detectar corretamente a estrutura das populações e o gráfico gerado facilita a visualização da distribuição dos indivíduos (CORANDER et al., 2008).

Paralelamente foi realizada uma Análise de Correspondência Fatorial (ACF) no programa Genetix (BELKHIR et al., 2004), que utiliza um derivado das Análises de Correspondência Múltipla para analisar os perfis de distribuição de um número de variáveis discretas (locos), os quais podem ter diferentes estados ou modalidades (alelos). A ACF nos permite visualizar a distribuição dos indivíduos em um gráfico determinado pela similaridade de seus estados alélicos. Para isso, o programa exige que seja fornecido o número prévio de agrupamentos (populações), o qual foi definido de acordo com os resultados obtidos nos programas Structure e BAPS.

Análises de diferenciação também foram realizadas para se verificar o nível de distinção entre as populações definidas, já que tais índices também necessitam de informação prévia sobre o número de agrupamentos. Assim, o grau de diferenciação populacional (F_{ST}) foi estimado no programa FSTAT (GOUDET, 1995), juntamente com os valores de significância (P), que já incluem a correção de Bonferroni (RICE, 1989). Este estimador é definido pela correlação entre gametas tirados ao acaso da mesma subpopulação em relação ao total (WRIGHT, 1978). No entanto, quando se utiliza locos muito polimórficos pode haver uma

saturação no índice F_{ST} , impedindo que ele represente a real diferenciação (JOST, 2008; HELLER; SIEGISMUND, 2009). Por isso, também foi calculado o D_{est} no programa SMOGD (Crawford, 2010).

A distribuição da variação genética dentro e entre as populações foi avaliada pela Análise da Variância Molecular (AMOVA) no programa Arlequin (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A atribuição dos indivíduos a uma das populações foi realizada no programa GeneClass (PIRY et al., 2004), com base nas populações previamente estabelecidas. Nesta análise, o programa assume que nem todas as populações potenciais foram amostradas. No GeneClass (PIRY et al., 2004) também foi avaliada a ocorrência de indivíduos migrantes de primeira geração entre as populações (PAETKAU et al., 2004), usando o método Bayesiano *default* de Rannala e Mountair (1997). No programa Structure (PRITCHARD et al., 2000) foi avaliada a existência de migrantes entre as populações, de acordo com inferências da ancestralidade dos indivíduos.

3.8 Análises populacionais de diversidade genética

Em cada uma das populações definidas de ambas as espécies foram realizadas estimativas de diversidade genética. Inicialmente, no programa Genalex (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi avaliado a frequência e o número de alelos em cada um dos locos, além de estimar o número de alelos privados e níveis de heterozigosidade esperada e observada. No FSTAT (GOUDET, 1995) foram estimados outros níveis de diversidade, como a riqueza alélica e a diversidade gênica, parâmetros independentes do tamanho amostral (PETIT et al., 1998). No mesmo programa foram também obtidas estimativas de F_{IS} como uma medida de avaliar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada um dos locos foi avaliado no programa Cervus (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

O número efetivo de indivíduos (N_e) foi estimado no NeEstimator (PEEL et al., 2000), a partir da geração zero e segundo o método de desequilíbrio de ligação, por ser o mais comumente utilizado e o melhor avaliador de amostra única (HILL, 1981). A ocorrência de gargalo genético populacional recente foi investigada pelo programa Bottleneck (CORNUET; LUIKART, 1996) através do teste de Wilcoxon (LUIKART et al., 1998), que é relativamente robusto e apropriado para pequenas amostras populacionais e poucos locos de microssatélites (ANMARKRUD et al., 2008). Esta análise assume três modelos mutacionais: IAM (modelo de alelos infinitos) que assume que as mutações nos microssatélites podem criar um número

infinito de alelos; SMM (modelo de mutação “stepwise”) que admite a mesma probabilidade das mutações causarem ganho ou perda de uma unidade repetitiva; e TPM (modelo “two phase”) que é um modelo misto que considera a probabilidade da mutação envolver os dois modelos mutacionais anteriores (ANMARKRUD et al., 2008). Populações que passaram por um gargalo genético recente tendem a perder alelos raros e aumentando conseqüentemente a frequência dos alelos comuns (resultando em um excesso de heterozigotos). Deste modo, foi selecionado o modelo TPM (70% de mutações de passo simples e 30% de mutações de múltiplos passos), que parece ser o mais conservativo (LUIKART; CORNUET, 1998).

3.9 Estimativas de parentesco entre os indivíduos

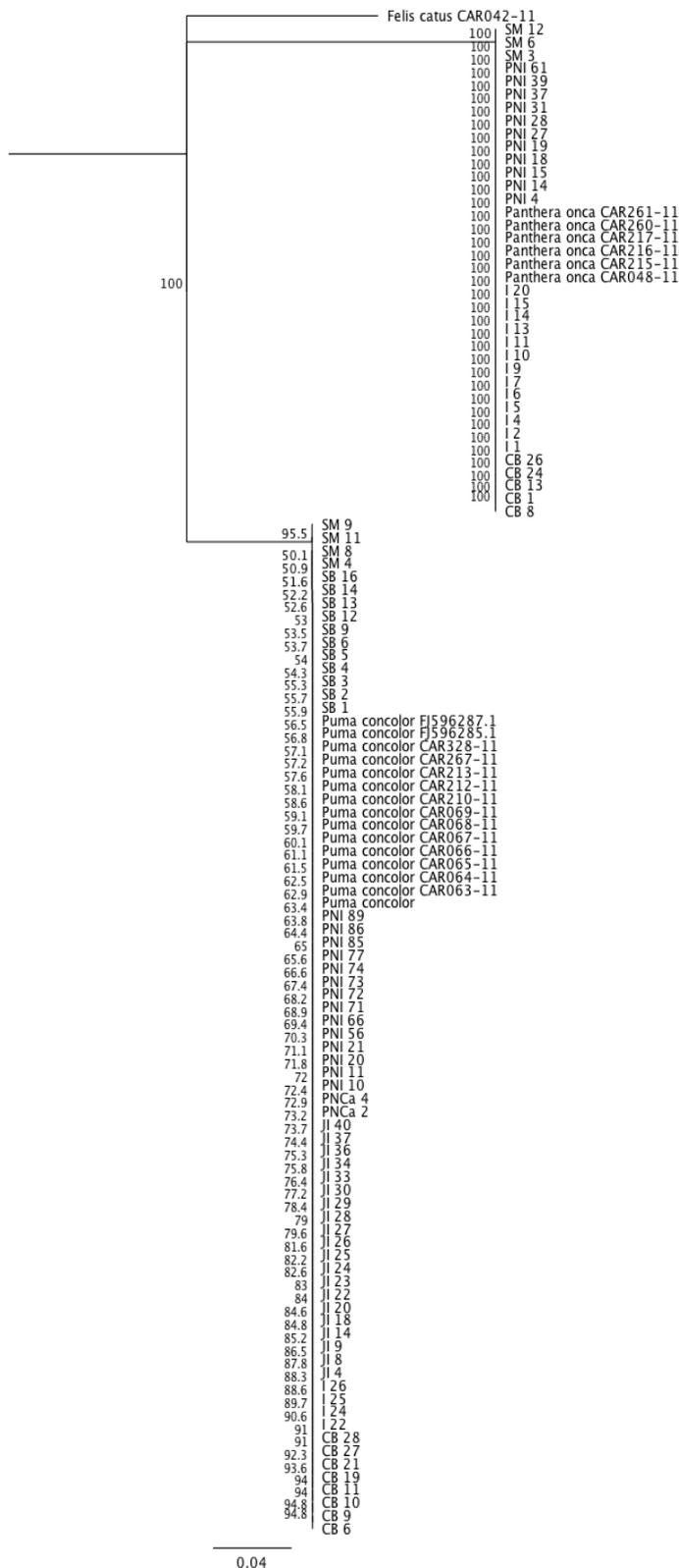
O valor de parentesco entre pares de indivíduos dentro de uma mesma população e as prováveis categorias de relacionamentos (pai e filho, meio-irmão, irmão completo e não relacionado) foram sugeridas pelo programa ML-Relate (KALINOWSKI et al., 2006), que previamente detecta a presença de alelos nulos. Quanto mais negativo for o valor de r , menor o relacionamento entre os indivíduos, já que esses indivíduos apresentam um menor número de alelos idênticos-por-descendência do que o esperado (KONOVALOV; HEG, 2008).

4. RESULTADOS

4.1 Identificação das espécies de onças

No total, foram coletadas 209 amostras de fezes: 18 no PESB, 4 no PNCa, 13 no PESM, 38 na EEJI, 30 no PECB, 29 no PNI e 77 no PNI. Adicionado a isso, uma amostra de sangue foi obtida no PESB e sete de pelos no PNI. A extração de DNA foi realizada em todas as amostras. 160 (74%) amostras não invasivas tiveram sucesso na amplificação do gene mitocondrial ATP6. Destas, 32 amostras foram detectadas como pertencentes a onças-pintadas (20%) e 63 a onças-pardas (38%) (Figura 8). Cada amostra foi amplificada e sequenciada, pelo menos, três vezes até se obter uma sequência íntegra e de qualidade para a correta identificação da espécie. A sequência analisada apresenta 83pb (pares de bases), com 10 sítios de diferenciação entre as espécies de onças.

Figura 8- Árvore de Neighbor Joining construída no programa Geneious com 95 sequências do gene ATP6 originárias deste trabalho, bem como, uma amostra de sangue de onça-parda utilizada como controle positivo e 21 sequências de referência obtidas no Bold Systems (CAR) e Genbank (FJ). Origem das amostras: PNCA - Parque Nacional do Caparaó, SB - Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, SM - Parque Estadual da Serra do Mar, JI - Estação Ecológica Juréia-Itatins, CB - Parque Estadual de Carlos Botelho, I - Parque Estadual Intervales e PNI - Parque Nacional do Iguaçu.



4.2 Onças-pintadas

4.2.1 Demografia

Além das amostras não invasivas confirmadas da espécie, três amostras de pelo também foram incluídas nas análises. Assim, 35 amostras de onças-pintadas foram amplificadas em 13 locos de microssatélites para a detecção dos alelos. Após as ampliações, 27 amostras (73%) e 10 locos polimórficos (77%) foram selecionados por apresentarem boa qualidade e pelo menos 70% de sucesso nas ampliações. Com isso, puderam ser identificados 19 diferentes indivíduos de onças-pintadas, 10 machos e 9 fêmeas (Tabela 1).

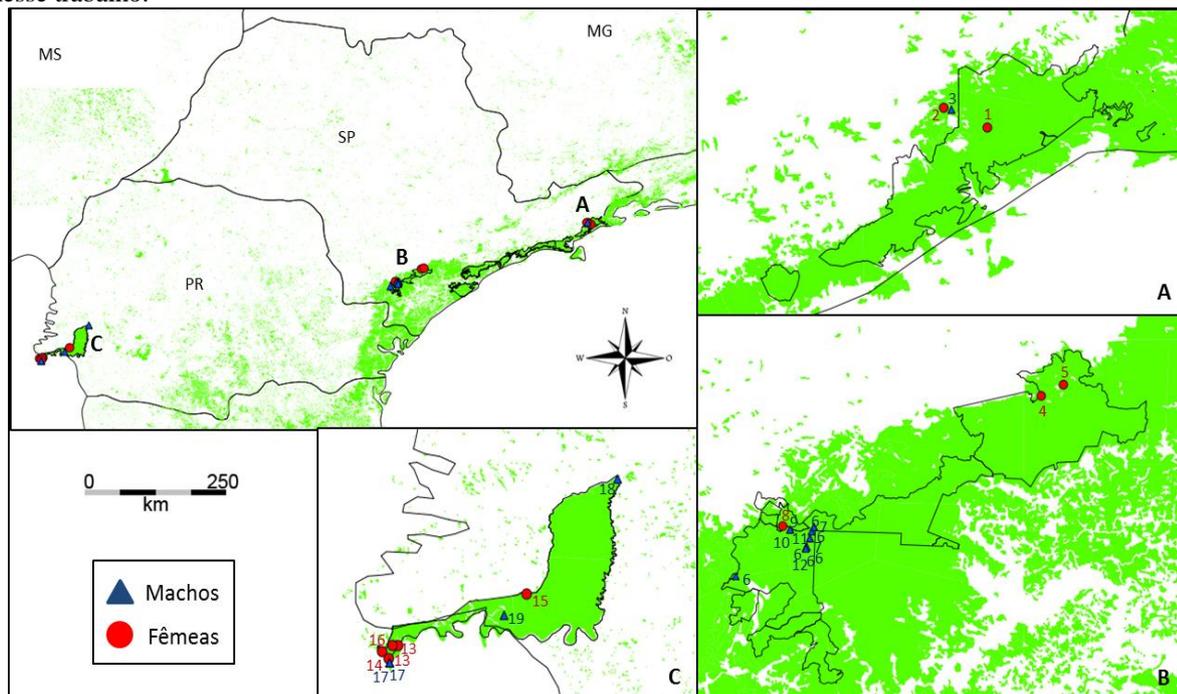
Tabela 1- Individualização das 27 amostras de onças-pintadas identificadas como 19 indivíduos.

Unidade de Conservação	Tipo de material	ID	Ano de coleta	Sistema de posicionamento global (GPS)		Individualização	Sexo
Parque Estadual da Serra do Mar	Fezes	SM3	2012	-23,3251233949	-45,0829270251	1	F
Parque Estadual da Serra do Mar	Fezes	SM6	2013	-23,29317317	-45,15473462	2	F
Parque Estadual da Serra do Mar	Fezes	SM12	2012	-23,29673479	-45,14247544	3	M
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB8	2011	-24,09458351	-47,97054077	4	F
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB26	2009	-24,07611764	-47,93138083	5	F
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I1	2010	-24,30808333	-48,35866667	6	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I2	2010	-24,34281357	-48,37356859	6	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I5	2010	-24,30807664	-48,35866194	7	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I6	2010	-24,30670661	-48,41308227	8	F
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I7	2010	-24,31316079	-48,40046832	9	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I9	2010	-24,31316079	-48,40046832	10	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I10	2010	-24,31539646	-48,36336237	6	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I11	2010	-24,3274466	-48,36616254	7	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I13	2010	-24,3274466	-48,36616254	11	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I14	2010	-24,34123313	-48,37124281	6	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I15	2010	-24,34123313	-48,37124281	6	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I20	2010	-24,38899553	-48,49305809	6	M
Parque Estadual de Intervales	Fezes	I29	2010			12	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI4	2013	-25,6067700988	-54,407122479	13	F
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI14	2010	-25,6268777349	-54,4616281504	14	F
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI15	2012	-25,4380555556	-53,9530555556	15	F
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI18	2013	-25,6066375271	-54,4271904373	16	F
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI31	2012	-25,66268833	-54,43688182	17	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI37	2012	-25,66268833	-54,43688182	17	M
Parque Nacional do Iguaçu	Pelo	PNI43	2013	-25,65136111	-54,44108333	13	F
Parque Nacional do Iguaçu	Pelo	PNI45	2012	-25,06041667	-53,63255556	18	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI61	2013	-25,508	-54,03255556	19	M

A tabela apresenta as Unidades de Conservação onde foi detectado amostras de onça-pintada, o tipo de material coletado para a extração de DNA, a identificação de cada uma das amostras (ID), o ano de coleta, as localizações geográficas (GPS), a individualização (1-19) e o sexo de cada indivíduo. As cores das linhas indicam os indivíduos recapturados.

Com isso, o número mínimo de onças-pintadas no PESM são três, 2 fêmeas (F): 1 macho (M), no PECB são duas fêmeas; no PEI, 7 (1F: 6M), e no PNI, 7 indivíduos (4F: 3M) (Figura 9). Os indivíduos foram recapturados até cinco vezes. Todos os recapturados foram coletados no mesmo ano e dentro da mesma Unidade de Conservação. Não foi identificada nenhuma onça melânica dentre os indivíduos encontrados.

Figura 9 - Mapa do Brasil com foco na região sudeste/sul apontando a localização das onças-pintadas identificadas nesse trabalho.



O mapa apresenta os dois grandes remanescentes de Mata Atlântica onde foram detectadas onças-pintadas, apontando em letras as regiões específicas onde foram coletadas as amostras; (A) Núcleo Santa Virgínia (PESM) com três indivíduos coletados; (B) PECB e PEI com os oito indivíduos identificados, mostrando inclusive as recapturas; (C) PNI com as sete amostras, incluindo as recapturadas.

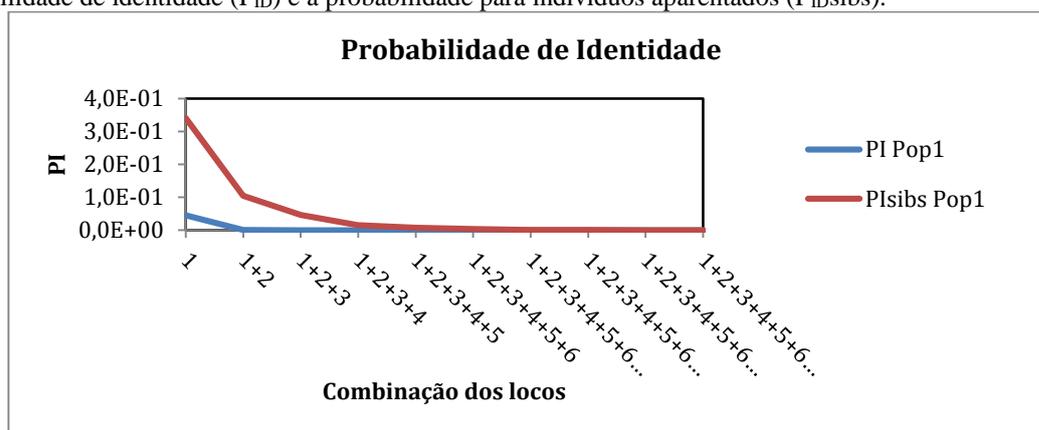
A $P_{ID\text{sibs}}$ detectada foi 0,0521 e a $P_{ID\text{unbias}}$, 0,00232, sendo que o loco mais informativo foi o 391 (Tabela 2).

Tabela 2- Quadro informando sobre os alelos encontrados e as probabilidades de identidade.

Loco	$P_{ID\text{unbias}}$	$P_{ID\text{sibs}}$
FCA441	2,31E-02	3,42E-01
FCA391	9,76E-05	1,04E-01
F98	9,55E-06	4,63E-02
F42	1,76E-07	1,54E-02
F53	3,32E-08	7,87E-03
FCA723	3,88E-09	3,69E-03
FCA740	3,19E-11	1,15E-03
FCA742	1,95E-13	3,58E-04
FCA453	1,90E-14	1,59E-04
F146	2,64E-16	5,15E-05
Média	2,32E-03	5,21E-02

No gráfico com as probabilidades de identidade (Figura 10) podemos verificar que apenas quatro locos já foram suficientes para individualizar as amostras. Erros de genotipagem foram detectados em uma taxa de 0,045 de alelo *dropout* e 0,038 de falsos alelos. Alelos privados foram encontrados em todas as UCs, entretanto, no PEI o número foi maior dentre todos os locos (25 alelos privados). No PESM foram encontrados 8 alelos privados, no PECB cinco e no PNI, 13.

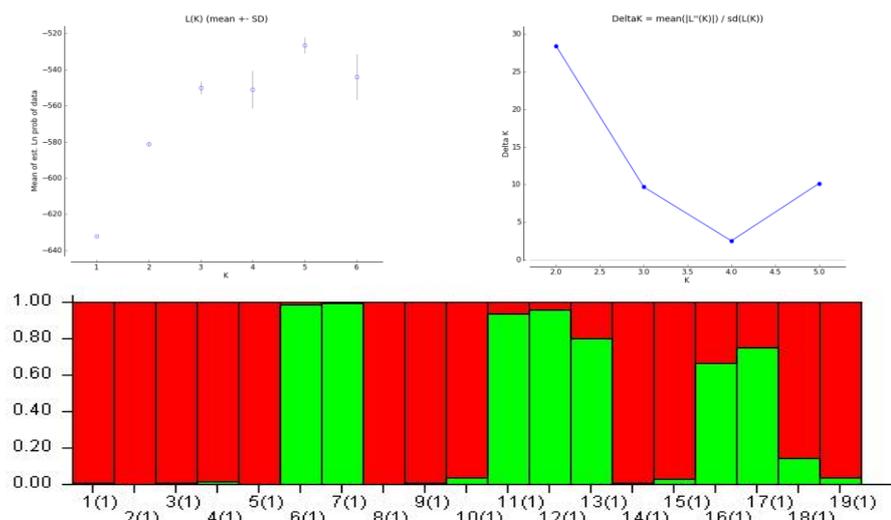
Figura 10- Gráfico apresentando a combinação dos locos necessários para a individualização, segundo a probabilidade de identidade (P_{ID}) e a probabilidade para indivíduos aparentados (P_{IDSibs}).



4.2.2 Estruturação genética

A primeira análise Bayesiana (sem inserir informações sobre agrupamentos) determinou um número provável de duas populações ($k=2$) segundo o método de Evanno et al. (2005), apesar de Pritchard et al. (2000) sugerir cinco populações (Figura 10). O gráfico apresenta a distribuição dos indivíduos em duas populações, uma composta pela maioria dos indivíduos (agrupamento vermelho) e outra com quatro indivíduos do PEI e três do PNI (agrupamento verde) (Figura 11). A ordem dos indivíduos no gráfico permanece a mesma da Tabela 1.

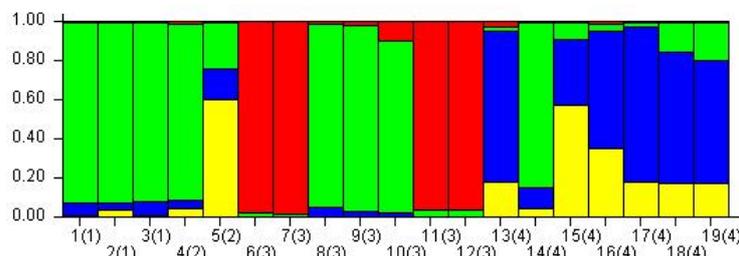
Figura 11- Gráficos gerados em análises de estruturação populacional de modo Bayesiano.



O gráfico da direita apresenta o resultado do método de Pritchard et al. (2000), segundo o qual escolhe-se o K que maximiza o valor de $\ln P(K)$ e que possua a menor variância. O gráfico à esquerda é o resultado do método de Evanno et al. (2005), que propõem a escolha do valor de K que maximize as diferenças de sucessivos valores de $\ln P(K)$ (delta K). O gráfico abaixo mostra a distribuição dos indivíduos em duas populações (verde - composta por quatro indivíduos do PEI e três do PNI, e vermelha - indivíduos restantes).

Posteriormente, a mesma análise foi realizada com a distribuição dos indivíduos dentro de quatro grupos (número de UCs representadas por onças-pintadas), o qual, pôde esclarecer melhor a diferenciação entre os indivíduos (Figura 12). No gráfico podemos ver claramente um grupo diferenciado sendo representado pelos últimos sete indivíduos que foram coletados no PNI (predominância do amarelo e azul), enquanto que a maior parte dos indivíduos amostrados no contínuo da Serra do Mar parecem fazer parte de outra população (verde), com a exceção de quatro indivíduos (vermelho). Estes haviam sido selecionados anteriormente como membros de outra população (verde, Figura 11).

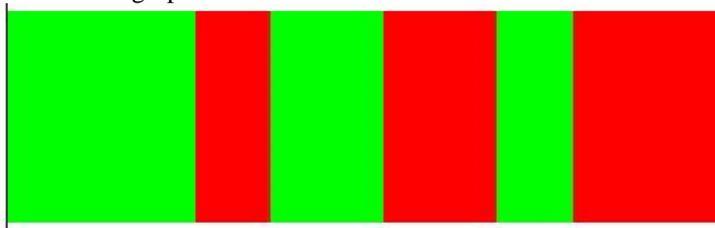
Figura 12- Gráfico da análise Bayesiana com a distribuição dos indivíduos segundo o número de UCs amostradas ($k=4$).



No gráfico podemos visualizar quatro cores referentes a quatro populações. A ordem das barras está de acordo com as UCs amostradas (PESM, PECB, PEI e PNI).

No programa BAPS também foi avaliada a distribuição dos indivíduos com ausência de informação sobre as localizações geográficas, o que gerou um gráfico similar ao do Structure, com um número sugerido de dois grupos ($k=2$) (Figura 13). Esse gráfico separa alguns indivíduos do contínuo da Serra do Mar e do PNI em um distinto grupo.

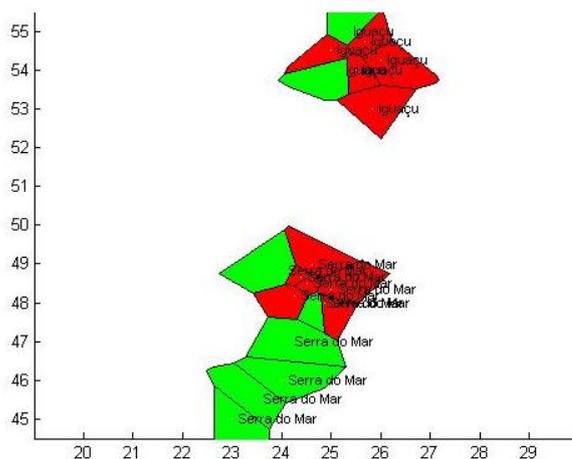
Figura 13- Gráfico da estruturação genética realizada no programa BAPS sem informação geográfica dos indivíduos, dando um número de agrupamentos de $k=2$.



Na figura podemos visualizar as duas cores (vermelho e verde) referentes às duas populações.

Com a informação geográfica dos indivíduos, o programa pôde gerar um gráfico em 3D (Figura 14) mostrando não só os indivíduos sendo atribuídos às duas populações (vermelho e verde), mas também a disposição geográfica das UCs. No gráfico, fica claro que há distinção entre duas populações, uma composta pelos indivíduos do contínuo da Serra do Mar (grupo verde) e outra pelos animais do PNI (grupo vermelho).

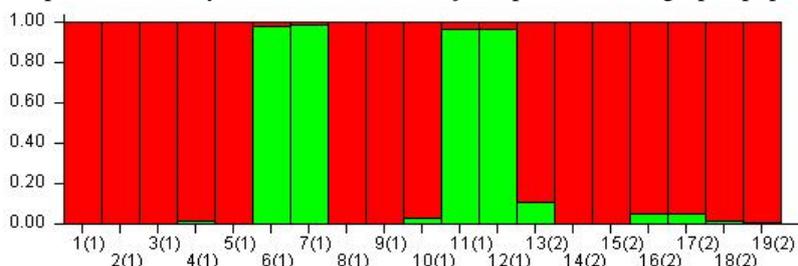
Figura 14- Gráfico em 3D gerado pelo programa BAPS após a informação sobre a localização geográfica das amostras.



O programa sugere um $k=2$ e representa no gráfico não só a atribuição das populações pelas cores (vermelho e verde), mas também a disposição geográfica das UCs.

Com esses resultados pôde-se concluir que o grupo de indivíduos amostrados nas quatro UCs parecem pertencer a duas populações distintas, uma constituída pelos indivíduos do PNI (Mata Atlântica de interior) e outra pelos indivíduos amostrados no contínuo da Serra do Mar (Mata Atlântica costeira). Assim, a análise Bayesiana foi novamente realizada, mas agora, com a informação prévia de dois grupos genéticos ($k=2$), gerando um gráfico com a distinção de apenas quatro indivíduos de Intervales (Figura 15).

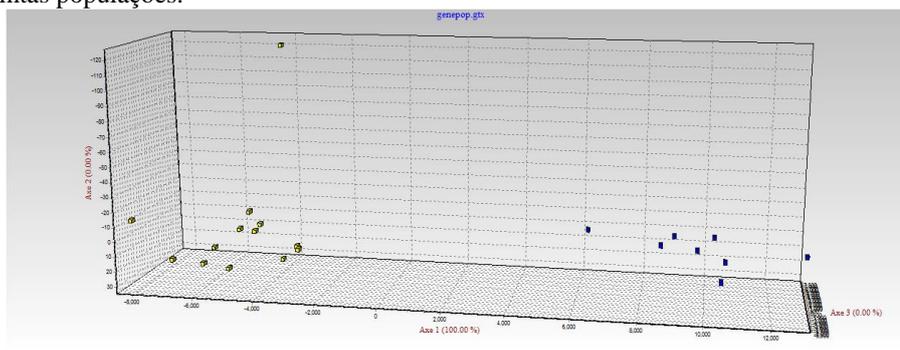
Figura 15- Gráfico gerado pela análise Bayesiana com a informação a priori de dois grupos populacionais.



Na figura podemos visualizar as duas cores (vermelho e verde) referentes às duas populações, uma composta por indivíduos coletados no contínuo da Serra do Mar e outra por animais do PNI.

Posteriormente, uma análise AFC foi implementada com a informação de dois agrupamentos, de acordo com os resultados obtidos anteriormente. O gráfico em 3D apresenta uma clara distinção espacial entre os indivíduos das duas populações (Figura 16). Na soma do primeiro fator (eixo 1) já foi obtida 100% da variação.

Figura 16- Gráfico em 3D gerado pela análise de ACF mostrando a distância espacial dos indivíduos, de acordo com duas distintas populações.



No gráfico pode ser visualizado duas populações, do contínuo da Serra do Mar representado por quadrados amarelos e do PNI, em quadrados azuis

Enquanto o programa GeneClass apontou que quatro indivíduos são prováveis migrantes de primeira geração (SM3, SM12, CB26 e NI14), o Structure, sugeriu que apenas a fêmea Ni14 é migrante, com 92% de chance de pertencer à população do contínuo da Serra do Mar (Figura 17). A atribuição de indivíduos mostrou que todos os indivíduos estão sendo alocados em suas próprias populações.

Figura 17- Gráfico indicando um indivíduo migrante na população do PNI.



A cor vermelha representa a população do contínuo da Serra do Mar e a cor verde, do PNI.

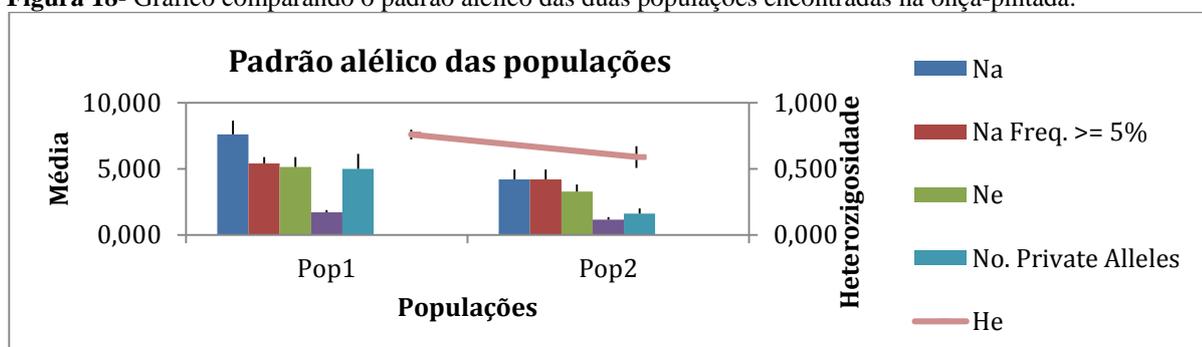
A AMOVA identificou que cerca de 88% da variação genética encontrada está dentro dos indivíduos e que apenas 12% é resultado de diferenças entre as populações (Tabela 3). Os estimadores de distância genética relataram baixa ou nenhuma diferenciação entre as populações ($F_{ST} = 0.081$, $p = 0,05$; $D_{est} = 0,284$). Recente gargalo genético populacional foi identificado na população do Iguaçu ($p = 0,013$), mas não no contínuo da Serra do Mar ($p = 0,845$).

Tabela 3- Distribuição da variação genética dentro e entre as populações de acordo com a AMOVA.

Origem da variação	Soma dos squares	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	11	0,5	11,76
Dentro das populações	122	3,75	88,23
Total	133	-	-

Para concluir, os padrões alélicos das duas populações foram observados de acordo com o número de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), número de alelos privados e heteroziguidade esperada (H_e) (Figura 18). Como pode ser visualizado, a população do contínuo da Serra do Mar (pop 1) apresentou um maior número de alelos, maior heteroziguidade e maior número de alelos privados, quando se compara à população do PNI (pop 2).

Figura 18- Gráfico comparando o padrão alélico das duas populações encontradas na onça-pintada.



4.2.3. Diversidade genética e parentesco

As análises de diversidade genética foram iniciadas com a avaliação da presença de erros de genotipagens em ambas as populações, o qual identificou que no contínuo da Serra do Mar praticamente todos os locos apresentaram alelos nulos (exceção do 453), mas não falsos alelos ou alelos *dropout*. Na população do Iguaçu não foi avaliado devido a falta de dados. O loco F53 foi monomórfico para a população do Iguaçu.

Os dados gerais de diversidade genética por loco nas duas populações foram avaliados (Tabela 4). A população do contínuo da Serra do Mar apresentou, em geral, uma maior diversidade genética ($N_a = 7,6$; $H_e = 0,759$; $RA = 3,036$; e $DG = 0,822$), comparada à do Iguaçu

($N_a = 4,2$; $H_e = 0,589$; $RA = 2,520$; e $DG = 0,716$). Apesar do número de alelos (N_a) e a heteroziguidade (H_e) serem representativas do número de indivíduos, a riqueza alélica (RA) e a diversidade gênica (DG) são estimativas independente do número amostral. Por isso, podemos concluir que o maior remanescente de Mata Atlântica abriga indivíduos de onças-pintadas mais diversos do que a população do Parque Nacional do Iguaçu. Nenhum loco se encontrou em desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e nenhum dos pares de locos estão em desequilíbrio de ligação. O PIC dos locos de microssatélites variou de 0,532 (F53) a 0,891 (FCA391), com média de 0,758.

Tabela 4- Estimativas de diversidade genética de duas populações de onças-pintadas baseado em 10 locos de microssatélites polimórficos.

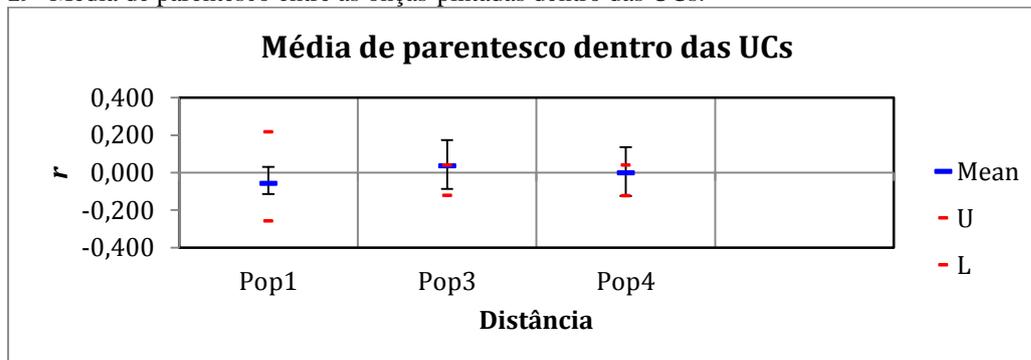
População	Loco	N	N_a	N_e	H_o	H_e	DG	RA	$P (F_{is})$
Contínuo da Serra do Mar	441	11	7	4,246	0,091	0,764	0,836	3,016	0,002
	391	11	12	8,345	0,455	0,880	0,945	3,563	0,002
	98	10	4	2,564	0,400	0,610	0,656	2,401	0,057
	42	11	7	5,500	0,455	0,818	0,877	3,223	0,002
	53	10	5	3,571	0,400	0,720	0,778	2,782	0,015
	723	6	4	2,667	0,167	0,625	0,733	2,495	0,005
	740	12	10	7,784	0,500	0,872	0,928	3,484	0,002
	742	11	13	6,914	0,545	0,855	0,914	3,463	0,002
	453	9	5	2,418	0,778	0,586	0,611	2,426	0,152
	146	9	9	7,364	0,333	0,864	0,951	3,514	0,002
Média		10	7,6	5,137	0,412	0,759	0,822	3,036	-
Iguaçu	441	7	7	4,667	0,571	0,786	0,869	3,193	0,052
	391	5	5	3,846	0,600	0,740	0,850	3,062	0,175
	98	7	5	3,630	0,286	0,724	0,821	2,897	0,007
	42	7	7	5,765	0,571	0,827	0,917	3,384	0,047
	53	4	1	1,000	0,000	0,000	0,000	1	0,000
	723	4	2	1,882	0,250	0,469	0,583	1,929	0,422
	740	6	4	2,880	0,667	0,653	0,717	2,624	0,520
	742	7	7	5,444	0,571	0,816	0,905	3,329	0,047
	453	2	2	2,000	0,000	0,500	1	2	0,297
	146	4	2	1,600	0,000	0,375	0,500	1,786	0,137
Média		5,3	4,2	3,271	0,352	0,589	0,716	2,520	-

N: número de indivíduos analisados; N_a : número de alelos; N_e : número efetivo de alelos; H_o : Heteroziguidade observada; H_e : Heteroziguidade esperada; DG: diversidade gênica; RA: riqueza alélica; e $P (F_{is})$: valor de P do coeficiente de endogamia.

O N_e encontrado para a população do contínuo da Serra do Mar foi de 27,9 indivíduos (99% de certeza) e do Iguaçu, 14,2 indivíduos (99% de certeza). Um recente gargalo genético populacional foi detectado na primeira população ($p = 0,009$), mas não na população do Iguaçu ($p = 0,700$).

A PE encontrada apresentou 99% de confiança. O parentesco médio entre os indivíduos do PESH foi -0,059, no PEI foi 0,036 e no PNI, -0,001 (Figura 19). Os indivíduos do PEI apresentaram o maior grau de relacionamento. No PECB não pôde ser verificado o parentesco médio, pois foram amostrados apenas dois indivíduos.

Figura 19- Média de parentesco entre as onças-pintadas dentro das UCs.



Pop1: Indivíduos do PESH, Pop3: Indivíduos do PEI, e Pop4: Indivíduos do PNI.

O relacionamento de parentesco sugerido no programa ML Relate não detectou alelos nulos em nenhum dos locos e concluiu que os indivíduos não são relacionados, com exceção de dois pares de irmãos completos: um no PEI ($r = 0,85$, machos I1 e I5) e um no PNI ($r = 0,71$, fêmea PNI4 e macho PNI37). Os valores de parentesco (r) e as prováveis categorias de relacionamento de cada uma das populações indicam que a maioria dos indivíduos não são relacionados (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-pintada da população da Serra do Mar.

	SM3	SM6	SM12	CB8	CB26	I1	I5	I6	I7	I9	I13	I29
SM3	-	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
SM6	0,02	-	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
SM12	0	0	-	U	U	U	U	HS	U	U	U	U
CB8	0,11	0,05	0	-	U	U	U	U	U	U	U	U
CB26	0	0	0	0	-	U	U	U	U	U	U	U
I1	0	0	0	0	0	-	FS	U	U	U	U	HS
I5	0	0	0	0	0	0,87	-	U	U	U	U	HS
I6	0	0	0,26	0	0,07	0	0	-	U	U	U	U
I7	0,05	0	0	0	0	0	0	0	-	HS	U	U
I9	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0,19	-	U	U
I13	0	0	0	0,12	0,03	0,22	0,22	0	0	0,11	-	U
I29	0	0	0	0	0	0,29	0,29	0	0	0	0,14	-

As cores estão demonstrando o grau de relacionamento entre os pares de indivíduos, sendo que quanto mais escuro são o quadrado, maior o relacionamento. FS: irmãos completos; HS: meios-irmãos e U: não relacionados.

Tabela 6- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-pintada da população do PNI.

	NI4	NI14	NI15	NI18	NI37	NI45	NI61
NI4	-	U	U	U	FS	U	U
NI14	0	-	U	U	U	U	U
NI15	0	0	-	U	U	U	U
NI18	0	0	0,09	-	U	U	U
NI37	0,71	0	0	0	-	U	U
NI45	0	0	0	0	0,11	-	U
NI61	0	0	0	0	0	0	-

As cores estão demonstrando o grau de relacionamento entre os pares de indivíduos, sendo que quanto mais escuro são o quadrado, maior o relacionamento. FS: irmãos completos; e U: não relacionados.

4.3 Onça-parda

4.3.1 Demografia

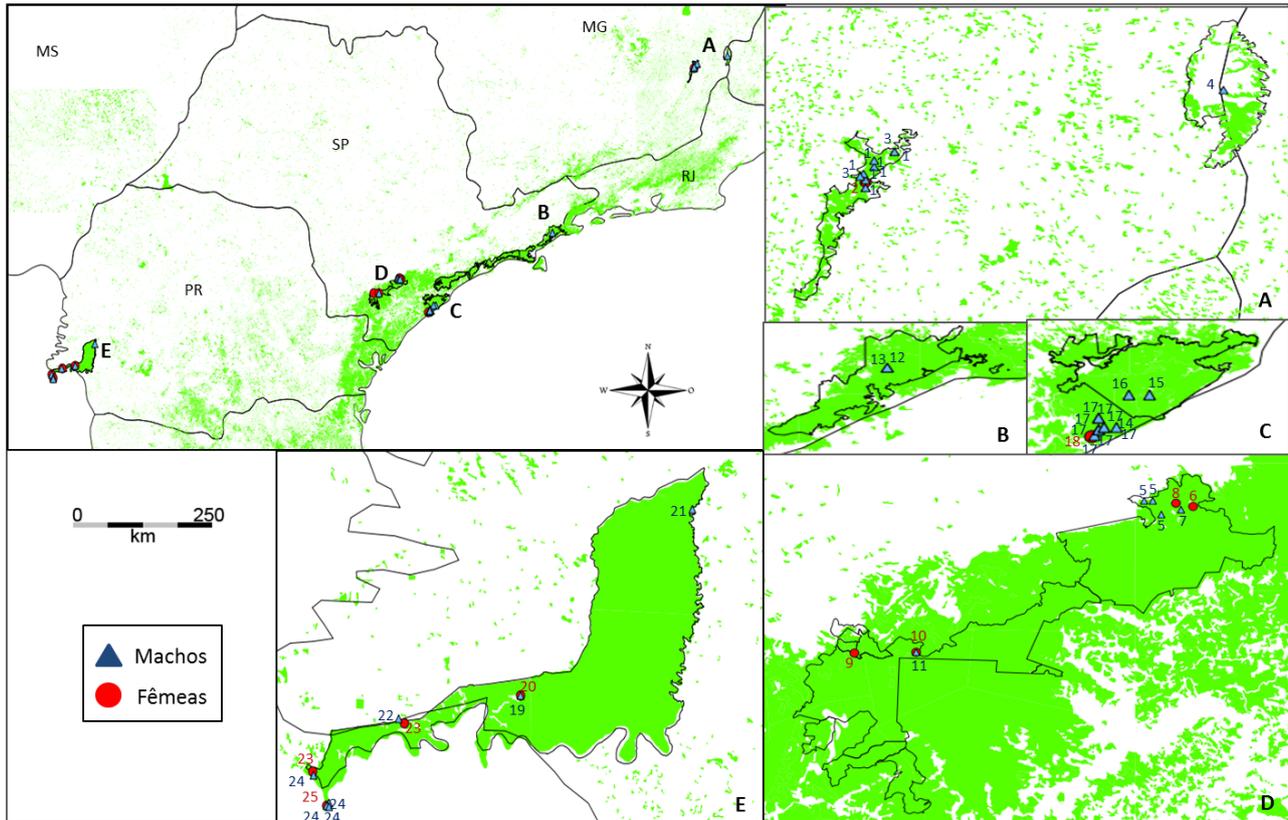
Uma amostra de sangue e três de pelos de onças-pardas foram adicionadas às amostras não invasivas confirmadas da espécie. As 64 amostras foram amplificadas em todos os locos de microssatélites, entretanto, foram selecionados 11 locos polimórficos (85%) e 45 amostras (70%) que apresentaram, pelo menos, 70% de sucesso. As amostras foram individualizadas e detectou-se que existe, ao menos, 25 onças-pardas entre os remanescentes, 9 machos e 16 fêmeas (Tabela 7).

Tabela 7- Individualização de 45 amostras de onças-pardas em 25 diferentes genótipos.

Unidade de Conservação	Tipo de Material	ID	Ano de coleta	Sistema de posicionamento global (GPS)		Individualização	Sexo
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB1	2011	-20,65552983	-42,41632035	1	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB2	2011	20,6383699017	-42,4166103962	1	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB4	2011	20,6555213854	-42,4157889259	1	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB5	2011	-20,611810511	-42,4018394907	1	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB6	2011	-20,6263601086	-42,4197979499	1	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB9	2011	-20,5986493344	-42,4011210325	1	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB12	2011	-20,6442536682	-42,417000171	2	F
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB13	2011	-20,5798081221	-42,3652004956	1	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fezes	SB14	2011	-20,5798171485	-42,3652003405	3	M
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Sangue	SB15	2012	-20,63079028	-42,424885	3	M
Parque Nacional do Caparaó	Fezes	PNCa4	2012	-20,448136	-41,792110	4	M
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB6	2009	-24,06249635	-47,98675863	5	M
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB9	2011	-24,06214363	-47,97388826	5	M
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB10	2011	-24,07051075	-47,91314121	6	F
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB11	2011	-24,08445918	-47,96128155	5	M
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB21	2009	-24,07611764	-47,93138083	7	M
Parque Estadual de Carlos Botelho	Fezes	CB28	2012	-24,06527214	-47,93869569	8	F
Parque Estadual Intervalas	Fezes	I22	2010	-24,30674825	-48,42472732	9	F
Parque Estadual Intervalas	Fezes	I24	2011	-24,30534435	-48,33240757	10	F
Parque Estadual Intervalas	Fezes	I25	2011	-24,30534435	-48,33240757	11	M
Parque Estadual da Serra do Mar	Fezes	SM4	2012	-23,3260368787	-45,0807365361	12	M
Parque Estadual da Serra do Mar	Fezes	SM9	2012	-23,3260368787	-45,0807365361	13	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J14	2012	-24,5924442499,	-47,342171672	14	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J18	2012	-24,5015624961	-47,262381635	15	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J19	2011	-24,5005662036	-47,3120347294	16	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J122	2013	-24,6148082359	-47,3951460687	17	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J123	2013	-24,59980586	-47,38381302	17	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J124	2013	-24,61780565	-47,40019935	18	F
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J125	2013	-24,59999829	-47,38420169	17	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J126	2013	-24,59999829	-47,38420169	17	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J127	2013	-24,56574793	-47,38274368	17	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J128	2013	-24,56574793	-47,38274368	17	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J130	2013	-24,59155625	-47,37120829	17	M
Estação Ecológica Juréia-Itatins	Fezes	J136	2014	-24,59155625	-47,37120829	17	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI11	2010	-25,47795731	-54,02300088	19	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI20	2013	-25,47795731	-54,02300088	20	F
Parque Nacional do Iguaçu	Pelo	PNI48	2007	-25,1287376	-53,6585676	21	M
Parque Nacional do Iguaçu	Pelo	PNI49	2007	-25,52191049	-54,28259198	22	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI56	2013	-25,53033333	-54,27030556	23	F
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI71	2014	-25,62201162	-54,46568297	23	F
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI73	2014	-25,680000	-54,430000	24	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI74	2014	-25,62877955	-54,46408663	24	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI77	2014	-25,68602064	-54,43555576	25	F
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI86	2014	-25,68602536	-54,43582457	24	M
Parque Nacional do Iguaçu	Fezes	PNI89	2014	-25,6874063106	-54,43019762	24	M

O número onça-pardas coletadas no PESB foram 3 (1F: 2M), no PNCa um macho, no PECB, 4 (2F: 2M), no PEI, 3 (2F:1M), no PESM, dois machos, na EEJI, 5 (1F: 4M) e no PNI, 7 indivíduos (3F: 4M) (Figura 20). O mesmo indivíduo foi recapturado até sete vezes. Todos os indivíduos recapturados foram encontrados dentro da mesma UC e com um intervalo máximo de dois anos.

Figura 20- Mapa do Brasil com foco na região sudeste/sul apontando a localização das onças-pardas identificadas nesse trabalho.



Mapa apresentando três grandes remanescentes de Mata Atlântica onde foram detectadas onças-pardas, apontando em letras as regiões específicas onde foram coletadas as amostras; (A) O PESB e o PNCA em foco mostrando os quatro indivíduos, incluindo as recapturas; (B) Foco no Núcleo Santa Virgínia (PESM) mostrando a localização dos dois indivíduos coletados; (C) Mapa da EEJI apresentando os cinco indivíduos detectados na UC e as recapturas; (D) Foco em Carlos Botelho e Intervalas apontando a localização dos sete indivíduos identificados, com suas recapturas; (E) Mapa do Iguaçu com a localização das sete amostras, incluindo as recapturas.

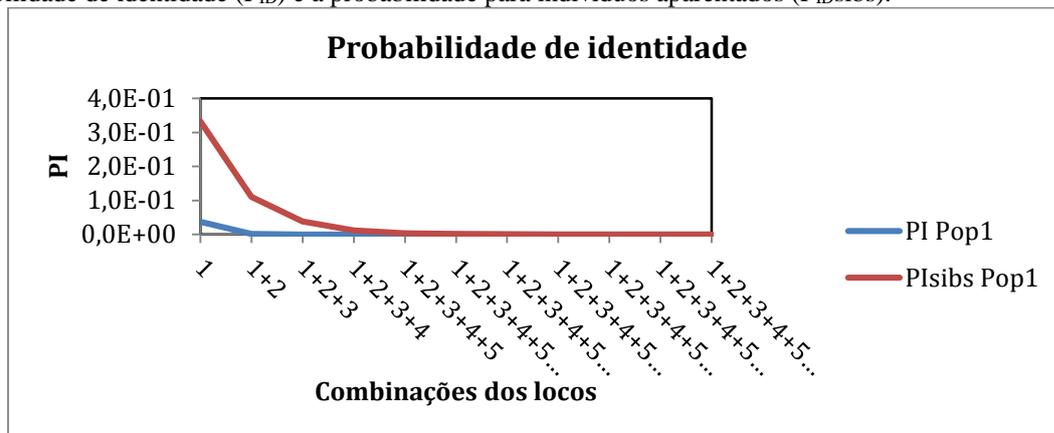
A média de $P_{IDunbias}$ foi 0,00189 e a P_{IDSibs} foi 0,0453, sendo que os locos mais informativos foram os B003 e B010 (Tabela 8).

Tabela 8- Número de alelos por loco, conteúdo de informação dos locos, variação do tamanho dos alelos e probabilidades de identidade não enviesada ($P_{IDunbias}$) e para indivíduos aparentados (P_{IDSibs}).

Loco	A	Alelos	PIC	$P_{IDunbias}$	P_{IDSibs}
A106	11	242-276	0,837	2,04E-02	3,33E-01
A208	13	153-199	0,841	4,13E-04	1,10E-01
A216	8	242-266	0,814	1,26E-05	3,80E-02
A339	12	237-285	0,878	1,37E-07	1,18E-02
B003	12	267-305	0,878	1,45E-09	3,68E-03
B010	14	202-232	0,876	1,36E-11	1,15E-03
B210	11	160-182	0,862	1,99E-13	3,69E-04
C108	12	115-177	0,800	6,72E-15	1,30E-04
B303	13	242-278	0,789	1,81E-16	4,71E-05
B316	12	254-300	0,85	3,08E-18	1,54E-05
C112	11	119-197	0,842	6,21E-20	5,08E-06
Média	11,7	-	0,842	1,89E-03	4,53E-02

Na figura 21 pôde verificar que apenas quatro locos já foram suficientes para individualizar as amostras. Erros de genotipagem foram detectados através dos locos em uma taxa de 0,037 de alelo *dropout* e 0,051 de falsos alelos. Alelos privados foram encontrados em todas as UCs, entretanto, no PNI o número foi maior dentre todos os locos (17 alelos privados). Na Serra da Mantiqueira foram encontrados sete alelos privados, no PECB e no PNI sete, no PESM, 7 e na EEJI, 13.

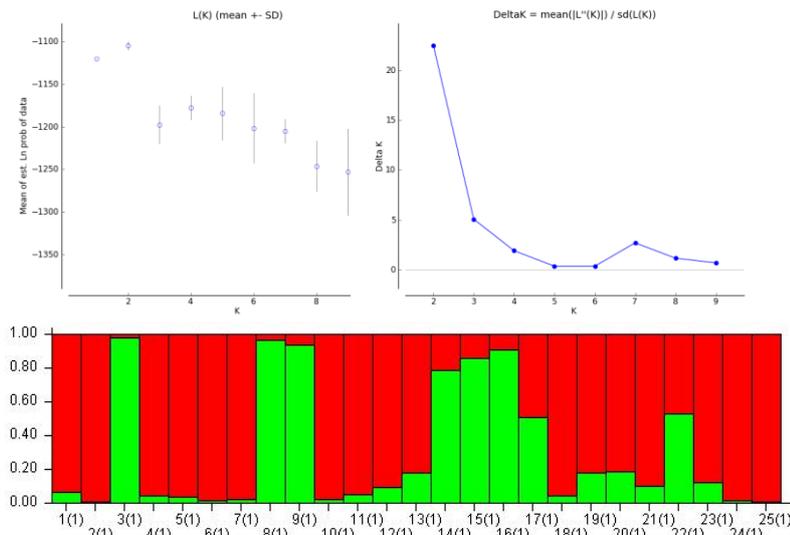
Figura 21– Gráfico apresentando a combinação dos locos necessários para a individualização, segundo a probabilidade de identidade (P_{ID}) e a probabilidade para indivíduos aparentados (P_{IDSibs}).



4.3.2 Estruturação genética

A análise Bayesiana (sem inserir informação geográfica *a priori*) determinou que o número mais provável de populações são duas ($k = 2$), de acordo com os métodos de Pritchard et al. (2000) e de Evanno et al. (2005) (Figura 22). O gráfico com a distribuição dos indivíduos em dois grupos mostra que a maioria dos indivíduos pertencem a população “vermelha” e que um indivíduo da Serra da Mantiqueira, seis do contínuo da Serra do Mar e um do PNI parecem pertencer a uma população distinta (verde) (Figura 22).

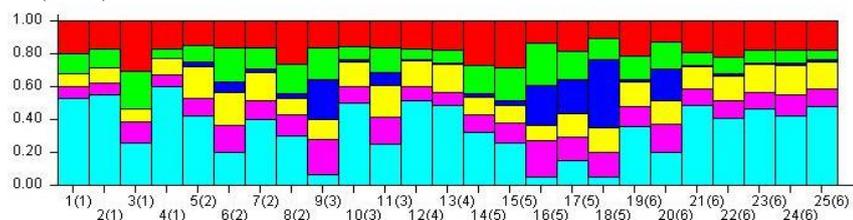
Figura 7- Gráficos gerados na análise Bayesiana de estruturação populacional sem dados *a priori*.



O gráfico da direita apresenta o resultado do método de Pritchard et al. (2000), segundo o qual escolhe-se o K que maximiza o valor de $\text{LnP}(K)$ e que possua a menor variância. O gráfico à esquerda é o resultado do método de Evanno et al. (2005), que propõem a escolha do valor de K que maximize as diferenças de sucessivos valores de $\text{LnP}(K)$ (delta K). O gráfico abaixo mostra a distribuição dos indivíduos em duas populações (verde - um indivíduo da Serra da Mantiqueira, seis do contínuo da Serra do Mar e um do PNI, vermelha - restante dos indivíduos).

Posteriormente, a mesma análise foi realizada considerando os indivíduos distribuídos em seis grupos (número de Unidades de Conservação), o que gerou um gráfico em que os indivíduos, em geral, não parecem se diferenciar amplamente, com exceção de alguns indivíduos da EEJI (Figura 23).

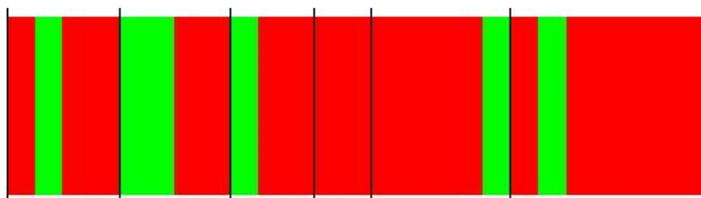
Figura 8- Gráfico originário de análise Bayesiana com a distribuição dos indivíduos considerando o número de UCs amostradas ($k = 6$).



No gráfico podemos visualizar seis cores referentes às seis populações. A ordem dos indivíduos está de acordo com os locais amostrados (PESB e PNCa, PECB, PEI, PESM, EEJI e PNI).

No programa BAPS também foi avaliada a distribuição dos indivíduos com ausência de informação geográfica, o que gerou um gráfico similar ao do Structure, com um número sugerido de dois agrupamentos ($k = 2$). Nota-se que apesar do programa sugerir o mesmo número de populações que a análise Bayesiana, atribuiu diferentes indivíduos à segunda população (verde).

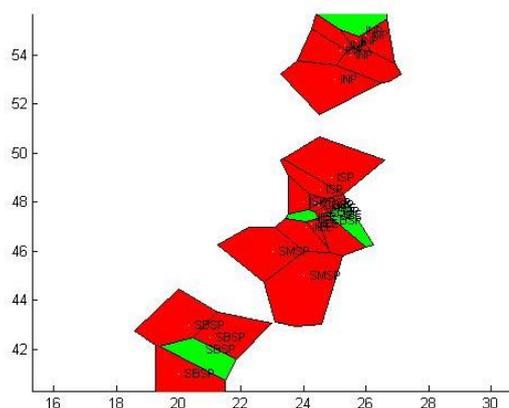
Figura 9- Gráfico gerado no programa BAPS sem informação geográfica dos indivíduos, gerando um número de agrupamentos de $k=2$.



Na figura podemos visualizar as duas cores (vermelha e verde) as distintas populações. A ordem dos indivíduos está de acordo com os locais amostrados (PESB e PNCA, PECB, PEI, PESM, EEJI e PNI).

Com a informação geográfica dos indivíduos, o BAPS pôde gerar um gráfico em 3D (Figura 25) mostrando disposição geográfica das UCs e a atribuição dos indivíduos às duas populações sugeridas (vermelha e verde). Nota-se que o programa atribui praticamente todos os indivíduos dentro de uma mesma população (vermelha), com exceção de alguns indivíduos representados pelos três fragmentos.

Figura 10- Gráfico em 3D gerado pelo programa BAPS após a informação sobre a localização geográfica das amostras.

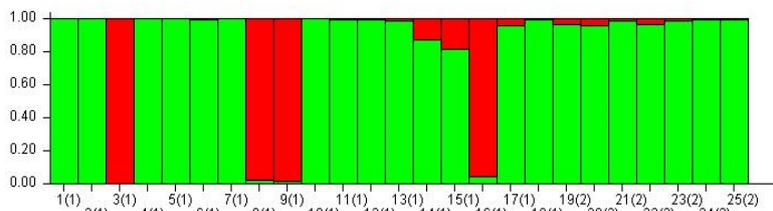


O programa sugere um $k=2$ e representa no gráfico não apenas a atribuição dos indivíduos às populações pela disposição das cores (vermelha e verde), mas também a disposição geográfica das UCs.

Os resultados obtidos até o momento não permitem definir claramente as populações, apesar de estar clara a existência de dois grupos distintos. Assim, os métodos de distância foram avaliados como suporte para a definição das populações. Considerando os indivíduos dentro de dois grupos populacionais, um representado pelos indivíduos da Serra da Mantiqueira e da Serra do Mar, e outro pelos animais do Parque Nacional do Iguaçu, os valores de diferenciação obtidos foram ligeiramente significativos ($F_{ST} = 0,0183$, $P = 0,300$; $D_{est} = 0,146$).

Com esses resultados pôde-se concluir que provavelmente o grupo de indivíduos amostrados nas seis UCs estão sendo representados por duas populações, uma composta por indivíduos do PNI e outra pelos indivíduos do contínuo da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira. Não houve indícios suficientes para a diferenciação entre os indivíduos das duas Serras. Assim, o programa Structure foi novamente examinado, mas, agora avaliando a distribuição dos indivíduos com a informação prévia de dois grupos genéticos ($k=2$; Figura 26).

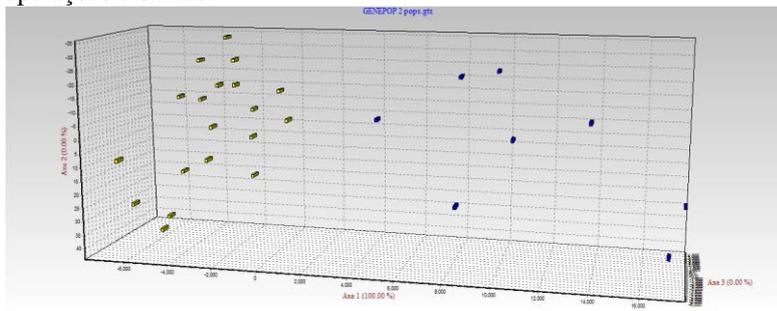
Figura 11- Gráfico gerado pela análise Bayesiana com a informação *a priori* de dois grupos populacionais, um composto por indivíduos coletados no contínuo da Serra do Mar e outro por indivíduos do PNI.



Na figura podemos visualizar as duas cores (vermelho e verde) referentes às duas populações.

Posteriormente, a análise de ACF foi realizada de acordo com os dois agrupamentos estabelecidos (Figura 27), sendo que no primeiro fator (eixo 1) já foi obtido 100% da variação. O gráfico apresenta a distribuição espacial dos indivíduos e podemos notar a diferenciação entre as populações (amarelo e azul).

Figura 12- Gráfico em 3D gerado pela análise ACF mostrando a distância espacial dos indivíduos quando foram consideradas duas populações distintas.



No gráfico se pode visualizar duas populações, uma amarela (contínuo da Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira) e outra em azul (PNI), claramente separadas.

Enquanto a análise de migrantes de primeira geração no GeneClass apontou seis indivíduos (PNCa4, CB21, I25, EEJ19, JI24 e PNI49), o Structure, não foi capaz de detectar nenhum migrante. A atribuição de indivíduos apontou que todos os indivíduos estão sendo alocados em suas próprias populações, reforçando assim, o estabelecimento dessas duas populações. A AMOVA detectou que cerca de 95% de toda a variação genética está presente dentro das populações e apenas 5% é resultado de diferenças entre elas (Tabela 9).

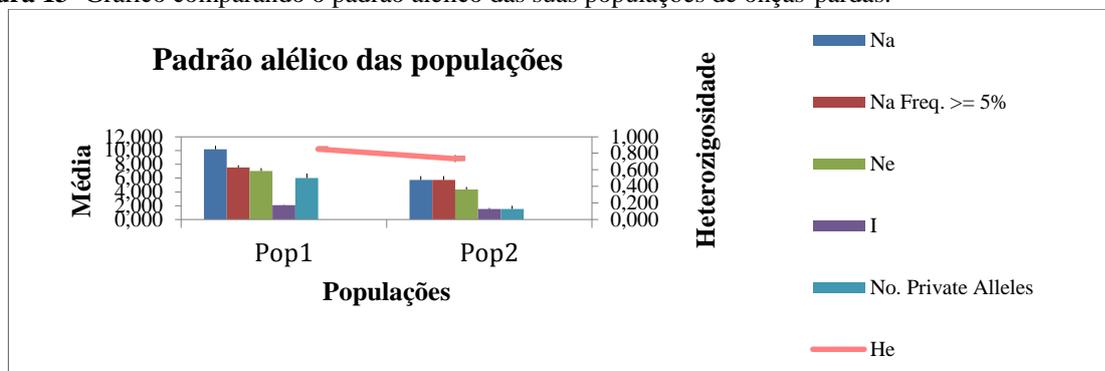
Tabela 9- Distribuição da variação genética dentro e entre as populações de acordo com a AMOVA.

Origem da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	1,6	0,03	4,58
Dentro das populações	39,4	0,81	95,42
Total	40,640	0,85	-

Para concluir, as diferenças dos padrões alélicos foram observadas segundo o número de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), número de alelos privados e heterozigidade esperada (H_e) (Figura 28). Como pode ser visualizado, a população da Serra do Mar e da Serra

da Mantiqueira apresentou um maior número de alelos, uma maior heterozigotidade e um maior número de alelos privados, quando comparada a população do Parque Nacional do Iguaçu.

Figura 13- Gráfico comparando o padrão alélico das suas populações de onças-pardas.



4.3.3. Diversidade genética e parentesco

Anteriormente às análises de diversidade, foram estimados os erros de genotipagem e detectamos que na população da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira praticamente todos os locos apresentaram alelo nulo (exceção loco B010 e C108). Enquanto que na população do PNI, a maioria dos locos não possuíram erros de genotipagem (exceção dos locos A216, B003 e B316).

Os dados gerais de diversidade genética por loco nas duas populações foram avaliados (Tabela 10). De acordo com os resultados, a população da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira possui maior diversidade ($N_a = 10$; $H_e = 0,891$; $RA = 5,537$; e $DG = 0,899$) comparada a população do PNI ($N_a = 5$; $H_e = 0,844$; $RA = 4,733$; e $DG = 0,867$). Como a riqueza alélica (RA) e as estimativas de diversidade gênica (DG) são independentes do número amostral, a menor diversidade encontrada no Iguaçu é corroborada. Nenhum loco se encontrou em desequilíbrio de Hardy-Weinberg e nenhum dos pares de locos estão em desequilíbrio de ligação em nenhuma das populações. O PIC dos locos de microsatélites variou de 0,789 (B303) a 0,878 (A339 e B003), com uma média de 0,842.

O N_e encontrado para a população da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira foi de 121 indivíduos (99% de certeza), entretanto, no Iguaçu não foi possível calcular. Um recente gargalo genético populacional foi detectado na primeira população ($p = 0,009$), mas não na população do Iguaçu ($p = 0,700$).

Tabela 10- Estimativas de diversidade genética de 25 indivíduos de onças-pardas de duas populações baseado em 11 locos de microssatélites polimórficos.

Populações	Loco	N	Na	Ne	Ho	He	DG	RA	P (<i>F_{IS}</i>)
Serra do Mar e Serra da Mantiqueira	A106	16	10	5,818	0,438	0,855	0,869	5,193	0,002
	A208	18	8	5,400	0,611	0,838	0,845	4,830	0,032
	A216	18	8	5,891	0,333	0,854	0,869	5,040	0,002
	A339	17	11	8,377	0,529	0,907	0,919	5,824	0,002
	B003	16	10	8,000	0,375	0,903	0,921	5,733	0,002
	B010	14	13	9,800	0,857	0,931	0,934	6,328	0,272
	B210	17	9	7,506	0,706	0,893	0,899	5,537	0,022
	C108	16	9	4,830	0,625	0,819	0,825	4,638	0,040
	B303	15	12	7,500	0,533	0,897	0,910	5,812	0,002
	B316	16	11	7,314	0,375	0,891	0,908	5,609	0,002
C112	17	11	6,721	0,588	0,877	0,886	5,490	0,002	
Média		16	10	7,314	0,533	0,891	0,899	5,537	-
Iguaçu	A106	4	4	3,556	1,000	0,821	0,792	4,000	0,447
	A208	7	8	4,261	0,571	0,824	0,845	5,263	0,038
	A216	6	5	4,800	0,333	0,864	0,917	4,691	0,009
	A339	5	6	5,000	0,600	0,889	0,925	5,356	0,140
	B003	7	9	6,533	0,571	0,912	0,940	6,084	0,020
	B010	5	6	4,167	0,800	0,844	0,850	5,178	0,647
	B210	6	5	4,235	0,500	0,833	0,867	4,465	0,061
	C108	7	8	5,765	0,857	0,890	0,893	5,622	0,590
	B303	5	3	1,515	0,400	0,378	0,375	2,600	0,911
	B316	5	5	4,545	0,200	0,867	0,950	4,733	0,002
C112	5	4	3,333	0,600	0,778	0,800	3,778	0,318	
Média		5	5	4,261	0,571	0,844	0,867	4,733	-

N: número de indivíduos analisados; Na: número de alelos; Ne: número efetivo de alelos; Ho: Heterozigosidade observada; He: Heterozigosidade esperada; DG: diversidade gênica; RA: riqueza alélica; e P (*F_{IS}*): valor de P do coeficiente de endogamia.

A PE encontrada apresentou 99% de confiança. O relacionamento de parentesco sugerido no programa ML Relate não detectou alelos nulos em nenhum dos locos e concluiu que nenhum dos pares de indivíduos dentro de uma mesma UC são relacionados. Os valores de parentesco (*r*) e as prováveis categorias de relacionamento entre os indivíduos em cada uma das populações (Tabelas 11 e 12) indicam que ambas as populações apresentam predominância de indivíduos não relacionados.

Tabela 11- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-parda da população da Serra do Mar.

	SB1	SB12	SB15	PNC4	CB6	CB10	CB21	CB28	I22	I24	I25	SM4	SM9	J14	J18	J19	J122	J124
SB1	-	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
SB12	0.06	-	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
SB15	0.00	0.00	-	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
PNC4	0.00	0.09	0.00	-	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
CB6	0.00	0.00	0.00	0.00	-	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
CB10	0.01	0.00	0.00	0.00	0.18	-	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
CB21	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.19	-	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
CB28	0.00	0.00	0.31	0.00	0.14	0.00	0.00	-	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U
I22	0.00	0.00	0.13	0.00	0.04	0.00	0.00	0.13	-	U	U	U	U	U	U	U	U	U
I24	0.08	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00	0.15	0.00	-	U	U	U	U	U	U	U	U
I25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.03	0.00	0.00	0.00	0.12	-	U	U	U	U	U	U	U
SM4	0.00	0.00	0.00	0.08	0.05	0.00	0.00	0.13	0.00	0.01	0.00	-	U	HS	U	U	U	U
SM9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.11	-	U	U	U	U	U
J14	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	-	HS	U	U	U
J18	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.14	0.31	-	U	U	U
J19	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	U	U
J122	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	HS
J124	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	-

As cores estão demonstrando o grau de relacionamento entre os pares de indivíduos, sendo que quanto mais escuro são o quadrado, maior o relacionamento. FS: irmãos completos; HS: meios-irmãos e U: não relacionados.

Na população do PNI nenhum dos pares de indivíduos são relacionados, enquanto que na população da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira foram visualizadas alguns pares de indivíduos meios-irmãos (HS), inclusive entre divergentes UCs.

Tabela 12- Valores de r e supostas categorias de relacionamentos entre os indivíduos de onça-parda da população do PNI.

	NI11	NI20	NI48	NI49	NI56	NI77	NI89
NI11	-	U	U	U	U	U	U
NI20	0.00	-	U	U	U	U	U
NI48	0.05	0.00	-	U	U	U	U
NI49	0.00	0.00	0.02	-	U	U	U
NI56	0.00	0.00	0.00	0.00	-	U	U
NI77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	U
NI89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-

As cores estão demonstrando o grau de relacionamento entre os pares de indivíduos, sendo que quanto mais escuro são o quadrado, maior o relacionamento. FS: irmãos completos; e U: não relacionados.

5. DISCUSSÃO

A detecção de amostras de fezes de felinos de boa qualidade, assim como a aplicação de técnicas moleculares em tais amostras, pode ser extremamente difíceis devido à alta degradação sofrida pelo material. Isso, devido a intensa exposição da amostra no ambiente, com altas temperaturas, umidade e calor excessivo, fatores que reduzem a qualidade e a quantidade

do material genético (FARREL; ROMAN; SUNQUIST, 2000). Estes problemas são ampliados quando se trabalha em ambientes tropicais, onde as amostras fecais se decompõem muito mais rapidamente devido aos insetos e às chuvas (MICHALSKI et al., 2011, ROQUES et al., 2014), sem mencionar na dificuldade de visualização das amostras em meio às folhagens caídas nas trilhas.

As áreas incluídas neste estudo abrangem os maiores remanescentes da Mata Atlântica e um dos últimos ambientes saudáveis no bioma para as espécies de onças. Além disso, estes remanescentes possuem a mais alta prioridade na conservação dessas espécies de topo (ZELLER, 2007) e corredores ligando tais fragmentos já foram sugeridos como forma de aumentar a chance de persistência dessas espécies a longo prazo, especialmente no caso das onças-pintadas (RABINOWITZ; ZELLER, 2010).

A sequência do gene ATP6 analisado foi de 83pb, tamanho suficiente para diferenciar entre as espécies de onças, com alta confiabilidade, como pode ser visto pelos valores obtidos de *bootstrap* (Figura 8). Entre as espécies, nesta pequena sequência, foram observados dez sítios de diferenciação. A porcentagem de sucesso na amplificação do gene mitocondrial ATP6 (74%) foi similar à de outros trabalhos com amostras não invasivas de felinos (71%, MICHALSKI et al., 2011; 84,4%, SRBEK-ARAÚJO, 2013).

Considerando as amostras de onças identificadas: 21% foram de onças-pintadas e 38% de onças-pardas. Essas porcentagens são um reflexo da especificidade no momento da coleta, por amostras de felinos de grande porte (provavelmente deixadas por onças), realizado pelos colaboradores. Apesar disso, amostras de pequenos felinos também foram detectadas em uma porcentagem de 41%. Algumas amostras definidas neste trabalho como originárias de pequenos felinos, foram identificadas morfológicamente no momento da coleta como de grandes felinos (onças). Esta incongruência entre a identificação morfológica e genética destaca a necessidade em se realizar análises genéticas para a confirmação da espécie (MIOTTO et al., 2007), especialmente no caso dos felinos, já que há sobreposição no tamanho das amostras fecais (FARREL; ROMAN; SUNQUIST, 2000).

Em geral, havia registros prévios da presença destes felinos nas Unidades de Conservação estudadas, como, por exemplo: de onça-parda no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (NUNES et al., 2013) e no Parque Estadual da Serra do Mar (ROCHA-MENDES et al., 2015); das duas onças na Estação Ecológica Juréia-Itatins (MARTINS et al., 2014), no Parque Estadual Intervalas (DE VIVO et al., 2001), no Parque Estadual Carlos Botelho (BEISIEGEL, 2010) e no Parque Nacional do Iguaçu (CONFORTI; AZEVEDO, 2003).

No PESB foram identificadas apenas onças-pardas e não onças-pintadas neste trabalho, em concordância com estudos prévios. A ausência desta espécie no parque já havia sido sugerida (NUNES et al., 2013) e pode ser explicada pela intensa caça que foi acometida anteriormente na área (PERES, 2006), pela incapacidade do parque em manter um predador desse porte (área preservada pequena e fina) e pelo elevado grau de distúrbio antropogênico encontrado no entorno da Unidade (NUNES et al., 2013). Já a detecção de três onças-pintadas (duas fêmeas e um macho) no Núcleo Santa Virgínia do PESH, permitiu confirmar a presença da espécie no local, já que até então havia evidência de sua presença apenas por meio de entrevistas de moradores locais (ROCHA-MENDES et al., 2015). Inúmeras tentativas em se detectar a espécie na área já haviam sido realizadas a partir de câmeras fotográficas e armadilhas de captura (Peter Crawshaw, comunicação pessoal). A presença deste predador no Núcleo aumenta a importância da UC (GALETTI et al., 2009; ROCHA-MENDES et al., 2015), especialmente pela presença de uma fêmea, o que pode estar gerando um equilíbrio na cadeia alimentar local e aumentando a qualidade de todo o bioma.

Por este trabalho utilizar amostras não invasivas, foram incluídos vários fatores com a intenção de diminuir a probabilidade de ocorrência de erros de genotipagem e aumentar o sucesso da amplificação, como, por exemplo: o uso de *kit* de extração específico para o tipo de amostra, padronização *a priori* dos *primers* utilizados, suficientes réplicas para confirmar a amplificação nos genes mitocondriais e nos locos de microssatélites, e a inclusão de amostras e locos com, no mínimo, 70% de sucesso (BEJA-PEREIRA et al., 2009). Apesar disso, houve ocorrência de erros de genotipagem, com o aparecimento de alelos *dropout* (0,045 nas onças-pintadas e 0,038 nas onças-pintadas) e falsos alelos (0,037 nas onças-pintadas e 0,051 nas onças-pardas), em uma taxa reduzida. Todavia, os resultados de probabilidade de identidade ($P_{IDunbias}=0,00232$ e $P_{IDSibs}=0,0521$ em onça-pintada e $P_{IDunbias}=0,00189$ e $P_{IDSibs}=0,0453$ em onças-pardas) nas duas espécies mostraram que nosso painel de microssatélites foi suficiente para discriminar com confiança entre os diferentes indivíduos.

O emprego de DNA fecal com o intuito de determinar tamanhos mínimos populacionais e a razão sexual em carnívoros, já foi empregada em alguns estudos (MIOTTO et al., 2007; PEREZ et al., 2006; PRUGH et al., 2005; SRBEK-ARAÚJO, 2013). Neste trabalho foi possível identificar a ocorrência de pelos menos 19 onças-pintadas e de 25 onças-pardas em remanescentes de Mata Atlântica costeira e de interior. Na onça-pintada havia estimativas de que nos remanescentes de Mata Atlântica existam entre 156 a 180 indivíduos (BEISIEGEL; SANA; MORAES, 2012; CULLEN et al., 2005; LEITE et al., 2002), com 31-51 animais só no

contínuo da Serra do Mar (BEISIEGEL; SANA; MORAES, 2012). No Corredor Verde, onde se situa o PNI, foi estimado existir entre 23 a 25 onças-pintadas adultas, o que foi considerado extremamente baixo (PAVIOLO et al., 2008), sendo sugerido um declínio da espécie na área, desde o início de 1900 (CRAWSHAW, 1995; CULLEN et al., 2005). Esse trabalho, detectou a presença de sete indivíduos de onças-pintadas neste mesmo parque. Em outros biomas também foram detectados números mínimos de onças-pintadas, sendo estimado 16 indivíduos em fragmentos do Cerrado e 14 no Pantanal (ROQUES et al., 2014). No caso da onça-parda, anteriormente já haviam sido detectados 12 indivíduos (7F: 5M) no Núcleo Santa Virgínia do PESM (MARTINS, 2011), sendo que neste trabalho foram detectados apenas dois machos. Na Mata Atlântica de interior no Sul do país haviam sido estimadas 37 onças-pardas (16M: 21F) (CASTILHO et al., 2012) e no interior do estado de São Paulo (Estação Ecológica de Caetetus), seis animais, dois machos e quatro fêmeas (SARANHOLI, 2013). Em pequenas Unidades de Conservação de Cerrado e extremamente impactadas no interior do estado de São Paulo (Estação Ecológica de Jataí, Parque Estadual do Vassununga, Estação Ecológica de Itirapina e Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade) foram previamente estimados 37 indivíduos da espécie (15 machos e 22 fêmeas).

Em relação ao sucesso na amplificação dos *primers* de sexagem, houve um aproveitamento de 100% neste estudo, em ambas as espécies, um valor superior ao obtido com o mesmo par de *primers* em onças-pintadas no Pantanal (73%) e na Caatinga (96%) (ROQUES et al., 2014). Pode ser notado também que indivíduos recapturados de ambas as espécies foram predominantemente machos, o que não era almejado de acordo com as características biológicas das espécies, em que as fêmeas permanecem restritas na área, enquanto os machos exibem maior capacidade de dispersão (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004).

Os resultados encontrados nas análises de estruturação sugerem que há mais de um grupo sendo representado pelos indivíduos de ambas as espécies, uma população diferenciada no Parque Nacional do Iguaçu e outra no contínuo da Serra do Mar (e na Serra da Mantiqueira, no caso das onças-pardas). Esse impedimento ao fluxo gênico entre o Iguaçu (Mata Atlântica de interior) e o contínuo da Serra do Mar (Mata Atlântica costeira), pode ser explicado pela intensa fragmentação na área e das diversas atividades antrópicas, fatores que afetam enormemente o deslocamento dessas espécies, especialmente, das onças-pintadas. No entanto, a presença de indivíduos compartilhando alelos e a frequência de relacionamento genético entre pares de indivíduos de diferentes populações, podem ser também resultado de uma herança de alelos ancestrais e não um bloqueio atual de fluxo gênico entre esses remanescentes.

De qualquer maneira, a diferenciação entre as duas populações detectadas parece ser mais branda na onça-parda, o que pode ser devido a capacidade desse felino se deslocar por ambientes fragmentados (PALMEIRA et al., 2008), enquanto que as onças-pintadas preferem se manter em ambientes menos depredados (SILVEIRA, 2004). Todavia, esse menor impacto observado nas onças-pardas pode estar sendo mal interpretado, já que as populações podem estar sofrendo uma maior redução populacional e isolamento, porém, ainda não pôde ser observado a partir dos locos de microssatélites.

A presença de indivíduos migrantes e misturados foram amplamente detectados nas populações de onças-pardas, além da ocorrência de pares de indivíduos predominantemente não relacionados dentro das populações, o que contrasta os resultados anteriores observados na espécie (MIOTO et al., 2011). Todos estes resultados parecem mostrar que está sendo mantido algum fluxo gênico entre as populações, preservando indivíduos misturados, migrantes e não relacionados, provavelmente devido a característica “plástica” da espécie (em relação ao ambiente e a alimentação), além da enorme capacidade de deslocamento, principalmente, dos machos jovens (LOGAN; SWEANOR, 2001). As onças-pardas parecem estar se movimentando através da paisagem e se reproduzindo em novas áreas, pelo menos em um passado próximo, mantendo algum fluxo gênico entre as populações, mesmo de fragmentos distantes. A presença de até quatro onças-pardas migrantes por década, dentro de pequenas populações, foi indicada como responsáveis por prevenir a estocasticidade ambiental e demográfica, aumentando a probabilidade de persistência das populações (BEIER, 1993).

Nas populações de onças-pintadas foram detectados indivíduos com compartilhamento de alelos e pares de animais com relacionamento genético (inclusive irmãos-completos), mesmo entre diferentes UCs. Estes resultados podem estar indicando uma restrição ao fluxo gênico das populações remanescentes, gerando um isolamento das populações e consecutiva diminuição do número de migrantes e aumento de endocruzamento. Provavelmente a espécie não possui capacidade de se deslocar entre uma população (contínuo da Serra do Mar) e outra (Iguaçu), devido a distância e a falta de ambientes saudáveis entre as áreas para que o animal de desloque.

Uma alta diversidade genética foi encontrada nas populações de onças-pintadas (pop1: $N_a = 7,6$ e $H_e = 0,759$; pop2: $N_a = 4,2$ e $H_e = 0,589$), de acordo com resultados prévios ($N_a = 8,31$ e $H_e = 0,724$, EIZIRIK et al., 2001; $N_a = 11,3$ e $H_e = 0,846$, RUIZ-GARCIA et al., 2006; $N_a = 7,23$ e $H_e = 0,732$, HAAG et al., 2010; $N_a = 4-13$, $H_e = 0,50-0,92$, ROQUES et al., 2014; $N_a = 3,45$, $H_e = 0,532$). Na onça-parda, também foi evidenciado uma alta diversidade genética

(pop1: Na = 10 e He = 0,891; pop2: Na = 5 e He = 0,844). Esta alta diversidade genética encontrada na espécie parece ser uma característica intrínseca, já que foi descrita em outros trabalhos, inclusive na Mata Atlântica (Na = 10 e He = 0,79, MIOTTO et al., 2011; Na = 5,89 e He = 0,681, CASTILHO et al., 2012; Na = 5,2 e He = 0,740, SARANHOLI, 2013). No entanto, comparações rigorosas podem ser realizadas apenas na onça-pintada em relação a alguns trabalhos que utilizaram o mesmo painel de locos de microssatélites (HAAG et al., 2010; SRBEK-ARAUJO, 2013; VALDEZ et al., 2015). Os valores médios de PIC (conteúdo de informação polimórfica) em ambas as espécies classificaram nosso painel de microssatélites como altamente polimórficos (0,7585 em onças-pintadas e 0,842 de onças-pardas).

Quando comparamos a diversidade genética entre as espécies, fica evidente a menor diversidade encontrada nas populações de onça-pintada. Este fato acrescenta indícios à forte estruturação encontrada na espécie, já que uma menor diversidade genética pode estar vinculada ao isolamento de pequenas populações e consecutivamente, maior incidência de deriva e relacionamento entre indivíduos parentes, como pôde ser constatado nesse trabalho. Além disso, as populações de felinos do Iguazu, apresentaram menor diversidade genética, mesmo quando são examinados apenas fatores independentes do número amostral (riqueza alélica e diversidade gênica).

As estimativas do número efetivo populacional indicaram 121 onças-pardas na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira, além de 27,9 onças-pintadas no contínuo da Serra do Mar e 14,2 indivíduos no PNI. No entanto, o número de indivíduos efetivos detectados só é superior ao sugerido (50 indivíduos) para se evitar a depressão endogâmica a curto prazo, nas populações de onças-pardas (FRANKLIN, 1980; HAAG et al., 2010). Indícios de redução populacional e de fluxo gênico entre populações de onças-pintadas foi identificado também em outros biomas, como por exemplo, na Caatinga e no Pantanal (ROQUES et al., 2014).

As porcentagens de 99% de probabilidade de exclusão indicaram que os locos são confiáveis para as análises de parentesco. A predominância de indivíduos não relacionados dentro das UCs sugerem que a endogamia ainda não é um fator determinante nessas populações. Isso porque, pequenas populações frequentemente abrigam indivíduos relacionados (ROQUES et al., 2014), devido a maior incidência dos efeitos da deriva genética nessas populações (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002). A onça-pintada, diferentemente da onça-parda, apresentou pares de indivíduos altamente relacionados dentro da mesma UC, o que sugere uma maior taxa de endogamia nessas populações e uma maior preocupação em relação aos tamanhos

populacionais e isolamento dos indivíduos dessa espécie. Todavia, tais indivíduos altamente relacionados também podem ser jovens.

Para a onça-pintada, os indivíduos do contínuo da Serra do Mar parecem estar mais relacionados entre eles, inclusive um par de indivíduos meios-irmãos entre diferentes de diferentes UCs (SM12-I6). Esse maior grau de parentesco entre os indivíduos da Serra do Mar pode ser explicado pela maior capacidade de deslocamento no contínuo e manter fluxo gênico com indivíduos mais distantes de sua área de vida. A estruturação apresentada pelas populações de onças-pintadas, assim como a detecção de apenas um migrante (ou compartilhamento alélico histórico) e a presença de indivíduos irmãos completos e meios-irmãos, em ambas as populações, sugerem um baixo índice de fluxo gênico entre os remanescentes de Mata Atlântica costeira (contínuo da Serra do Mar) e de interior (Iguaçu), aumentando o grau de ameaça desse felino. Já na onça-parda, os resultados apontam para uma estruturação genética entre as populações, porém ainda parece existir algum fluxo gênico entre esses fragmentos, provavelmente devido a capacidade de deslocamento. Os migrantes detectados, a presença de indivíduos misturados e a prevalência de indivíduos não relacionados reforçam esse indício.

Um grande problema à persistência dessas espécies é que a maioria das áreas de distribuição são pequenas demais para sustentar uma população viável, ficando dependente de fluxo gênico para manter o seu potencial evolutivo (SOLLMANN et al., 2008). No entanto, o deslocamento dos indivíduos para manter um fluxo gênico parece estar sendo cada vez mais dificultado pela alta incidência da fragmentação e aumento de atividades antrópicas. Eizirik et al. (2002) enfatizaram que remanescentes populacionais dessas espécies, particularmente os da Mata Atlântica Costeira, têm uma probabilidade de extinção muito alta para as próximas décadas, ressaltando a emergência para a implementação de estratégias efetivas para sua conservação.

Os resultados, em geral, corroboram com as hipóteses elaboradas neste trabalho, o qual esperava que os indivíduos de onças-pardas de diferentes fragmentos de Mata Atlântica estivessem mantendo fluxo gênico entre eles, com a presença de indivíduos predominantemente não relacionados. Enquanto que na onça-pintada, por ser mais seletiva na escolha do ambiente, se esperava uma estruturação populacional, com indícios de diminuição do número de indivíduos e aumento na taxa de endogamia. Trabalhos prévios no Brasil com a onça-parda geralmente não detectam restrições ao fluxo gênico entre populações divergentes (CASTILHO et al., 2012; MIOTTO et al., 2011). Já uma estruturação populacional e indícios de restrições

ao fluxo gênico nas onças-pintadas já havia sido observada em estudos anteriores, até mesmo entre fragmentos mais próximos (HAAG et al., 2010).

Esses resultados demonstram a eficiência, importância e confiabilidade das análises genéticas não invasivas nessas espécies ainda pouco conhecidas, pela dificuldade na obtenção de informações. Dados genéticos dessas espécies, principalmente na Mata Atlântica costeira, eram inexistentes e as informações obtidas neste trabalho serão de grande valia para futuros monitoramentos populacionais desses felinos pouco acessados, e indispensáveis antes de se criar planos para a conservação e manejo dessas espécies. Análises genéticas como as realizadas neste estudo podem ser utilizadas em conjunto com outras metodologias rotineiramente empregadas nas espécies (câmeras fotográficas ou captura de indivíduos) para se obter dados biológicos e demográficos.

6. CONCLUSÕES

Esse estudo gerou dados demográficos, identificando 19 onças-pintadas (10 machos e 9 fêmeas) e 25 onças-pardas (9 machos e 16 fêmeas) nos maiores remanescentes de Mata Atlântica, predominantemente através de amostragem não invasiva.

Os resultados também apontam para uma estruturação genética populacional (entre a Mata Atlântica costeira e de interior) dos maiores predadores das Américas. No entanto, um maior grau de ameaça sobre a onça-pintada foi identificado nesse trabalho, que encontrou que as (últimas) populações da espécie apresentam forte estruturação genética, com indícios de baixo fluxo gênico entre os remanescentes (poucos indivíduos migrantes ou misturados, alto relacionamento entre os indivíduos). Nas onças-pardas também foi identificada estruturação genética (pouco evidenciada em trabalhos prévios), entretanto, com evidência de fluxo gênico entre os fragmentos (presença de indivíduos misturados e migrantes, predominância de indivíduos não relacionados e alta diversidade genética).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que os estudos populacionais em carnívoros selvagens elusivos, como as onças, podem ser realizados utilizando exclusivamente amostras não invasivas, com qualidade e confiabilidade comparáveis aos estudos genéticos invasivos. Apesar da maior dificuldade e do maior trabalho em se obter os resultados, esse tipo de abordagem deve ser escolhido por não necessitar do contato com os animais, principalmente, quando as espécies focos são elusivas e estão ameaçadas de extinção.

O estudo também ressalta o potencial da análise molecular em conjunto com a amostragem não invasiva, em se obter informações importantes sobre as populações das espécies, muitas delas impossíveis de serem obtidas de outro modo (em estudos ecológicos, por exemplo). Dados demográficos (tamanho mínimo populacional e sexo) e de distribuição da diversidade genética (estruturação, variabilidade e parentesco) contribuem não só como um dado local sobre os indivíduos estudados, mas também, pode ser expandido para outras populações da espécie ou outras espécies de carnívoros, que também habitam fragmentos de mata. Esse tipo de estudo tem a importante função de gerar dados populacionais cruciais para o desenvolvimento de estratégias efetivas para a conservação dessas espécies.

A implementação de mais áreas protegidas ou a extensão das existentes, além da instalação de corredores entre os fragmentos são uma das medidas mais importantes a serem efetuadas, com o intuito de manter populações viáveis desses predadores ao longo do tempo. Em último caso, a translocação de indivíduos e a reprodução assistida também podem ser necessários para suavizar os efeitos genéticos negativos do pequeno tamanho populacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAUGH, G.P.; IYENGAR, V.; LOHANI, A. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. **International Journal of Cancer**, 52: 347-350. 1992.
- ANDERSON, J.C.R.; LINDZEY, F.G.; MCDONALD, D.B. Genetic structure of cougar populations across the Wyoming Basin: metapopulation or megapopulation. **Journal of Mammalogy**, 85(6): 1207-1214. 2004.
- ANMARKRUD, J.A.; KLEVEN, O.; BACHMANN, L.; LIFJELD, J.T. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. **BMC Evolutionary Biology**, 8(1): 138. 2008.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2a edição, Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts. 2004.
- BEIER, P. Determining minimum habitat areas and habitat corridors for cougars. **Conservation Biology**, 7: 94–108. 1993.
- BEISIEGEL, B.M.; SANA, D.A.; MORAES Jr., E.A. The jaguar in the Atlantic Forest. **Cat News Special Issue**, 7: 14-18. 2012.
- BEJA-PEREIRA, A; OLIVEIRA, R; ALVES, PC; SCHWARTZ, MK; LUIKART, G. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources**, 9: 1279–1301. 2009.
- BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. **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). 2004.

- BELLEMAIN, E.; SWENSON, J.E.; TALLMON, D.; BRUNBERG, S.; TABERLET, P. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. **Conservation Biology**, 19(1): 150-161. 2005.
- BRASIL. Espécies ameaçadas de extinção no Brasil. Livro Vermelho. Volume II. 2014. MMA & ICMBio. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/livro-vermelho>. Acesso em 06/07/2015.
- BUCHAN, J.C.; ARCHIE, E.A.; HOM, R.C.V.; MOSS, C.J.; ALBERTS, S.C. Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. **Molecular Ecology Notes**, 5: 680-683. 2005.
- CASTILHO, C.S.; MARINS-SÁ, L.G.; BENEDET, R.C.; FREITAS, T.R.O. Genetic structure and conservation of Mountain Lions in the South-Brazilian Atlantic Rain Forest. **Genetics and Molecular Biology**, 35(1): 65-73. 2012.
- CAVALCANTI, S.M.C.; GESE, E.M. Spatial ecology and social interactions of jaguars (*Panthera onca*) in the southern Pantanal, Brazil. **Journal of Mammalogy**, 90: 935-45. 2009.
- CHAME, M. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98 (1): 71-94. 2003.
- CHAVES, P.B.; GRAEFF, V.G.; LION, M.B.; OLIVEIRA, L.R. e EIZIRIK, E. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology Resources**, 12 (1): 18-35. 2012.
- CHIARELLO, A.G.; AGUIAR, L.M.S.; CERQUEIRA, R.; MELO, F.R.; RODRIGUES, F.H.G.; SILVA, V.M. **Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil**. In: Angelo Machado, B.M. Gláucia Drommond M. Adriano Paglia P. (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, 1 ed. Belo Horizonte, MG: Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas, 2: 681-702. 2008.
- CHIVIAN, E. **Biodiversity: its importance to human health**. In: CHIVIAN, E. (Ed.). Harvard Medical School, Boston. Ed., cap. 1 "Biodiversity", 6-12. 2002
- 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**, 111(2): 215-221. 2003.
- CORANDER, J.; SIRÉN, J.; ARJAS, E. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. **Computational Statistics**, 23: 111-129. 2008.
- CORANDER, J.; WALMANN, P.; SILLANPAA, M.J. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. **Genetics**, 163: 367-374. 2003.
- CORANDER, J.; WALMANN, P.; SMARTTINEN, P.; SILLANPAA, M.J. BAPS2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. **Bioinformatics**, 20: 2363-2369. 2004.
- CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, 144(4): 2001-2014. 1996.
- CRAWFORD, N.G. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. **Molecular Ecology Resources**, 10.3: 556-557. 2010.
- CROOKS, K.R. Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. **Conservation Biology**, 16: 488-502. 2002.

- CULLEN, L.Jr.; ABREU, K.C.; SANA, D.; NAVA, A.F.D. Jaguars as landscape detectives for the upper Paraná River corridor, Brazil. **Natureza and Conservação**, 3: 43–58. 2005.
- CULVER, M.; JOHNSON, W.E.; PECON-SLATTERY, J.; O'BRIEN, S.J. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). **The American Genetic Association**, 91: 186-197. 2000.
- DAVISON, A.; BIRKS, J.D.S.; BROOKES, R.C.; BRAITHWAITE, T.C.; MESSENGER, J.E. On the origin of faeces: morphological versus molecular methods for surveying rare carnivores from their scats. **Journal of Zoology London**, 257: 141-143. 2002.
- DE VIVO, M.; CARMIGNOTTO, A.P.; GREGORIN, R.; HINGST-ZAHER, E.; IACK-XIMENES, G.E.; MIRETZKI, M.; PERCEQUILLO, A.R.; ROLLO, M.M.; ROSSI, R.V.; TADDEI, V.A. Checklist dos mamíferos do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropical**. 11(1a): [http:// www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/en/abstract?inventory+bn007110_1a2011](http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/en/abstract?inventory+bn007110_1a2011) (último acesso 07/07/2015). 2011.
- DEAGLE, B.E.; TOLLIT, D.J. Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces: potential to estimate diet composition? **Conservation Genetics**, 8: 743-747. 2007.
- EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4: 359–361. 2012.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, 19(4): 23-29. 1996.
- EIZIRIK, E.; HAAG, T.; SANTOS, A.S.; SALZANO, F.M.; SILVEIRA, L.; AZEVEDO, F.C.C.; FURTADO, M.M.F. **Jaguar Conservation Genetics**. CAT News Special Issue 4 - The Jaguar in Brazil. 2008.
- EIZIRIK, E.; INDRUSIAK, C.B.; JOHNSON, W.E. **Análisis de la viabilidad de poblaciones de jaguar: evaluación de parámetros y estudios de caso en tres poblaciones remanentes del sur de Sudamérica**. In: MEDELLÍN, R.A.; CHETKIEWICZ, C.; RABINOWITZ, A.; REDFORD, K.H.; ROBINSON, J.G.; SANDERSON, E. & TABER, A. (Org.). 2002. El jaguar en el nuevo milenio: una evaluación de su condición actual, historia natural y prioridades para su conservación. Mexico, D.F.: Prensa de la Universidad Nacional Autónoma de México / Wildlife Conservation. 501-518. 2002.
- EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; MENOTTI-RAYMOND, M.; CRAWSHAW, P.G.; O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, 10: 67-79. 2001.
- EIZIRIK, E.; YUHKI, N.; JOHNSON, W.E.; MENOTTI-RAYMOND, M.; HANNAH, S.S.; O'BRIEN, S.J. Molecular Genetics and Evolution of Melanism in the Cat Family. **Current Biology**, 13.5 (4): 448–453. 2003.
- EMMONS, L.H. Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 20: 271–83. 1987.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14: 2611–2620. 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology Resources**, 10(3): 564-567. 2010.

- FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Reviews in Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 487–515. 2003.
- FARREL, L.E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M.E. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9: 1583-1590. 2000.
- FERRAZ, K.M.P.M.B.; BEISIEGEL, B.M.; PAULA, R.C.; SANA, D.A.; CAMPOS, C.B.; OLIVEIRA, T.G.; DESBIEZ, A.L.J. How species distribution models can improve cat conservation - jaguars in Brazil. *Cat News Special Issue*, 7: 38-42. 2012.
- FISCHER, J.; LINDENMAYER, D.B. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography*, 16: 265-280. 2007.
- FRANKHAM, R; BALLOU, JD; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press, Cambridge. 2002.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126: 131-140. 2005.
- FRANKLIN, I.R. **Evolutionary change in small populations**. In: Soulé ME and Wilcox BA (eds) *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer, Sunderland, 135-150. 1980.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Disponível em: <https://www.sosma.org.br>. Acesso em 3 de julho, 2015.
- GALETTI, M; GIACOMINI, HC; BUENO, RS; BERNARDO, CSS; MARQUES, RM; BOVENDORP, RS; STEFFLER, CE; RUBIM, P; GOBBO, SK; DONATTI, CI; BEGOTTI, RA; MEIRELLES, F; NOBRE, RA; CHIARELLO, AG; PERES, CA. 2009. Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. *Biological Conservation*, 142: 1229-1241. 2009.
- GALETTI, M.; DIRZO, R. Ecological and evolutionary consequences of living in a defaunated world. *Biological Conservation*, 163:1-6. 2013.
- GINSBERG, J. **Setting priorities for carnivore conservation: what makes carnivores different?** In: Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D., Wayne, R.K. (Eds.), *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 498–523. 2001.
- GITTLEMAN, J.L.; FUNK, S.M.; MACDONALD, D.W.; WAYNE, R.K. **Carnivore Conservation**. Cambridge: Cambridge University Press. 690. 2001.
- GITTLEMAN, JL. **Carnivore Behaviour, Ecology and Evolution**. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1989.
- GOLDSTEIN, D.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, New York, 368. 1999.
- GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D. Launching microsatellites: a review of mutation process and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88: 335-342. 1997.
- GOTTELLI, D.; WANGH, J.; BASHIR, S.; DURANT, S.M. Genetic analysis reveals promiscuity among female cheetahs. *Proc R Soc B*, Published online. 2007.
- GOUDET, J. FSTAT (version 1.2.): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486. 1995.
- GRIGIONE, M.M.; MENKE, K.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, C.; LIST, R.; BANDA A.; CARRERA, J.; CARRERA, R.; GIORDANO, A.J.; MORRISON, J.; STERNBERG, M.; THOMAS, R.; VAN PELT, B. Identifying potential conservation areas for felids in the USA

and Mexico: integrating reliable knowledge across an international border. *Fauna & Flora International*, **Oryx**, 43(1), 78–86. 2009.

HAAH, T.; SANTOS, A.S.; SANA, D.A.; MORATO, R.G.; CULLEN, Jr.L.; CRAWSHAW, Jr.P.G.; DE ANGELO, C.; DI BITETTI, M.S.; SALZANO, F.M.; EIZIRIK, E. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). **Molecular Ecology**, 19 (22): 4906-4921. 2010.

HEDMARK, E.; FLAGSTAD, Ø.; SEGERSTRÖM, P.; et al. DNA-based individual and sex identification from wolverine (*Gulo gulo*) faeces and urine. **Conservation Genetics**, 5: 405–410. 2004.

HELLER, R.; SIEGISMUND, H.R. Relationship between three measures of genetic differentiation GST, DEST and G'ST: how wrong have we been? **Molecular Ecology**, 18(10): 2080-2083. 2009.

HILL, W.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetical Research**, 38(3): 209-216. 1981.

HOFFMAN, J.I.; AMOS W. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources e consequences for paternal exclusion. **Molecular Ecology**, 14: 599–612. 2005.

INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE (IUCN) 2014. **Red list of threatened species**. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/news/biodiversity-crisis> Acesso em: 14/05/2015.

JOHNSON, W.E.; EIZIRIK, E.; ROELKE-PARKER, M.; O'BRIEN, S.J. **Applications of genetic concepts e molecular methods to carnivore conservation**. In: Gittleman JL, Funk SM, MacDonald D and Wayne RK (eds) *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, 335-358. 2001.

JOST, J. **Riemannian geometry and geometric analysis**. Springer Science & Business Media, 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**, 16(5): 1099-1106. 2007.

KALINOWSKI, S.T.; WAGNER, A.P.; TAPER, M.L. ML- Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**, 6(2): 576-579. 2006.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends Genetics**, 13: 74-77. 1997.

KASS, R.E.; RAFTERY, A.E. Bayes factors. **Journal of the American Statistical Association**, 90: 773–795. 1995.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12): 1647-1649, 2012.

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

KOHN, M.H.; WAYNE, R.K. Facts from feces revisited. **Tree**, 12: 223-227. 1997.

- KOHN, M.H.; YORK, E.C.; KAMRADT, D.A.; HAUGHT, G.; SAUVAJOT, R.M.; WAYNE, R.K. Estimating population size by genotyping faeces. **Pathological Royal Society London**, 266: 657-663. 1999.
- KONOVALOV, D.A.; HEG, D.I.K. TECHNICAL ADVANCES: A maximum-likelihood relatedness estimator allowing for negative relatedness values. **Molecular Ecology Resources**, 8(2): 256-263. 2008.
- KUROSA, N.; MASUDA, R.; TATARA, M. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric Carnivores: a noninvasive method for conservation on the Tsushima Islands, Japan. **Journal of Heredity**, 96: 688–697. 2005.
- KURUSHIMA, J.A.; JENNIFER, D.; COLLINS, J.A.W.; HOLLY B.E. Development of 21 microsatellite loci for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. **Molecular Ecology Notes**, 6: 1260-1262. 2006.
- LAGOS, A.R.; MULLER, B.L.A. Hotspot Brasileiro – Mata Atlântica. **Saúde e Ambiente em Revista**, 2(2): 35-45. 2007.
- LARSON, S.E. Taxonomic re-evaluation of the jaguar. **Zoo Biology**, 16, 107–120. 1997.
- LAWTON, J.H.; MAY, R.M. **Extinction Rates**. Oxford: Ed. Oxford Univ. Press, 248. 1995.
- LEHMANN, L.; PERRIN, N. On metapopulation resistance to drift and extinction. **Ecology**, 87, 1844–1855. 2006.
- LEITE, M.R.P.; BOULHOSA, R.L.P.; GALVÃO, F.; CULLEN, L. **Conservación del jaguar en las áreas protegidas del bosque atlántico de la costa de Brasil**. In R.A. Medellín, C. Equihua, C. L. B. Chetkiewicz, et al. (eds.), *El Jaguar en el Nuevo Milenio*, 25–42. Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México and Wildlife Conservation Society, Mexico City, Mexico. 2002.
- LIVIA, L.; FRANCESCA, V.; ANTONELLA, P. et al. A PCR-RFLP method on faecal samples to distinguish *Martes martes*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes*. **Conservation Genetics**, 8: 757–759. 2007.
- LOGAN, K.A.; SWEANOR, L.L. **Desert Puma: evolutionary ecology and conservation of an enduring carnivore**. Island Press, Washington. 2001.
- LUIKART, G.; CORNUET, J. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation biology**, 12(1): 228-237. 1998.
- LUIKART, G.; SHERWIN, W.B.; STEELE, B.M.; ALLENDORF, F.W. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. **Molecular Ecology**, 7(8): 963-974. 1998.
- MACDONALD, D.W.; ANDREW J. LOVERIDGE. **Biology and Conservation of Wild Felids**. Oxford University Press Inc., New York. 2010.
- MANEL, S.; SCHWARTZ, M.K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, 18: 189–197. 2003.
- MARTINS, R.; DIAS, M.L.; HABIB, M.E.E.M. Avaliação de uma passagem inferior de fauna na rodovia SP-55, no litoral sul de São Paulo, Brasil. **UNISANTA BioScience**, 3(3): 154 -163. 2014.

- MAURO, R.A.; SANTOS, J.C.C.; SILVA, M.P.; DELORME, J.P. **Manejo de Fauna em área de conservação**. In: Áreas Protegidas: Conservação no Âmbito do cone Sul. Pelotas, 223. 2003.
- MCNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.V.; MITTERMEIER, R.A.; WEMER, T.B. **Conserving the world's biological diversity**. IUCN, Gland, Switzerland. 1990.
- MENOTTI-RAYMOND, M.M.; DAVID, V.A.; LYONS, L.A. et al. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). **Genomics**, 57: 9–23. 1999.
- MENOTTI-RAYMOND, M.M.; DAVID, V.A.; WACHTER, L.L.; BUTLER, J.M.; O'BRIEN, S.J. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. **Journal Forensic Science Society**, 50: 1061–1070. 2005.
- MICHALSKI, F.; VALDEZ, F.V.; NORRIS, D.; ZIEMINSKI, C.; KASHIVAKURA, C.K.; TRINCA, C.S.; SMITH, H.B.; VYNNE, C.; WASSER, S.K.; METZGER, J.P.; EIZIRIK, E. Successful carnivore identification with faecal DNA across a fragmented Amazonian landscape. **Molecular Ecology Resources**, 11: 862–871. 2011.
- MIOTTO, R.A.; CERVINI, M.; FIGUEIREDO, M.G.; BEGOTTI, R.A.; GALETTI Jr., P.M. Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. **Conservation Genetics**, 12(6): 1447-1455. 2011.
- MIOTTO, R.A.; RODRIGUES, F.P.; CIOCHETI, G.; GALETTI Jr., P.M. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through faecal DNA analysis in two protected cerrado areas in the Brazilian southeast. **Biotropica**, 39, 647–654. 2007.
- MIRANDA, E.E.De. **Natureza, conservação e cultura: Ensaio sobre a relação do homem com a natureza no Brasil**. São Paulo: Metalivros, 179. 2003.
- MOREIRA, N.; MONTEIRO, E.L.A.; MORAES, W.; BROWN, J.L.; GRAHAM, L.H.; WILDT, D.E.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; SWANSON, W.F. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biol**, 20:103-116. 2001.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-845. 2000.
- NAIDU, A.; SMYTHE, L.A.; THOMPSON, R.W.; CULVER, M. Genetic analysis of scats reveals minimum number and sex of recently documented mountain lions. **Journal of Fish and Wildlife Management**, 2(1): 106–111. 2011.
- NESJE, M.; ROED, K.H.; LIFJELD, J.T.; LINDBERG, P.; STEENS, O.F. Genetic relationship in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, 9: 53-60. 2000.
- NOSS, R.F.; QUIGLEY, H.B.; HORNOCKER, M.G.; MERRILL, T.; PAQUET, P.C. Conservation biology and carnivore conservation in the Rocky Mountains. **Conservation Biology**, 10: 949–963. 1996.
- NOVACK, A.J.; HUGO, V.; STALLINGS, J.; MCNAB, R.B.; RADECHOWSKY, J. **Jaguars in Chisec: description and critical assessment of habitat and connectivity in the municipality of Chisec; evaluation of long-term population viability**. Unpublished Report to USAID-Guatemala. 2003.
- NOWELL, K.; JACKSON P. **Wilds Cats: Status Survey and Conservation Action Plan**. IUCN, Gland, Switzerland, 406. 1996.
- NUNES, A.V.; SCOSS, L.M.; PRADO, M.R.; LESSA, G.M. Survey of large and medium-

sized terrestrial mammals in the Serra do Brigadeiro State Park, Minas Gerais. **Brazil Check List**, 9(2): 240–245, 2013.

OLIVEIRA, T.G. **Neotropical Cats: Ecology and Conservation**. EDUFMA, São Luís, Brazil. 1994.

OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. **Guia de identificação de felinos brasileiros**. Atibaia, São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros; Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Sociedade de Zoológicos do Brasil, Pró-Vida Brasil, 80. 2005.

PAETKAU, D.; SLADE, R.; BURDEN, M.; ESTOUP, A. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. **Molecular ecology**, 13(1): 55-65. 2004.

PALMEIRA, F.B.L.; CRAWSHAW Jr.P.G.; HADDAS, C.M.; FERRAZ, K.M.P.M.B.; VERDADE, L.M. Cattle depredation by puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) in central-western Brazil. **Biological Conservation**, 141: 118-125. 2008.

PALMEIRA, F.B.L.; CRAWSHAW Jr.P.G.; HADDAS, C.M.; FERRAZ, K.M.P.M.B.; VERDADE, L.M. Cattle depredation by puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) in central-western Brazil. **Biological Conservation**, 141: 118-125. 2008.

PALMER, J.D. Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation. **American Naturalist**, 130: S6-S29. 1987.

PAVIOLO, A.; DE ANGELO, C.; DI BLANCO, Y.E.; DI BITETTI, M.S. Jaguar *Panthera onca* population decline in the Upper Parana Atlantic Forest of Argentina and Brazil. **Oryx**, 42: 554-561. 2008.

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

PEEL, D.; MCLACHLAN, G.J. Robust mixture modelling using the t distribution. **Statistics and computing**, 10(4): 339-348. 2000.

PEREZ-SWEENEY, B.M.; ROGRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. **Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação**. In: Cullen L Jr, Valladares-Padua C and Rudran R (eds) Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre, 343-368. 2006.

PETIT, R.J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation biology**, 12(4): 844-855. 1998.

PIGGOT, M.P. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. **Wildlife Research**, 31: 485-493. 2004.

PILGRIM, K.L.; MCKELVEY, K.S.; RIDDLE, A.E.; SCHWARTZ, M.K. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. **Molecular Ecology Notes**, 5: 60-61. 2005.

PIMM, S.L.; RUSSELL, G.J.; GITTLEMAN, J.L.; BROOKS, T.M. The future of biodiversity. **Science**, 269: 347–350. 1995.

PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J.M.; PAETKAU, D.; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. **Journal of heredity**, 95(6): 536-539. 2004.

PRIMACK, RB; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Efraim Rodrigues (ed.), Londrina. 2001.

- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, P.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945–959. 2000.
- PRUGH, L.R.; RITLAND, C.E.; ARTHUR, S.M.; KREBS C.J. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. **Molecular Ecology**, 14: 1585–1596. 2005.
- PURVIS, A.; MACE, G.M.; GITTLEMAN, J.L. **Past and future carnivore extinctions: a phylogenetic perspective**. In: Gittleman, J.L., Funk, S.M., Macdonald, D., Wayne, R.K. (Eds.), *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, 11–34. 2001.
- QUIGLEY, H.B.; CRAWSHAW, P.G. A conservation plan for the jaguar *Panthera onca* in the Pantanal region of Brazil. **Biological Conservation**, 61: 149–57. 1992.
- RABINOWITZ, A.; ZELLER, K.A. A range-wide model of landscape connectivity and conservation for the jaguar, *Panthera onca*. **Biological Conservation**, 143: 939–945. 2010.
- RANNALA, B.; MOUNTAIN, J.L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94(17): 9197-9201. 1997.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, 142: 1141-1153. 2009.
- RICE, W.R. Analysing tables of statistical tests. **Evolution**, 43: 223–5. 1989.
- ROCHA-MENDES, F.; NEVES, C.L.; NOBRE, R.A.; MARQUES, R.M.; BIANCONI, G.V.; GALETTI, M. Non-volant mammals from Núcleo Santa Virgínia, Serra do Mar State Park, São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**, 15(1): 1–9. 2015.
- ROQUES, S.; FURTADO, M.; JÁCOMO, A.T.A.; SILVEIRA, L.; SOLLMANN, R.; TÔRRES, N.M.; GODOY, J.A.; PALOMARES, F. Monitoring jaguar populations *Panthera onca* with non-invasive genetics: a pilot study in Brazilian ecosystems. *Fauna & Flora International*, **Oryx**, 1-9. 2014.
- RUIZ-GARCIA, M.; PAYÁN E.; MURILLO, A.; ALVAREZ, D. DNA microsatellite characterization of the jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. **Genes Genetics**, 81: 115-127. 2006.
- RUTH, T.K.; LOGAN, K.A.; SWEANOR, L.L.; HORNOCKER, M.G.; TEMPLE, L.J. Evaluating cougar translocation in New Mexico. **Journal of Wildlife Management**, 62: 1264–75. 1998.
- SANDERSON, E.W.; REDFORD, K.H.; CHETKIEWICZ C.B. et al. Planning to save a species: the jaguar as a model. **Conservation Biology**, 16: 58-72. 2002.
- SÃO PAULO. Espécies ameaçadas de extinção no Brasil. Livro Vermelho. Volume II. MMA & ICMBio. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/livro-vermelho>. Acesso em 06/07/2015.
- SARANHOLI, B.H. **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**. 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, 2013.
- SCHIPPER, J; CHANSON, JS; CHIOZZA F. et al. The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge. **Science**, 322: 225–230. 2008.

- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, 18(2): 233-234. 2000.
- SCHWAB, A.C.; ZANDBERGEN, P.A. Vehicle-related mortality and road crossing behavior of the Florida panther. **Applied Geography**, 31: 859-870. 2011.
- SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, 9: 615-629. 2006.
- SEYMUR, K.L. *Panthera onca*. Mammalian Species, 340, 1-9. 1989.
- SILVEIRA, L. **Ecologia comparada e conservação da onça-pintada (*Panthera onca*) e onça-parda (*Puma concolor*), no Cerrado e Pantanal**. Ph.D. Thesis, University of Brasília, Brazil. 2004.
- SILVEIRA, L.; JÁCOMO, A.T. **Conservación del jaguar en el centro del Cerrado de Brasil**. In: Medellín RA, Equihua C, Chetkiewicz CLB, Crawshaw PG Jr, Rabinowitz A, Redford KH, Robinson JG, Sanderson EW and Taber AB (eds) *El Jaguar en el Nuevo Milenio*. Universidad Nacional Autónoma de México/Wildlife Conservation Society, México, 437-451. 2002.
- SOLLMANN, R.; TÔRRES, N.M.; SILVEIRA, L. Jaguar Conservation in Brazil: The Role of Protected Areas. **Cat News Special Issue**, 4: 15-20. 2008.
- SPIELMAN, D. et al. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? **Conservation Genetics**, 5(4): 439-448. 2004.
- SRBEK-ARAÚJO, A. **Conservação da onça-pintada (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) na Mata Atlântica de Tabuleiro do Espírito Santo**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre da Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.
- SUNQUIST, M.E.; SUNQUIST, F. **Wild Cats of the World**. University of Chicago Press, Chicago, IL. 2002.
- SWEANOR, L.L.; LOGAN, K.A.; HORNOCKER, M.G. Cougar Dispersal Pattern, Metapopulation, Dynamics and Conservation. **Conservation Biology**, 14(3): 798-808. 2000.
- TABERLET, P.; GRIFFIN, S.; GOOSSENS, B.; QUESTIAU, S.; MANCEAU, V.; ESCARAVAGE, N.; WAITS, L.P.; BOUVET, J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, 24: 3189-3194. 1996.
- TABERLET, P.; LUIKART, G. Non-invasive genetic sampling and individual identification. **Biological Journal of the Linnean Society**, 68: 41-55. 1999.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28(10): 2731-9. 2011.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. **Nucleic Acids Research**, 17(16): 6463-6471.
- TERBORGH, J.; LOPEZ, L.; NUNEZ, P.; RAO, M.; SHAHABUDDIN, G.; ORIHUELA, G.; RIVEROS, M.; ASCANIO, R.; ADLER, G.H.; LAMBERT, T.D.; BALBAS, L. Ecological meltdown in predator-free forest fragments. **Science**, 294: 1923-1926. 2001.
- TÔRRES, N.M.; DE MARCO JR, P.; DINIZ FILHO, J.A.F. & SILVEIRA, L. Jaguar Distribution in Brazil: Past, Present and Future. **Cat News Special Issue**, 4: 4-8. 2008.
- VALDEZ, F.P.; HAAG, T.; AZEVEDO, F.C.C.; SILVEIRA, L.; CAVALCANTI, S.M.C.;

- SALZANO, F.M.; EIZIRIK, E. Population Genetics of Jaguars (*Panthera onca*) in the Brazilian Pantanal: Molecular evidence for demographic connectivity on a regional scale. **Journal of Heredity**, 503–511. 2015. Doi:10.1093/jhered/esv046.
- VALIÈRE, N. GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Notes**, 2(3): 377–379. 2002.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology**, 4: 535-538. 2004.
- VIGNIERI, S. Vanishing fauna. **Science**, 345, 6195, p. 392-395. 2014.
- WAITS L.P.; LUIKART, G.; TABERLET P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular Ecology**, 10: 249–256. 2001.
- WANG, J. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular Ecology Resources**, 11: 141–145. 2011.
- WAYNE, R.K.; MORIN, P.A. Conservation genetics in the new molecular age. **Front Ecol Environ.**, 2(2): 89–97. 2004.
- WEBER, W; RABINOWITZ, A. A global perspective on large carnivore conservation. **Conservation Biology**, 10: 1046-1054. 1996.
- WRIGHT, D.S. **Understanding intergovernmental relations**. Duxbury Press, 1978.
- WULTSCH C.; WAITS, L.P.; KELLY, M.J. Noninvasive individual and species identification of jaguars (*Panthera onca*), pumas (*Puma concolor*) and ocelots (*Leopardus pardalis*) in Belize, Central America using cross-species microsatellites and faecal DNA. **Molecular Ecology Resources**, 14: 1171–1182. 2014.
- ZELLER, K.A. **Jaguars in the New Millennium**. Data Set Update: The State of the Jaguar in 2006. Wildlife Conservation Society, Bronx, New York. 2007.